

**UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO  
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA  
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA**



**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE MÉDICO CIRUJANO**

**EFFECTO ANTIBIOFILM DEL ACEITE ESENCIAL DE  
*Cinnamomum zeylanicum* “canela” SOBRE *Candida tropicalis***

**AUTOR: LILIANA ROSMERI DE LA CRUZ GÓMEZ**

**ASESORA: Dra. ELVA MANUELA MEJÍA DELGADO**

**TRUJILLO - PERÚ**

**2019**

**EFEECTO ANTIBIOFILM DEL ACEITE ESENCIAL DE  
Cinnamomum zeylanicum “canela” SOBRE Candida  
tropicalis**

---

**PRESIDENTA**

**DRA: OFELIA CORDOVA PAZ SOLDAN**

---

**SECRETARIO**

**DR. PEDRO MERCADO MARTINEZ**

---

**VOCAL**

**DR: DAN ALTAMIRANO SARMIENTO**

## **DEDICATORIA**

A Dios por brindarme vida, salud y entendimiento para lograr este objetivo.

A Eugenio y Justina, mis padres por su amor incondicional, confianza infinita y sacrificio diario, fueron los que me impulsaron a seguir adelante y sobrellevar los momentos más difíciles.

A mis hermanos quienes con sus juegos y ocurrencias hicieron que este camino sea más llevadero.

A Jhony por su paciencia, apoyo y preocupación en mi carrera profesional.

A Gloria García y familia, quienes a la distancia me brindaron su apoyo y confianza durante mi formación.

A mis amigos y amigas por los momentos compartidos en la facultad e internado, siempre los llevaré presente.

## **AGRADECIMIENTO**

A mi asesora Dra. Elvita por su paciencia y guía en la elaboración de esta investigación.

A mi alma mater, por estos años de aprendizaje brindado y enseñarme a querer aun más esta profesión.

A mis maestros de la facultad de medicina quienes con su ejemplo me han guiado durante este camino y siempre los recordaré.

## RESUMEN

El objetivo es evaluar si el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* “canela” inhibe el crecimiento del biofilm originado por *Candida tropicalis* ATCC1369. El método utilizado para la obtención del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* “canela” fue mediante el método “destilación por arrastre de vapor de agua”, *Candida tropicalis* ATCC1369 fue obtenida del laboratorio microbiológicos. Se formaron 6 grupos: 4 experimentales (tratados con aceite esencial de canela a las concentraciones de 100%, 75%, 50% y 25%), control positivo (Fluconazol) y control negativo (solución salina fisiológica), cada uno con 16 repeticiones, los cuales fueron enfrentados al biofilm de *Cándida tropicalis*. El efecto antibiofilm se determinó mediante el índice de porcentaje de inhibición, el cual fue de 79,11 %, 68,79%, 58,15% y 47,88% a las concentraciones de 100%, 75%, 50% y 25% respectivamente. El análisis de varianza para un diseño con mas de dos grupos independientes y estadística de pruebas paramétricas se utilizaron para comparar los tratamientos entre sí y establecer el orden de efectividad. Los resultados permiten concluir que aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (“canela”) a la concentración de 100%, 75%, 50% y 25% tiene efecto inhibitorio sobre el biofilm formado por *Candida tropicalis* ATCC1369 y tiene mayor efecto inhibitorio en comparación con fluconazol.

**Palabras clave:** *Cinnamomum zeylanicum*, *Candida tropicalis* ATCC1369 , efecto antibiofilm

## ABSTRACT

The objective is to evaluate the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* "cinnamon" to inhibit the growth of biofilm caused by *Candida tropicalis* ATCC1369. water ", *Candida tropicalis* ATCC1369 was a product of the microbiology laboratory. 6 groups were formed: 4 experimental (control with cinnamon essential oil and 100%, 75%, 50% and 25%), positive control (fluconazole) and negative control (physiological saline), each with 16 repetitions Which were faced with the biofilm of *Candida tropicalis*. The antibiofilm effect was determined by the percentage inhibition index, which was 79.11%, 68.79%, 58.15% and 47.88% at 100%, 75%, 50% and 25. % respectively. The analysis of the variance for a design with more than two groups of statistics and parametric tests is used to compare the treatments with each other and establish the order of effectiveness. The results have no inhibitory effect on the biofilm formed by *Candida tropicalis* ATCC1369 and have an inhibitory effect on fluconazole.

**Palabras clave:** *Cinnamomum zeylanicum*, *Candida tropicalis* ATCC1369 , antibiofilm effect

## **INDICE**

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
<b>I. Introducción.....</b>	<b>8</b>
- Problema.....	13
- hipótesis.....	13
- Objetivos.....	13
<b>II. Material y Métodos.....</b>	<b>14</b>
- Diseño del estudio.....	14
- Población.....	16
- Muestra.....	17
- Criterios de inclusión y exclusión .....	17
- Operacionalización de Variables.....	18
- Procedimientos y Técnicas.....	19
- Plan de análisis de datos.....	23
<b>III. Resultados.....</b>	<b>24</b>
<b>IV. Discusión.....</b>	<b>28</b>
<b>V. Conclusiones.....</b>	<b>34</b>
<b>VI. Recomendaciones.....</b>	<b>35</b>
<b>VII. Referencias Bibliográficas.....</b>	<b>36</b>

<b>VIII. Anexos.....</b>	<b>46</b>
--------------------------	-----------

## I. INTRODUCCIÓN

*Cándida* spp son hongos patógenos oportunistas y representan una causa común de infecciones fúngicas invasivas en la comunidad <sup>(1)</sup>, así como de infecciones nosocomiales y su incidencia va en aumento a nivel mundial <sup>(2)</sup>. Este aumento se ha registrado principalmente por cambios en las poblaciones de riesgo, uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro, mayor realización de procedimientos invasivos, cateterismo central y uso de inmunosupresores <sup>(3)</sup>. De esta manera, las tasas de mortalidad por candidemia son altas, en países industrializados <sup>(4)</sup> y en nuestro medio <sup>(5)</sup>, por lo tanto, el estudio de esta especie es de gran importancia médica.

En sus entornos naturales, la mayoría de los hongos cambian de un estado planctónico a uno sésil formando las llamadas biopelículas o biofilms <sup>(5)</sup>, las cuales son grupos celulares fuertemente adheridas entre sí y a las superficies de contacto, además de encontrarse cubiertas por matriz extracelular (MEC) de polisacáridos, lo cual lo hace mucho más resistentes a los antimicrobianos <sup>(6, 7)</sup>.

La formación de biopelículas se ha estudiado principalmente en bacterias y, en los hongos, dentro de los cuales se encuentra *Candida tropicalis*. Las fases de formación de biopelículas son: acondicionamiento, adherencia a la superficie, síntesis de matriz extracelular, maduración y dispersión; cuya

duración por etapas puede ser temprana (8-11 horas), intermedia (12-30 horas) y madura (38-72 horas)<sup>(8)</sup>.

Es gracias a esta biopelícula que *Candida sp.* pueden adherirse a catéteres y prótesis, logrando pasar a la sangre y distribuirse por todo el organismo, causando la muerte de las personas afectadas <sup>(9,10)</sup>. Este hecho explica por qué *Candida albicans* y *Cándida tropicalis* muestran alta resistencia a los antifúngicos, pues en ellas sus biopelículas se componen de capas densas de blastoporas de levadura, hifas, pseudohifas, además del MEC, y aunque *Cándida albicans* es la de mayor patogenicidad, cada vez hay mayores reportes de la identificación de *Cándida tropicalis* <sup>(11,12)</sup>.

Por tal motivo, *Candida* ha sido estudiada en diferentes escenarios y continuamente se sintetizan nuevas drogas y derivados para combatirla <sup>(13,14)</sup>. Sin embargo, estos agentes antifúngicos pueden comprometer y deteriorar la calidad de vida del paciente, debido a sus múltiples reacciones adversas, esto ha causado una búsqueda incansable en la naturaleza de derivados de las plantas, tal y como son los extractos hidroalcohólicos y aceites esenciales, los que debido a su versatilidad, han mostrado ser útiles en el tratamiento de diferentes enfermedades.

El uso de aceites esenciales (AE) es común y reconocido por sus amplias propiedades medicinales <sup>(15)</sup>, estos pueden ser obtenidos de todas las partes de la planta, y se compone principalmente de terpenos y terpenoides <sup>(16)</sup>, es por ello que los estudios sobre hongos muestran que diferentes plantas

cuando son empleadas como aceites esenciales pueden ser uno de los mejores agentes antifúngicos <sup>(17)</sup>.

Dentro de los distintos productos naturales, las especies botánicas son las de mayor estudio, muchas de ellas ya han mostrado su actividad antifúngica con anterioridad, ejemplos de ello es el aceite de árbol del té, que tiene actividad directa contra las biopelículas de *Candida spp* <sup>(18,19)</sup>, *Coriandrum sativum* (“cilantro”) <sup>(20)</sup> y *Ocimum americanum* (“albahaca”) <sup>(21)</sup>. Y de forma similar aceites esenciales de *Syzygium aromaticum* ha demostrado un efecto antibiofilm sobre cepas de *Candida spp* resistentes a fluconazol <sup>(22)</sup>.

