



Universidad Nacional

Federico Villarreal

Vicerrectorado de

INVESTIGACIÓN

Facultad de Odontología

EFFECTIVIDAD ANTIFÚNGICA IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Cinnamomum zeylanicum* (CANELA) VERSUS NISTATINA SOBRE CEPA DE *Candida albicans* ATCC

10231

Tesis para optar el título profesional de Cirujano Dentista

AUTOR

Hurtado Escobedo, René Alexander

ASESOR

Mg. Peltroche Adrianzen, Nimia Olimpia

JURADO

Dr. Portal Bustamante, Neme

Mg. Escudero Reyna, Raúl Uldarico

Dr. Sotomayor Mancicidor, Oscar Vicente

Dr. Oliva Chuman, José Gilberto

Lima - Perú

2019

AGRADECIMIENTO

- A mi asesor principal, Dra. Peltroche Adrianzen, Nimia Olimpia, por su tiempo brindado en la preparación y realización del presente trabajo de investigación.
- A mis asesores secundarios, Dr. Mendoza Murillo, Paúl Orestes y Dr. Gabrielli Alfaro, Enrique, por su dedicación, consejos y disponibilidad absoluta en la culminación de este trabajo de investigación.

DEDICATORIA

- A Dios, por ser mi guía y apoyo incondicional en mi vida.
- A mis padres, Joaquín René Donato Hurtado Salas y Rosa Elva Escobedo Rodríguez, por su apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida, por confiar en mí y motivarme con el ejemplo.
- A mi hermana Rosa Ericka Milushka, por su ejemplo, solidaridad y amor.
- Y a todas aquellas personas que contribuyeron en la realización del presente estudio.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo comparar la EA in vitro del AECZ al 25%, 50%, 75% y 100% versus Nistatina sobre cepa de CA ATCC 10231. El tipo de estudio fue experimental, in vitro, prospectivo y longitudinal, teniendo como muestra de estudio 15 placas Petri llevadas a cabo en el laboratorio de Microbiología UNFV. Se consiguió el aceite mediante la destilación por arrastre de vapor de agua, lo cual consiste que el vapor por presión ingresa en conexión con las células de las plantas y las rompe liberando la esencia y atrapándola en goticas de agua, y se utilizó material biológico: cepa de CA aislada ATCC 10231. El EA del AE se obtuvo por el método de Kirby Bauer (difusión en disco). Se halló que en el lapso de tiempo de 24 a 48 horas el aceite esencial de canela al 100% presenta mayor media de halo inhibitorio (22.1 mm y 31.22 mm respectivamente), y la nistatina presentó menor halo inhibitorio (15.11 mm y 19.90 mm respectivamente). El AECZ al 25% presentó crecimiento del halo inhibitorio constante a las 48 horas, superando estadísticamente a la nistatina. Se concluye que la mayor efectividad antifúngica se encontró en la concentración del 100% de AECZ.

Palabras clave: Aceite esencial de canela, nistatina, efectividad antifúngica, candida albicans.

ABSTRACT

The objective of the present study was to compare the in vitro EA of the AECZ at 25%, 50%, 75% and 100% versus Nystatin on CA strain ATCC 10231. The type of study was experimental, in-vitro, prospective and longitudinal, taking as a study sample 15 Petri dishes carried out in the laboratory of Microbiology UNFV. The oil was obtained by steam distillation of water, which consists of the pressure steam entering in connection with the cells of the plants and breaking them releasing the essence and trapping it in gums of water, and biological material was used: AC strain isolated ATCC 10231. The EA of the EA was obtained by the Kirby Bauer method (disk diffusion). It was found that in the period of 24 to 48 hours the essential oil of cinnamon at 100% had a higher average of inhibitory halo (22.1 mm and 31.22 mm respectively), and nystatin presented lower inhibitory halo (15.11 mm and 19.90 respectively) . The AECZ at 25% presented constant inhibitory halo growth at 48 hours, statistically surpassing nystatin. It is concluded that the highest antifungal effectiveness was found in the 100% concentration of AECZ.

Keywords: Cinnamon essential oil, nystatin, antifungal effectiveness, candida albicans.

ÍNDICE

I.- Introducción	1
II.- Marco Teórico.....	3
2.1 Bases teóricas	3
2.2 Antecedentes	15
2.3 Justificación de la Investigación	17
2.4 Hipótesis.....	18
III.- Objetivos.....	19
3.1 Objetivo General	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
IV.- Materiales y método	20
4.1.- Tipo de Estudio.....	20
4.2.- Población/Muestra/Criterios de Selección.....	20
4.3.- Variables/Definición/Operacionalización.....	21
4.4.- Método/Técnica/Procedimientos	23
4.5 Consideraciones Éticas.....	25
4.6 Plan de Análisis.....	25
V.- Resultados.....	26
VI.- Discusión	34
VII.- Conclusiones	36
VIII.- Recomendaciones	37
IX.- Referencias bibliográficas	38

X.- Anexos	43
Anexo 1. Carta presentación para laboratorio experimental.	43
Anexo 2. Ficha de recolección de datos para medir el tamaño de los halos de inhibición en (mm) sobre: <i>Candida albicans</i>	44
Anexo 3. Fotografías de la obtención del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> “canela”.	45
Anexo 4. Fotografías de la obtención de la muestra microbiológica.	46
Anexo 4. Fotografías de la obtención de la muestra microbiológica.	47
Anexo 5. Fotografías del método difusión en disco con el aceite esencial de canela.	48
Anexo 6. Fotografías de evaluación del efecto antifúngico del aceite esencial de canela frente a cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	49
Anexo 7. Fotografías de evaluación del efecto antifúngico de la nistatina frente a cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	50
Anexo 8. Matriz de consistencia	51
Anexo 9. Pruebas paramétricas.	52

I.- Introducción

La cavidad bucal, presenta múltiples afecciones como infecciones bacterianas, virales, parasitarias o micóticas. De estas últimas, la candidiasis es la principal especie asociada con la micosis bucal. Hoy en día su incidencia está en aumento en los países más avanzados debido a diferentes factores