Otra de las especies aromáticas es *Cinnamomum zeylanicum* o *Cinnamomum verum* conocida como “canela”, pertenece a la familia de las *Lauraceae*, y es procedente de India, aunque se cultiva alrededor de todo el mundo <sup>(23)</sup>; su árbol alcanza hasta 10 metros de altura recubierto de corteza <sup>(24,25)</sup>, su procesamiento es importante en todo el mundo debido a su utilidad en medicina tradicional y moderna <sup>(26)</sup>. La cortezas y hojas se utilizan ampliamente como terapia antibacteriana <sup>(27)</sup>, antioxidante, antiinflamatoria <sup>(28)</sup>, antidiabética <sup>(29)</sup>, anticancerosa <sup>(30)</sup>, entre otros. Su aceite esencial es de color amarillo claro, volátil, de olor característico, y tiene diversos componentes siendo el más abundante el aldehído cinámico (50-75%) <sup>(31)</sup>.

Dentro de los autores que han probado la actividad de la canela frente a *Candida albicans*, Pires R, et al (2011), realizaron un estudio experimental utilizando aceite esencial de canela frente a cultivo planctónicos y

biopelículas de *Cándida albicans*, evidenciado mediante microscopía electrónica que, luego de 72 horas, los complejos hongo-aceite presentaron menor complejidad de biopelícula en relación con quienes no fueron sometidos al aceite a una concentración de 2 ug/mL, inhibiendo las biopelículas cuando estuvo a una concentración mayor a 250 ug/mL, por ello concluyen que el aceite esencial tiene efecto antibiofilm y este es dependiente de dosis <sup>(32)</sup>.

Serra E, et al., (2018), realizaron un estudio experimental con la finalidad de determinar si la “canela” tenía alguna actividad frente a *Cándida albicans*, en estado planctónico y en forma de biopelículas, utilizando el método del ensayo por diluciones, obteniendo como resultados que la concentración mínima inhibitoria al 80% frente al estado planctónico fue de 0.1 g/dL, pero no se logró encontrar una concentración mínima inhibitoria frente a biopelículas, concluyendo que si bien el aceite esencial de canela posee efecto antifúngico, su efecto antibiofilm es reducido <sup>(33)</sup>.

Farisa S, et al., (2018), luego de realizar en India una investigación experimental en donde utilizaron el aceite esencial de “patchouli” y “canela”, con el objetivo de determinar sus efectos antifúngicos y antibiofilms contra 3 especies de *Candida*, obtuvieron una reducción de la masa de biofilm formados por cada una de las especies de *Candida* en estudio, luego mediante el microscopio electrónico también pudieron evidenciar que presentaba además la disrupción de la capa de exopolisacáridos del biofilms,

concluyendo que el aceite esencial de “patchouli” y el aceite esencial de “canela” tienen efectividad en contra de la virulencia de *Candida* sp<sup>(34)</sup>.

Tomando en cuenta estudios previos en otros países, utilizando otras especies de *Candida* y de *Cinnamomum*, en el presente proyecto se plantea evaluar si el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* “canela” inhibe el crecimiento del biofilm originado por *Candida tropicalis*; resultados que podrían apoyar a la innovación de nuevos fitofármacos alternativos para combatir a las especies de *Candida* resistentes a las terapias de primera línea.

**Problema:**

¿Tiene efecto antibiofilm el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (“canela”) sobre *Candida tropicalis*?

**Hipótesis:**

H1: El aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (“canela”) tiene efecto antibiofilm sobre *Candida tropicalis*.

Ho: El aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (“canela”) no tiene efecto antibiofilm sobre *Candida tropicalis*.

**Objetivos:****- Objetivo general**

Evaluar el efecto antibiofilm del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* “canela” sobre *Candida tropicalis*.

**- Objetivos específicos**

- Evaluar el efecto antibiofilm del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (“canela”) a la concentración de 100, 75, 50 y 25% sobre *Candida tropicalis*.

- Comparar el efecto antibiofilm del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (“canela”) a la concentración de 100%, 75%, 50% y 25% sobre *Candida tropicalis* frente a Fluconazol.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Diseño del estudio<sup>35, 36</sup>:

El diseño de la presente investigación corresponde a un estudio experimental

O <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	O <sub>2</sub>
O <sub>3</sub>	X <sub>2</sub>	O <sub>4</sub>
O <sub>5</sub>	X <sub>3</sub>	O <sub>6</sub>
O <sub>7</sub>	X <sub>4</sub>	O <sub>8</sub>
O <sub>9</sub>	X <sub>5</sub>	O <sub>10</sub>
O <sub>11</sub>	X <sub>6</sub>	O <sub>12</sub>

Donde:

O<sub>1</sub> = Observación antes del tratamiento con aceite esencial de canela al 100%.

X<sub>1</sub> = Tratamiento con aceite esencial de canela al 100%

O<sub>2</sub> = Observación después del tratamiento con aceite esencial de canela al 100%.

O<sub>3</sub> = Observación antes del tratamiento con aceite esencial de canela al 75%.

X<sub>2</sub> = Tratamiento con aceite esencial de canela al 75%.

O<sub>4</sub> = Observación después del tratamiento con aceite esencial de canela al 75%.

O<sub>5</sub> = Observación antes del tratamiento con aceite esencial de canela al 50%

X<sub>3</sub> = Tratamiento con aceite esencial de canela al 50%

O<sub>6</sub> = Observación después del tratamiento con aceite esencial de canela al 50%

O<sub>7</sub> = Observación antes del tratamiento con aceite esencial de canela al 25%

X<sub>4</sub> = Tratamiento con aceite esencial de canela al 25%

O<sub>8</sub>= Observación después del tratamiento con aceite esencial de canela al 25%

O<sub>9</sub>= Observación antes del tratamiento con fluconazol

X<sub>5</sub>=Tratamiento con fluconazol

O<sub>10</sub>=Observación después del tratamiento con fluconazol

O<sub>11</sub>=Observacion antes del tratamiento con solucion salina fisiológica

X<sub>6</sub>= tratamiento con solución salina fisiológica

O<sub>12</sub>= observación después del tratamiento con solución salina fisiológica

## 2.2. Población muestra y muestreo:

- **Grupo de estudio:** *Cándida tropicalis* ATCC1369 fue adquirida del laboratorio Microbiologics donde fue almacenada y conservada.

- **Muestra y muestreo:**

- **Unidad de análisis:**

La unidad de análisis estuvo constituida por *Candida tropicalis* ATCC1369 reactivada en agar saboraud a temperatura ambiente por 48 horas.

- **Unidad de muestreo:**

La unidad de muestreo fueron los biofilms producidos por *Candida tropicalis* ATCC1369 donde se evaluó el efecto del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* “canela” mediante el índice de porcentaje de inhibición.

- **Cálculo del número de repeticiones:**

Para determinar el tamaño de muestra se usó de la fórmula para comparación de grupos:

$$N = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2S^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

Donde:

$$(X_1 - X_2)^2$$

$Z_{\alpha/2}$  : 1,96 para una confianza de 95%, error Tipo I de una distribución normal de datos.

$Z_{\beta}$ : 0,84 para una potencia del 80%, error Tipo II de una distribución normal de datos.

$S = (X_1 - X_2)$ , valor de la Desviación Estandar, resultado del error de la diferencia de dos medias y que se asume por no estar indicado o no contar con valores en los antecedentes revisados.

Reemplazando:

$$N = \frac{(1,96 + 0,84)^2 * 2 (X_1 - X_2)^2}{(X_1 - X_2)^2} = (2,8)^2 * 2 = 15.6$$

16 repeticiones
--------------------

la muestra estuvo conformada por 16 repeticiones a cada grupo.

- **Criterios de control:**

Se incluyeron los cultivos en los cuales no haya contaminación con otros hongos.

### 2.3. operacionalización de variables

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICION OPERACIONAL	INDICADOR	NIVEL DE MEDICION	UNIDAD DE MEDIDA
Aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> ( <b>variable independiente</b> )	Variable cuantitativa Discreta	Sustancia natural que inhibe el crecimiento del biofilm de <i>Candida tropicalis</i>	Concentración utilizada de aceite esencial de canela sobre cultivos de <i>Candida tropicalis</i>	De razón	Porcentaje 100% 75% 50% 25%
Efecto antibiofilm in vitro ( <b>variable dependiente</b> )	Variable cuantitativa	Capacidad para inhibir el crecimiento de biofilm formado por <i>Candida tropicalis</i>	Indice de porcentaje de inhibición	De razón	Formación de biofilm Baja >80% Moderda 50-80% Alta <50%

## Definición conceptual de variables:

- Aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum*: Producto natural con efecto antibiofilm sobre *Candida tropicalis*
- Efecto antibiofilm in vitro: Capacidad para evitar la formación de film que brinda protección al hongo, en condiciones experimentales

## 2.4. Procedimientos y técnicas

### 2.4.1 Obtención del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum*

**(canela):** Para obtener el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* se compraron 6 kg de canela en el Mercado “La Hermelinda” (Trujillo-La Libertad-Perú). Los cuales fueron llevados al laboratorio de farmacognosia de la facultad de farmacia y bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo para la extracción del aceite esencial, el cual se realizó por el método de “destilación por arrastre de vapor de agua”. Las cortezas fueron cortadas en partes pequeñas (1x1 cm), se colocaron en un balón de fondo plano y se sometieron a una corriente de vapor de agua sobrecalentada; así arrastró la esencia, que luego se condensó por acción del refrigerante. Se separó el destilado teniendo en cuenta las propiedades de inmiscibilidad y diferencia de densidades entre el agua y el aceite, luego se utilizó una pera de separación de vidrio, se deshidrataron las impurezas de agua en el aceite esencial con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , se filtraron y finalmente se conservaron en un frasco de vidrio color ámbar (para evitar la descomposición por la luz) y se refrigeró a 4 °C hasta realizar análisis microbiológico.<sup>37,38</sup>

**2.4.2. PREPARACIÓN DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL ACEITE ESENCIAL DE LA CORTEZA DE *Cinnamomum zeylanicum* “CANELA”<sup>37,38</sup>**

Se prepararon según el siguiente cuadro:

<b>Volumen de aceite esencial</b>	<b>Volumen de Tween 80</b>	<b>Volumen final</b>	<b>Concentración (%)</b>
16 ml	-	16 ml	100
13,5 ml	2,5 ml	16 ml	75
11,0 ml	5,0 ml	16 ml	50
5,5 ml	7,5 ml	16 ml	25

Se empleó tween 80 como disolvente para homogenizar la mezcla, ya que se unen dos compuestos inmiscibles entre sí evitando la separación de fases. Se eligió tween 80 porque es un tipo de polisorbato altamente puro, es bien tolerado y no es irritante.

**2.4.3 Reactivación de *Candida tropicalis*:**

Se realizó mediante la reactivación *Candida tropicalis* ATCC 1369 en Agar Sabourauda temperatura ambiente por 48 horas.

### **Preparación del inóculo:**

*Candida tropicalis* ATCC1369 se cultivó en tubos de ensayo y se incubó a 37°C en agar Sabouraud por 48 horas para obtener colonias jóvenes. Luego se diluyeron con solución salina hasta obtener una suspensión semejante a la turbidez del tubo N° 0,5 del nefelómetro de MacFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC).

### **Procedimiento:**

- 1) Se prepararon 6 tubos de ensayo en los cuales se colocaron 1 ml de la solución preparada de *Candida tropicalis* y se dejó a temperatura ambiente por 48 horas. Luego se elimina la solución y se agrega en cada uno de los cuatro primeros tubos 1 ml de cada concentración del aceite esencial de canela, al quinto tubo se agrega 1 ml de fluconazol (control positivo) y en el sexto tubo se agregó 1 ml de solución salina fisiológica (control negativo), de cada tubo se realizaron 16 repeticiones y se incubaron a 37°C por 48 horas <sup>(39)</sup>.
  
- 2) Luego se descartó el medio de cultivo del tubo de ensayo y se colocó de forma invertida sobre papel absorbente, una vez retirado todo el líquido restante se lavó con agua destilada estéril de forma abundante. Este lavado se repitió dos veces sacudiendo de forma invertida energicamente con la finalidad de retirar a *Cándida tropicalis* y solamente quedarnos con el *biofilm*. Una vez retirado todo el medio, se añadió Cristal violeta al 1% a cada tubo, durante

5 minutos y se descartó el colorante de forma invertida lavando con agua destilada estéril dos veces, de igual forma que en el paso anterior, considerándose que hubo formación de biofilm al observar la película teñida en las paredes del tubo<sup>(39)</sup>.

- 3) Luego de retirar el exceso de colorante se midió la absorbancia de cada tubo a 621 nm; los valores obtenidos fueron utilizados para obtener el índice de porcentaje de inhibición<sup>39</sup> mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IPI: } \frac{[\text{test 621 nm} - \text{control 621 nm}]}{\text{test 621 nm}} \times 100$$

Estableciéndose la siguiente escala: baja formación de biofilm (>80%), moderada formación de biofilm (50-80%) y alta formación de biofilm (<50%)<sup>(39)</sup>.

## **2.5. Plan de análisis de datos:**

Para evaluar el efecto antibiofilm de las concentraciones de aceite esencial de canela se empleó análisis de varianza de un diseño al azar y las pruebas post hoc, con nivel de significancia del 5%.

## **2.6. Aspectos éticos:**

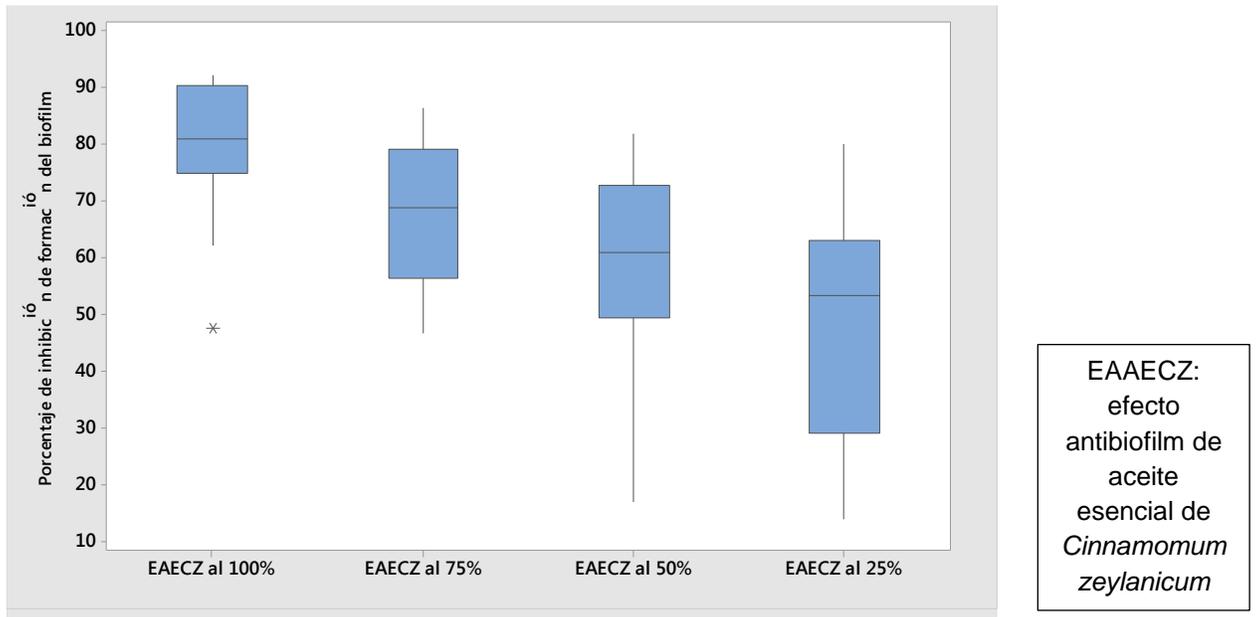
Al realizar la presente investigación, se tuvo en cuenta el principio de precaución en conformidad con el Principio 15 de la Declaración de Río sobre el Medio Ambiente y el Desarrollo. Asimismo, se tomó en cuenta el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica, considerando los riesgos para la salud humana. Así mismo se respetaron los principios de protección y confidencialidad de los datos presentes en la declaración de Helsinki<sup>(40)</sup>, Ley General de Salud<sup>(41)</sup> y Código de Ética y Deontología del Colegio Médico del Perú<sup>(42)</sup>.

### III. RESULTADOS

En la figura 1 de los gráficos de caja se observa que la concentración de 100% del aceite esencial de canela esta representado por el gráfico de caja más pequeño; caso contrario ocurre con la concentración de 25% del aceite esencial de canela que esta representado por un gráfico de caja mas grande, lo cual indica que la mayor inhibicion de la formación de biofilm ocurre a una mayor concentración de aceite esencial de canela.

En la figura 2 se observa que el gráfico de caja del fluconazol presenta mayor tamaño, indicando menos de respuesta inhibitoria en comparación con las diferentes concentraciones de aceite esencial de canela.

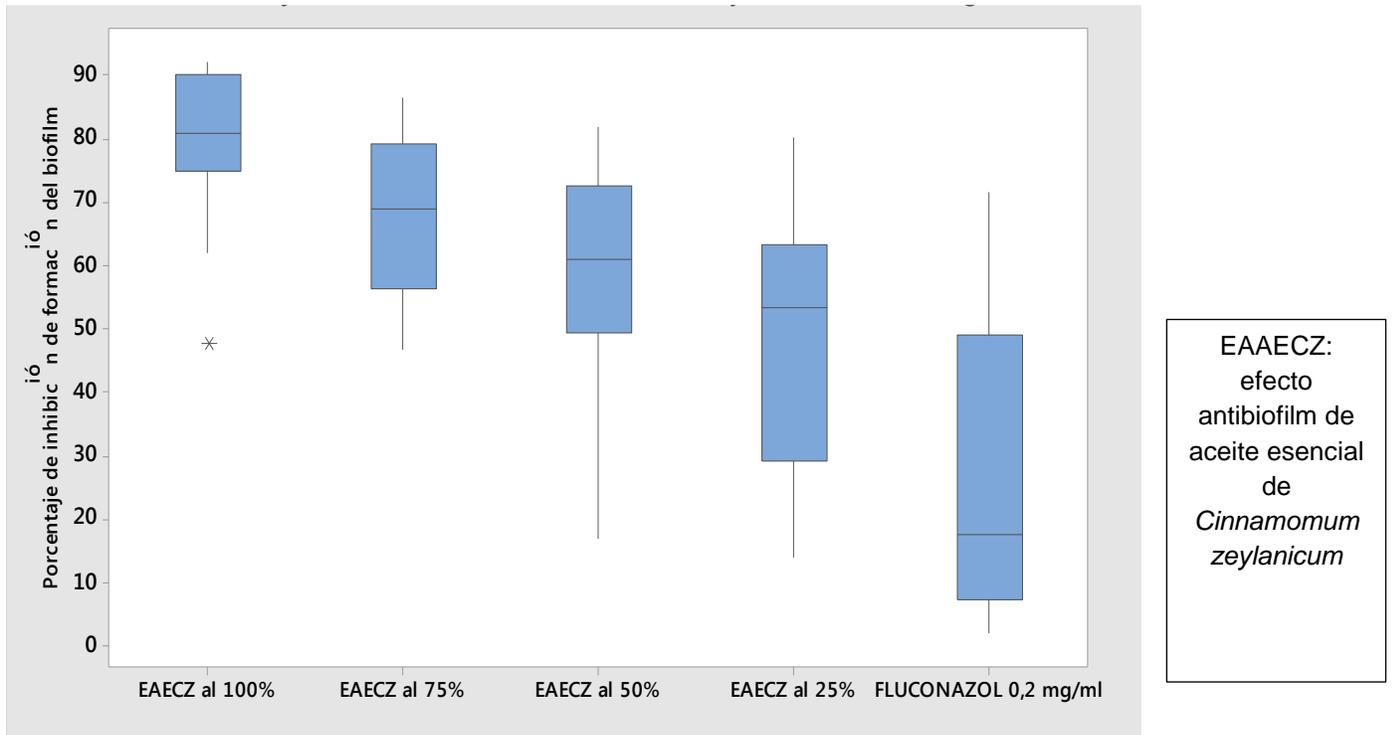
En el grafico 1 se representa el promedio de las repeticiones de cada concentración de aceite esencial de canela; donde se observa que al 100% tiene un porcentaje de inhibicion de 79,11%, al 25% se inhibe 47,8% y el fluconazol tuvo porcentaje de inhibicion de 23,5%, encontrandose que a mayor concentraciòn del aceite esencial de *cinnamomum zeylanicum* aumentó el porcentaje de inhibición generando una menor formacion de biofilm. Por lo que se infiere que el efecto antibiofilm es mayor en cuanto sea mayor, tambien, la concentración del aceite esencial: A mayor concentración existe mayor efecto. Fluconazol tuvo menor efecto antibiofilm en comparación con los tratatamientos realizados con aceite esencial de canela en las concentraciones de 100%, 75%, 50% y 25%.



Fuente: Datos obtenidos por el autor

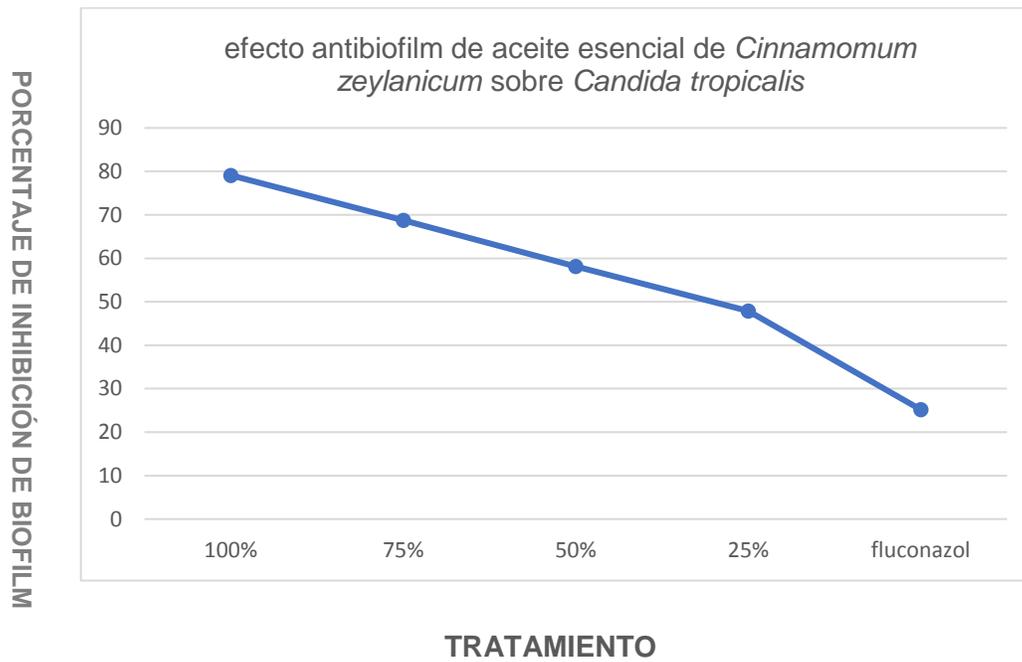
Figura 1. comparación entre concentraciones del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* “canela” en la inhibición de la formación del biofilm de *Candida tropicalis*.

UPAO, Trujillo-2019



Fuente: Datos obtenidos por el autor

Figura 2. Efecto antibiofilm del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* “canela” sobre *Candida tropicalis* comparado con fluconazol. UPAO, Trujillo – 2019



Fuente: Datos obtenidos por el autor.

Gráfico 1. promedio del porcentaje de inhibición de *Cinnamomum zeylanicum* "canela" sobre la formación de biofilm por *Candida tropicalis* comparado con fluconazol. UPAO, Trujillo – 2019.

#### IV. DISCUSIÓN

El reconocimiento por parte de microbiólogos clínicos que los biofilms, son factores bacterianos de virulencia, y ubicuos en la naturaleza. Condujo al estudio e investigación de una gran cantidad de enfermedades infecciosas producidas por microorganismos que tienen esta característica de crecimiento; para el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos más del 60% de las infecciones son causadas por biofilms microbianos, asimismo se les atribuye un similar porcentaje de las infecciones hospitalarias, provocando un incremento de la permanencia en los nosocomios, la mortalidad y los costos de la atención<sup>43</sup>.

Los biofilms son el origen de infecciones usualmente repetitivas del tracto urinario causadas por *Escherichia coli* y otros patógenos, infecciones del oído medio en niños provocadas por *Haemophilus influenzae*, la formación de la placa bacteriana, la gingivitis y la peridontitis y la infección pulmonar en pacientes con fibrosis quística causada por *Pseudomonaaeruginosay Burkholderiacepacia* que puede destruir la función pulmonar adelantando la muerte del paciente. Asimismo, a las mencionadas infecciones se le agregan otras tantas generadas a partir de la contaminación microbiana de implantes quirúrgico u otros tipos de dispositivos médicos, como son catéteres, colocados a los pacientes en ámbitos médico-asistenciales<sup>44,45</sup>.

Variados estudios han indicado que entre los aspectos más destacados de los biofilms vinculados con el desarrollo de infecciones sobresalen su capacidad de alterar la respuesta inmune mediada por células y la respuesta humoral del hospedador, como

también su resistencia a los tratamientos antibióticos convencionales. Esta última característica es la que mejor distingue a las infecciones crónicas asociadas con biofilms respecto a las infecciones agudas. Mientras que las infecciones agudas pueden ser eliminadas por medio de tratamientos con antibióticos, las infecciones por biofilms normalmente no consiguen ser completamente eliminadas, persistiendo en el hospedador y produciéndose episodios recurrentes<sup>46</sup>.

La figura 1 y grafico 1 presentan el efecto inhibitorio del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* a diferentes concentraciones sobre el biofilm formado por *Candida tropicalis* ATCC1369; en el cual se observa que todas las concentraciones tienen algún tipo de actividad inhibitoria en la formación del biofilm.

Los resultados coinciden con lo reportado por Pires et al. (2011) quienes demostraron la eficacia del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* contra la formación de biofilms de *Cándida parapsilosis* y *Cándida orthopsilosis* con la diferencia de que en su metodología determinaron las concentraciones mínimas inhibitorias de 500 y 200 µg/ml y las concentración mínima para la reducción de biofilms de 2000 y 1000 µg/ml, respectivamente<sup>32</sup>. Nuestro estudio incrementa la utilidad del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* e implicaría eficacia contra el biofilm formado por *Cándida tropicalis*.

Farisa et al. (2018), del mismo modo que en nuestro estudio, utiliza *Cándida tropicalis*, para evaluar los aceites esenciales de *Cinnamomum tamala* y *Cinnamomum camphora*, especies botánicamente emparentadas con *Cinnamomum zeylanicum*. Utilizando el mismo método espectrofotométrico, con una lectura a 620 nm para evaluar sus

resultados, encontraron que la capacidad inhibitoria de estos aceites esenciales para la formación de biofilm producido por *Cándida tropicalis* fue de 54% y para otras especies de *Cándida* entre 60% y 65%<sup>34</sup>; valores muy cercanos al efecto antibiofilm de 79,11% y 68,79% obtenidos en el presente estudio cuando se utilizaron las concentraciones de 100% y 75% de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum*.

Los resultados del presente estudio, coinciden también, con el efecto antifúngico de aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre cepas de *Candida* spp involucradas en infecciones orales; Rangel y su colaboradores (2018) demostraron que la reducción de la formación de biofilm estuvo entre 39,94% y 49,42%; a excepción de *Cándida tropicalis* cuya disminución en la formación de biofilm fue de 30,2% después de 48 horas de exposición al aceite esencial <sup>47</sup> valores que fluctúan en el rango de los valores obtenidos en el presente estudio cuando se utilizaron las concentraciones de 50% 75% y 100% de aceite esencial.

Aceites esenciales como el citral de *Cymbopogon citratus* y el timol de *Thymus vulgaris* también han sido utilizados contra *Cándida tropicalis*; los cuales fueron adicionados en la etapa inicial de la formación del biofilm tal como se hizo también en el presente estudio, y 24 horas después (en la fase log) aun cuando se usó a otro tipo de aceite vegetal; los resultados de efecto antibiofilm coinciden con el presente estudio, e inclusive se llegó a determinar que el timol fue más efectivo que el citral, debido a la naturaleza recalcitrante del biofilm maduro<sup>48</sup>.

Al contrastar las hipótesis planteadas inicialmente para realizar el presente estudio, estaríamos aceptando la hipótesis alternativa de que el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* inhibe la formación del biofilm de *Candida tropicalis* ATCC1369; nuestros resultados se ven refrendados por lo que obtuvo Rangel y colaboradores (2011) quienes utilizaron aceite esencial de *Myrtus communis* demostrando una inhibición efectiva a la formación del biofilm formado por *Candida tropicalis*<sup>49</sup>. Ambas investigaciones, coinciden en el mismo resultado sobre la misma especie de *Candida*, a pesar de emplear especies vegetales distintas.

Dentro de los compuestos que han sido comprobados en otros estudios, de ser agentes activos contra biofilms de *Cándida* en modelos in vitro e in vivo están las ecchinocandinas, un grupo de lipopéptidos semisintéticos derivados de *Coleophoma empedri*, *Aspergillus nidulans* o de *Glarealo zoyensis*<sup>50</sup>; sin embargo es bueno resaltar que el efecto antibiofilm de antifúngicos se incrementa cuando las drogas son usadas a altas concentraciones<sup>51</sup>; y como se puede observar en la figura 1: el mayor porcentaje de inhibición en la formación de biofilm se produce cuando el aceite esencial de canela se usó a la concentración de 100%.

Un efecto reductor significativo sobre el biofilm de *Candida tropicalis* también fue demostrado por Marioni y colaboradores (2016), usando el extracto de las partes aéreas de *Heterophyllaea pustulata*, las cuales poseen una alta concentración de antraquinonas<sup>52</sup>. Las antraquinonas Rubiadina y Rubiadin-1-metil éter no son químicamente similares a los aceites esenciales de canela, pero también reducen la masa de biofilm producida por *Candida tropicalis* con la producción de especies

reactivas de oxígeno induciendo a estrés oxidativo en microorganismos patogénicos por lo que se convierten en una alternativa de utilización<sup>53</sup>.

Si analizamos los porcentajes de antibiofilm obtenidos en las diferentes concentraciones utilizadas en el presente estudio, no existe una inhibición completa de su formación; esto podría estar relacionado con la citoarquitectura de las biopelículas que forman las especies de *Candida* las cuales muestran gran heterogeneidad estructural que podría variar incluso entre el aislado que se va a estudiar y el biomaterial que está actuando como sustrato. En el caso de *Cándida tropicalis* tiene una biopelícula bifásica con capas basales de blastosporas e hifas en mayor o menor proporción<sup>54</sup>.

Otros autores afirman que *Cándida tropicalis* desarrolla una matriz amplia rica en carbohidratos, proteínas, fósforo y ácido urónico<sup>55</sup>; rica en hexosamina, la cual es pobremente penetrada por agentes antifúngicos<sup>56</sup>. También que el  $\beta$ -13 glucano correlaciona un fenotipo resistente a antifúngicos y es un factor en la unión o secuestro de fluconazol<sup>57</sup>; de allí que no se obtenga efecto inhibitorio con Fluconazol como se observa en la figura 2.

Otra de las razones por las que, farmacológicamente el fluconazol tiene menor efecto inhibitorio se debería a que la matriz extracelular limita la penetración de los agentes antimicrobianos dentro del biofilm debido a que existen limitaciones en su difusión, la absorción o reacción del agente antibiofilm neutralizando su efecto<sup>48</sup>. Además se ha estudiado que *Cándida tropicalis* y otras especies han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia a fluconazol tales como modificación del sitio de acción y

presencia de bombas de expulsión activas haciéndolo insuficiente para erradicar el biofilm<sup>58</sup>, resultados que están acordes con el presente estudio puesto que no hay una inhibición completa en la formación del biofilm cuando se utiliza fluconazol como droga de referencia según se muestra en la figura 2.

## V. CONCLUSIONES

- El aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (“canela”) a la concentración de 100%, 75%, 50% y 25% tiene efecto inhibitorio sobre el biofilm formado por *Candida tropicalis* ATCC1369
- El aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (“canela”) tiene mayor efecto inhibitorio sobre el biofilm formado por *Candida tropicalis* ATCC1369 que Fluconazol.

## **VI. RECOMENDACIONES**

- Establecer la longitud de onda más favorable para la lectura en el espectrofotometro y deducir un mejor porcentaje de inhibición.
- Se debe continuar estudios en busca de alternativas a los diferentes tratamientos convencionales.
- Realizar trabajos de investigación con otros tipos de microorganismos y especies vegetales.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Salci T, Negri M, Abadio A, Svidzinski T, Kioshima É. Targeting *Candida* spp. to develop antifungal agents. *Drug Discov Today*. 2018; 23(4): 802-14.
2. Ericsson J, Chryssanthou E, Klingspor L, Johansson AG, Ljungman P, Svensson E, et al. Candidaemia in Sweden: a nationwide prospective observational survey. *ClinMicrobiol Infect* 2013;19: E218-21.
3. Schuster MG, Meibohm A, Lloyd L, Strom B. Risk factors and outcomes of *Candida krusei* bloodstream infection: a matched, case-control study. *J Infect* 2013; 66: 278-84.
4. Moghnieh R, Alothman A, Althaqafi A, Matar M, Alenazi T, Farahat F, et al. Epidemiology and outcome of invasive fungal infections and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pneumonia and complicated skin and soft tissue infections (cSSTI) in Lebanon and Saudi Arabia. *J Infect Public Health*. 2017; 10(6): 849-54.
5. Rodriguez L, Bustamante B, Huaroto L, Agurto C, Illescas R, Ramirez R, et al. A multi-centric Study of *Candida* bloodstream infection in Lima-Callao, Peru: species distribution, antifungal resistance and clinical outcomes. *PLoS One*. 2017; 12(4): e0175172.
6. Wu Y, OuYang Q, Tao N. Plasma membrane damage contributes to antifungal activity of citronellal against *Penicillium digitatum*. *J Food Sci Technol*. 2016; 53(10): 3853-8.

7. Hirota K, Yumoto H, Sapaar B, Matsuo T, Ichikawa T, Miyake Y. Pathogenic factors in *Candida* biofilm-related infectious diseases. *Journal of Applied Microbiology*. 2016;122:321-330.
8. Costa C, Sardi J, Pitangui N, De Oliveir H, Scorzoni L, Galeane M, et al. Fungal biofilms and polymicrobial diseases. *J Fungi*. 2017; 3(2): 22.
9. Sardi J, Pitangui N, Rodriguez G, Taylor M, Fusco A, Mendes M. Highlights in pathogenic fungal biofilms *Rev IberoamMicol*. 2014; 31: 22-9.
10. Rajendran R, Sherry L, Nile C, Sherriff A, Johnson E, Hanson M, et al. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candidaalbicans* bloodstream infection-Scotland, 2012-2013. *ClinMicrobiol Infect*. 2016; 22(1): 87-93.
11. Silva S, Rodrigues C, Araújo D, Rodrigues M, Henriques M. *Candida* Species Biofilms' Antifungal Resistance. *J Fungi (Basel)*. 2017; 3(1): 1-17.
12. Pierce C, Vila T, Romo J, Montelongo D, Wall G, Ramasubramanian A, et al. The *Candidaalbicans* Biofilm Matrix: Composition, Structure and Function. *J Fungi (Basel)*. 2017; 3(1): 1-14.
13. Bouzid D, Merzouki S, Bachiri M, Ailane S, Zerroug M. Vitamin D3 a new drug against *Candidaalbicans*. *J Mycol Med*. 2017; 27(1): 79-82.

14. Ng S, Yap Y, Cheong J, Ng F, Lau Q, Barkham T, et al. Antifungal peptides: a potential new class of antifungals for treating vulvovaginal candidiasis caused by fluconazole-resistant *Candida albicans*. *J Pept Sci*. 2017; 23(3): 215-21.
15. Dagli N, Dagli R, Mahmoud R, Baroudi K. Essential oils, their therapeutic properties, and implication in dentistry: A review. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015; 5(5): 335-40.
16. Crkvenčić M, Dudaš S, Jerković I, Marijanović Z, Poljuha D, Pilepić K. Essential Oil Composition of Three *Globularia* Species. *Chem Biodivers*. 2016; 13(2): 219-23.
17. Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils—Present Status and Future Perspectives. *Medicines* 2017; 4(1): 58.
18. Vishnu Agarwal V., Lal P., Pruthi V. Effect of plant oils on *Candida albicans*. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 2010;43:447–451.
19. Mertas A, Garbusińska A, Szliszka E, Jureczko A, Kowalska M, Król W. The influence of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) on fluconazole activity against fluconazole-resistant *Candida albicans* strains. *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 590470.
20. Ramage G, Milligan S, Lappin DF, Sherry L, Sweeney P, Williams C, et al. Antifungal, cytotoxic, and immunomodulatory properties of tea tree oil and its derivative components: potential role in management of oral candidosis in cancer patients. *Front Microbiol*. 2012; 3: 220.

21. Khan A, Ahmad A2, Xess I, Khan L, Manzoor N. *Ocimumsanctum* essential oil inhibits virulence attributes in *Candidaalbicans*. *Phytomedicine*. 2014; 21(4): 448-52.
22. Mansourian A, Boojarpour N, Ashnagar S, MomenBeitollahi J, Shamshiri A. The comparative study of antifungal activity of *Syzygiumaromaticum*, *Punicagranatum* and nystatin on *Candidaalbicans*; an in vitro study. *J Mycol Med*. 2014; 24(4): e163-8.
23. Gonzáles MV. Conservación de mora, uvilla y frutilla mediante la utilización del aceite esencial de canela (*Cinnamomumzeylanicum*). [Tesis]. Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias, Escuela de Bioquímica y Farmacia; 2010.
24. Ranasinghe P, Pigera S, Premakumara GA, Galappaththy P, Constantine GR, Katulanda P. Medicinal properties of 'true' cinnamon (*Cinnamomumzeylanicum*): a systematic review. *BMC ComplementAlternMed*. 2013; 13: 275.
25. Montero M, Revelo J, Avilés D, Valle E, Guevara D. Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de Canela (*Cinnamomumzeylanicum*) sobre Cepas de Salmonella. *Rev. investig. vet*. 2017; 28(4): 987-93.
26. Rao P, Gan S. Cinnamon: A multifaceted medicinal plant. *Evid. Based Complement. Alternat. Med*. 2014; 2014: 642942.

27. Melo A, Amaral A, Schaefer G1, Luciano F, de Andrade C, Costa L, et al. Antimicrobial effect against different bacterial strains and bacterial adaptation to essential oils used as feed additives. *Can J Vet Res.* 2015; 79(4): 285-9.
28. Han X, Parker T. Antiinflammatory Activity of Cinnamon (*Cinnamomumzeylanicum*) Bark Essential Oil in a Human Skin Disease Model. *Phytother Res.* 2017; 31(7): 1034-8.
29. Cheng D, Kuhn P, Poulev A, Rojo L, Lila MA, Raskin I. In vivo and in vitro antidiabetic effects of aqueous cinnamon extract and cinnamon polyphenol-enhanced food matrix. *Food Chem.* 2012; 135(4): 2994-3002.
30. Wu H, Horng C, Lee Y, Chen P, Lin C, Liao C, et al. *Cinnamomumcassia* Extracts Suppress Human Lung Cancer Cells Invasion by Reducing u-PA/MMP Expression through the FAK to ERK Pathways. *Int J Med Sci.* 2018; 15(2): 115-23.
31. Ghosh T, Basu K, Adhikari D, Roy D, Kumar Pal A. Antioxidant activity and structural features of *Cinnamomum zeylanicum*. *3 Biotech* (2015) 5:939–947.
32. Pires R, Montanari L, Martins C, Zaia J, Almeida A, Matsumoto M, et al. Anticandidal efficacy of cinnamon oil against planktonic and biofilm cultures of *Candidaparapsilosis* and *Candidaorthopsilosis*. *Mycopathologia.* 2011; 172(6): 453-64.

33. Serra E, Hidalgo L, Verran J, Williams D, Malic S. Antifungal Activity of Commercial Essential Oils and Biocides against *Candida albicans*. *Pathogens* 2018; 7(1): 15-27.
34. Farisa S, Rubini D, Shanmugavelan P, Murugan R, Gowrishankar S, Karutha S, et al. Effects of patchouli and cinnamon essential oils on biofilm and hyphae formation by *Candida* species. *J Mycol Med*. 2018; X(X): 1-8.
35. Vaca Bautista B. Efecto antimicótico de la asociación de *Cinnamomum zeylanicum* y fluconazol sobre *Cándida albicans* [tesis en internet]. [Tujillo]: Universidad Nacional de Trujillo; 2017 [citado 15 julio 2019]. Recuperado a partir de: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/9507>.
36. Hernández R, Fernández C, Baptista M. Metodología de la investigación. México: interamericana ediciones; 2014. 145p.
37. González A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. Universidad Nacional de Colombia Sede Manizales, departamento de Ingeniería Química. Abril- 2004.
38. Bandoni, A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Edit. UNLP-CYTED. Bs. As.; 2000.

39. Martínez Y. Evaluación de un bioensayo para medir la inhibición de biopelículas bacterianas como indicativo de la actividad *antifouling* de compuestos de origen natural. Tesis presentada para recibir el Título de Magister en Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Colombia, 2010.
40. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Seúl, Corea 2008.
41. Ley que establece los Derechos de las personas usuarias de los servicios de la salud Ley N° 29414. Perú 2009.
42. Colegio Médico del Perú. Código de ética y deontología. Lima, 2007.
43. Espinosa E. Actividad antibiofilm de los extractos de plantas *Urtica dioica* L, *Ilex guayusa* y *Uncaria tomentosa* en *Staphylococcus aureus*. Informe de investigación para optar el Título de Licenciada en Laboratorio Clínico. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Ambato, Ecuador, 2019.
44. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence* 2018; 9(1):522-554.

45. Zambrano M, Suárez L. Biofilms bacterianos: sus implicancias en salud y enfermedad. *Univ Odontol* 2016; 25(57):19-25.
46. Nosedá D. Biofilm como forma de vida de *Bordetella pertussis* en su hospedador. Diferencias fenotípicas y en la capacidad de adhesión y formación de biofilm entre cepas de referencia y aislados clínicos. Identificación de moléculas Quórum Sensing. Tesis Doctoral, Universidad de La Plata, Argentina, 2011.
47. Rangel M, de Aquino S, de Lima J, Castellano L, 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* 2018, Art ID 4045013.
48. Chatrath A, Gangwar R, Kumari P, Prasad R. In vitro anti-biofilm activities of citral and thymol against *Candida tropicalis*. *Journal of fungi* 2019; 5:13.
49. Nazzaro F, Fratianni F, Coppola R, De Feo V. Essential oils and antifungal activity. *Farmaceutical* 2017; 10:86.
50. Cortés JA, Russi JA. Equinocandinas. *Rev Chil Infect* 2011; 28(6): 529-536.
51. Bouza E, Guinrea J, Guembe M. The role of antifungals against *Candida* biofilm in catheter-related candidemia. *Antibiotics* 2015; 4:1-17.

52. Marioni J, Arce J, Cabrera J, Paraje M, Nuñez S. Reduction of *Candidatropicalis* biofilm by photoactivation. *Pharmaceutical Biology* 2016; 54(12):2791-2801.
53. Marioni J, Bresolí-Obach; Agut M, Comini L, Cabrera J, Paraje M, Nonell S, Núñez S. On the mechanism of *Candidatropicalis* biofilm reduction by the combined action of naturally-occurring. *Plos One*, 2017.
54. Silva S, Henriques M, Martin A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candidaalbicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol* 2009; 47(7):681-689.
55. Bizerra F, Nakamura C, de Poersch C, Estivalet T, Borsato R, Goldenberg S, Krieger M, Yamada-Ogatta S. Characteristics of formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res* 2008; 8:442-450.
56. Al-Fattani M, Douglas J. Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance. *Journal of Medical Microbiology* 2006; 55:999-1008.
57. Nett J. Future directions for antibiofilm therapeutics targeting *Candida*. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2014; 12(3):375-382.
58. Melo AS, Bizerra FC, Freymüller E, Arthington-Skaggs BA, Colombo AL. Biofilm production and evaluation antifungal susceptibility amongst clinical *Candidaspp*

isolates including strains of the *Candida parapsilopsis* complex. Med Mycol 2011;  
49:253-262.

## VIII. ANEXOS

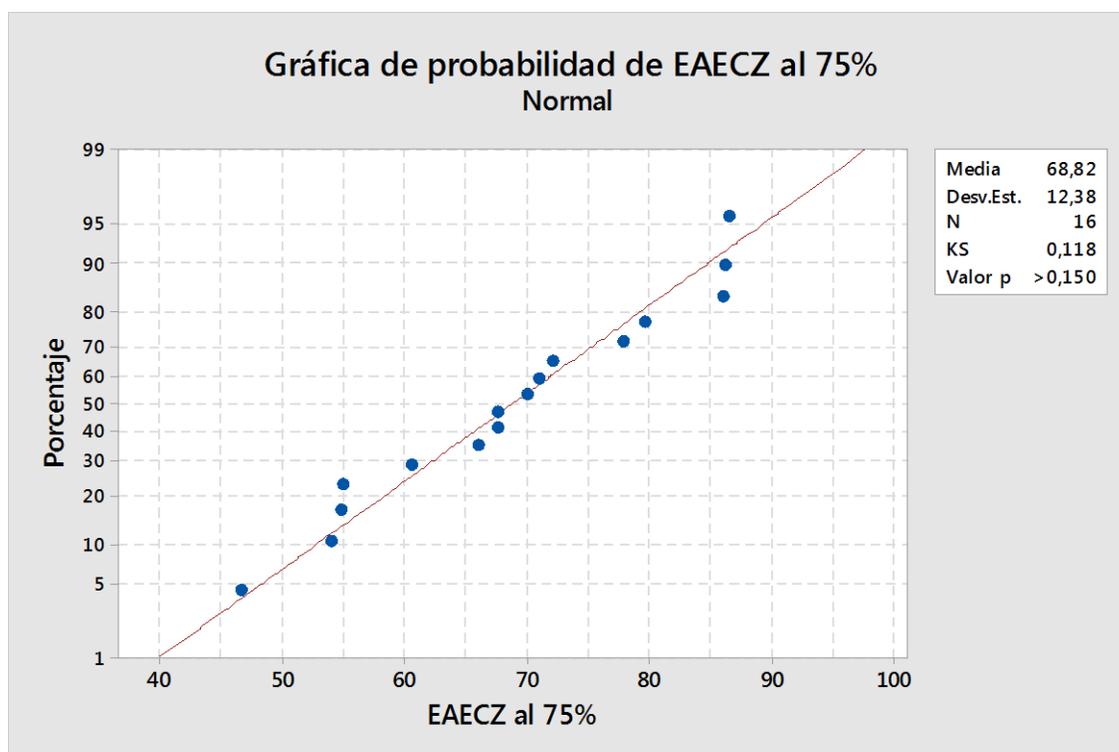
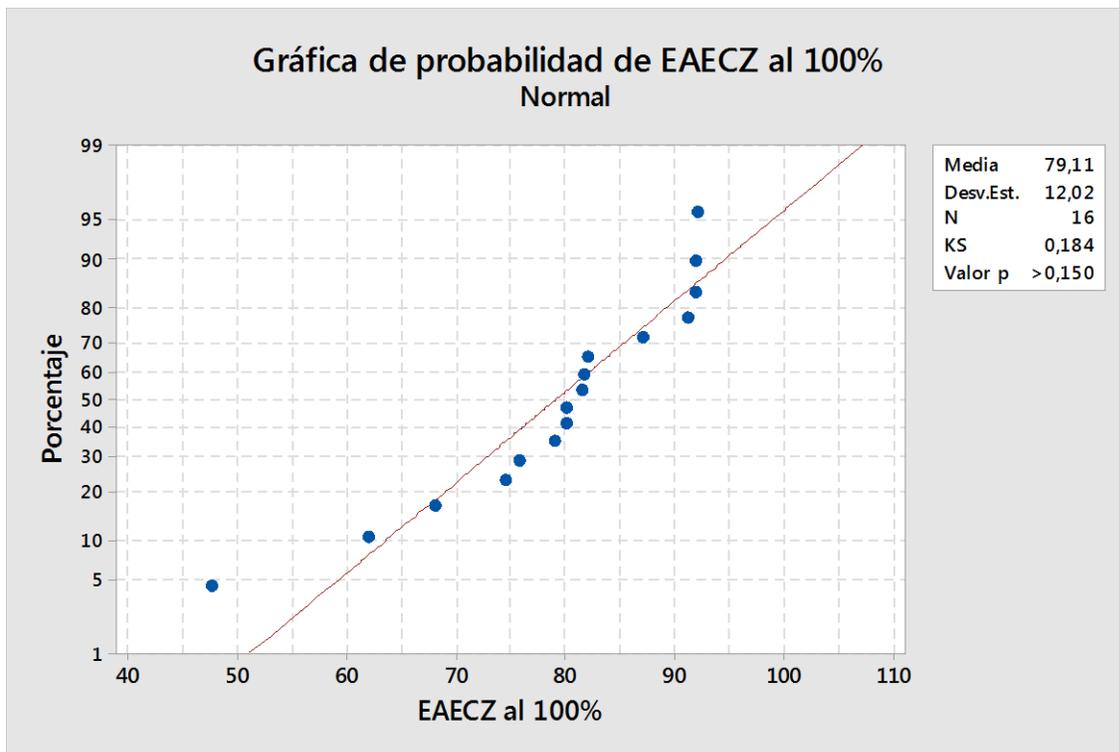
### Anexo 1: HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

OBSERVACION	ACEITE ESENCIAL DE CANELA				FLUCONAZOL Control positivo
	100%	75%	50%	25%	
1	68%	65,70	58,50%	56,70%	23,24%
2	81,94%	70,78%	17,19%	2,25%	1,50%
3	79,66%	70,38%	65,63%	60,64%	18,66%
4	62,32%	55%	19,80%	19%	15,60%
5	87,20%	85,71%	80,70%	80,35%	56,10%
6	91,09%	79,6%	74,3%	49,5%	57,7%
7	79%%	72,1%	65,7%	63,8%	27,7%
8	91,9%	77,8%	67,7%	60,7%	27%
9	92,1%	86,2%	81,9%	80%	71,6%
10	91,8%	86,4%	79,4%	75,2%	62%
11	47,5%	46,6%	41,8%	28,2%	11,1%
12	81,6%	60,6%	58%	32,2%	7,1%
13	74,5%	54,8%	53,3%	14,1%	9,6%
14	75,8%	54%	48,1%	36,9%	8,4%
15	80%	67,5%	55,5%	53,8%	4%
16	81,4%	67,5%	62,8%	52,7%	1,5%

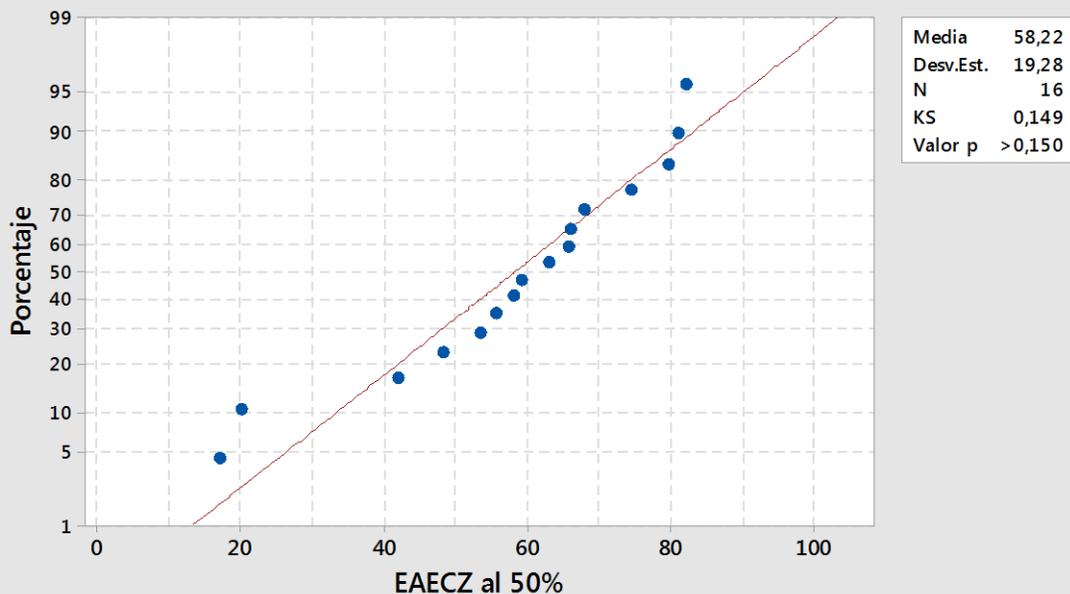
## ANEXO 2: ANALISIS ESTADISTICO

### LA PRUEBA DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS: KOLMOGÓROV-SMIRNOV

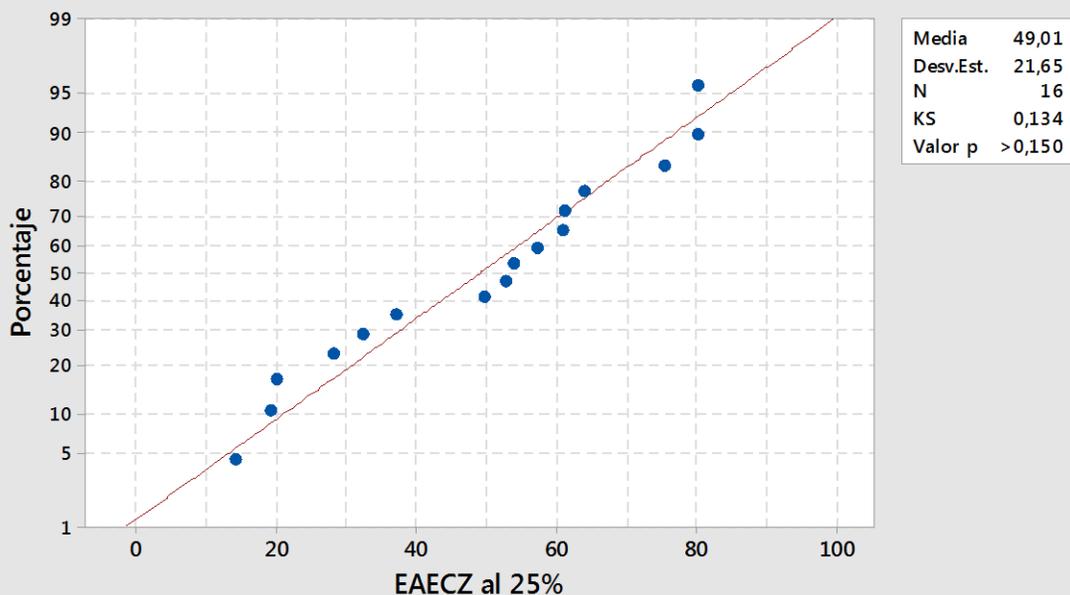
Leyenda: EAECZ: Extracto de aceite esencial de *cinnamomum zeylanicum*

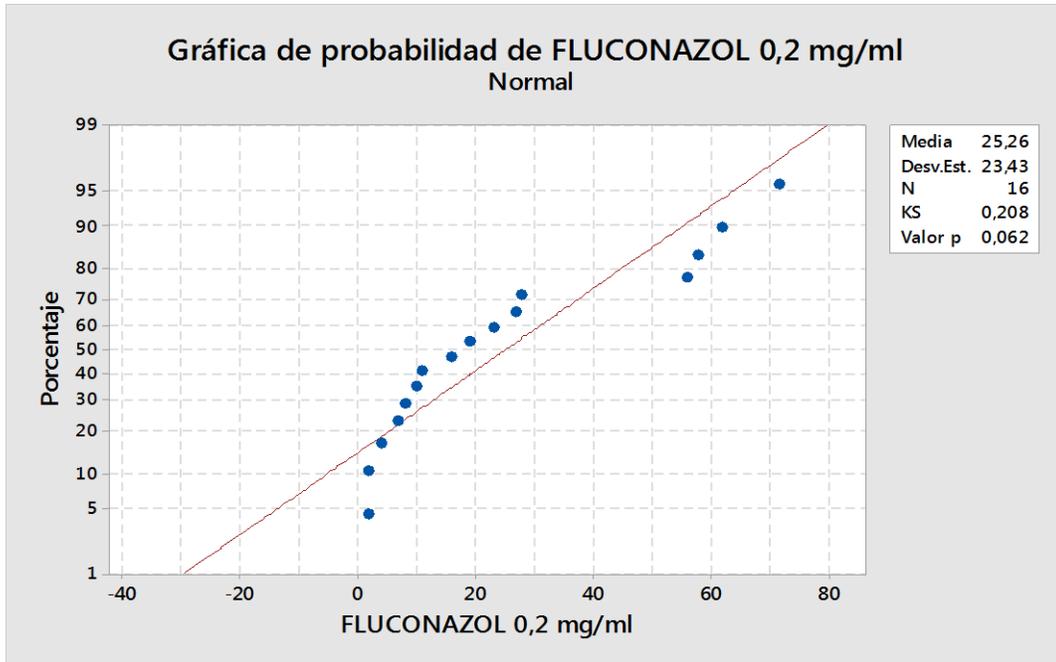


Gráfica de probabilidad de EAECZ al 50%  
Normal



Gráfica de probabilidad de EAECZ al 25%  
Normal





**ANOVA**

		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
EAECZ100	Entre grupos	2134,438	15	142,296	.	P<0.05
	Dentro de grupos	,000	0	.		
	Total	2134,438	15			
EAECZ75	Entre grupos	2258,938	15	150,596	.	P<0.05
	Dentro de grupos	,000	0	.		
	Total	2258,938	15			
EAECZ50	Entre grupos	5565,000	15	371,000	.	P<0.05
	Dentro de grupos	,000	0	.		
	Total	5565,000	15			
EAECZ25	Entre grupos	7056,938	15	470,463	.	P<0.05
	Dentro de grupos	,000	0	.		
	Total	7056,938	15			
FLUCONAZOL	Entre grupos	8293,438	15	552,896	.	P<0.05
	Dentro de grupos	,000	0	.		
	Total	8293,438	15			

### Estadísticas de muestras emparejadas

		Media	N	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
Par 1	FLUCONAZOL	25,31	16	23,514	5,878
	EAECZ100	79,19	16	11,929	2,982

### Prueba de muestras emparejadas

		Diferencias emparejadas							
		Media	Desv. Desviación n	Desv. Error promedio	95% de intervalo de confianza de la diferencia		t	gl	Sig. (bilateral)
					Inferior	Superior			
Par 1	FLUCONAZOL - EAECZ100	- 53,875	19,761	4,940	-64,405	-43,345	- 10,905	15	P<0.05

### Estadísticas de muestras emparejadas

		Media	N	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
Par 1	FLUCONAZOL	25,31	16	23,514	5,878
	EAECZ75	68,94	16	12,272	3,068

### Prueba de muestras emparejadas

		Diferencias emparejadas							
		Media	Desv. Desviación n	Desv. Error promedio	95% de intervalo de confianza de la diferencia		t	gl	Sig. (bilateral)
					Inferior	Superior			

Par 1	FLUCONAZOL - EAECZ75	-43,625	15,874	3,968	-52,084	-35,166	-10,993	15	P<0.05
-------	----------------------	---------	--------	-------	---------	---------	---------	----	--------

### Estadísticas de muestras emparejadas

		Media	N	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
Par 1	FLUCONAZOL	25,31	16	23,514	5,878
	EAECZ50	58,25	16	19,261	4,815

### Prueba de muestras emparejadas

		Diferencias emparejadas							
		Media	Desv. Desviación n	Desv. Error promedio	95% de intervalo de confianza de la diferencia		t	gl	Sig. (bilateral)
					Inferior	Superior			
Par 1	FLUCONAZOL - EAECZ50	-32,938	16,771	4,193	-41,874	-24,001	-7,856	15	P<0.05

### Estadísticas de muestras emparejadas

		Media	N	Desv. Desviación	Desv. Error promedio
Par 1	FLUCONAZOL	25,31	16	23,514	5,878
	EAECZ25	49,06	16	21,690	5,423

### Prueba de muestras emparejadas

Par		Media	Diferencias emparejadas			t	gl	Sig. (bilateral)	
			Desv. Desviació n	Desv. Error promedio	95% de intervalo de confianza de la diferencia				
					Inferior	Superior			
1	FLUCONAZOL - EAECZ25	- 23,750	17,176	4,294	-32,902	-14,598	-5,531	15	P<0.05

Anexo 3: registro fotográfico:

OBTENCIÓN DE LAS CONCENTRACIONES DEL ACEITE ESENCIAL de *Cinnamomum zeylanicum*



Figura 1: Proceso de selección de *Cinnamomum zeylanicum* y obtención en trozos pequeños



Figura 2: colocación de *Cinnamomun zeylanicum* para destilación por arrastre en vapor.



Figura 3: aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* a las concentraciones de 25%, 50%, 75%, 100%, cepas de *Candida tropicalis* y fluconazol.

**METODO REALIZADO PARA OBSERVAR EL EFECTO ANTIBIOFILM DE ACEITE ESENCIAL DE *Cinnamomum zeylanicum* SOBRE *Cándida tropicalis*.**



Figura 4: siembra de *Cándida tropicalis* en agar saboraud para obtener colonias jóvenes.



Figura 5: 16 repeticiones por cada conentración de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (2ml) + *Cándida tropicalis* + solución salina, incubará por 48 h.



Figura 6: retiro de aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* y colocación de cristal violeta.



Figura 7: lectura en espectrofotometro

**ANEXO 4: CONSTANCIA DE ADQUISICION de *Candida tropicalis* ATCC 1369**



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> <i>Candida tropicalis</i> <b>Catalog Number:</b> 01036 <b>Lot Number:</b> 1036-11 <b>Reference Number:</b> ATCC® 1369™* <b>Purity:</b> Pure <b>Passage from Reference:</b> 3	<b>Expiration Date:</b> 2019/8/31 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Christine Condon <b>Release Date:</b> 2017/11/1
---	---

<b>Macroscopic Features:</b> Medium, circular, convex, entire edge, cream-white, smooth, and waxy in appearance. <b>Microscopic Features:</b> Gram positive ellipsoidal to ovoid yeast cells. Pseudohyphae may be present.	<b>Performance</b> <b>Medium:</b> Nutrient <b>Method:</b> Gram Stain (1)
---	--

**ID System:** MALDI-TOF  
 See attached ID System results document.

Amanda Kuperus  
 Quality Control Manager  
 AUTHORIZED SIGNATURE

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(\*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



**Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results**



**Meaning of Score Values**

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

**Meaning of Consistency Categories (A - C)**

Category	Interpretation
(A)	<b>High consistency:</b> The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	<b>Low consistency:</b> The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	<b>No consistency:</b> The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: Candida tropicalis  
 Sample Description: 01036  
 Sample ID: 1036-11  
 Sample Creation Date/Time: 2017-10-25T13:31:37.916KN  
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
F9 (+++)(A)	1036-11	Candida tropicalis	2.27

Comments:

N/A

## ANEXO 5: CONSTANCIA DE OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE CINNAMOMUM ZEYLANICUM “CANELA”

Trujillo, 12 de enero de 2019

### CONSTANCIA

Mediante la presente, dejo **CONSTANCIA** que la alumna **LILIANA ROSMERI DE LA CRUZ GÓMEZ**, identificado con DNI 47113138, de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Privada Antenor Orrego, bajo mi asesoría ha realizado las actividades de extracción del aceite esencial, en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de La Universidad Nacional de Trujillo. Asimismo, este aceite esencial fue utilizado para los respectivos ensayos microbiológicos de la tesis titulada: “Efecto antibiofilm del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* sobre *Candida tropicalis*”.

Atentamente.



  
Dra. Marilú Roxana Soto Vásquez  
Docente de Facultad de Farmacia y Bioquímica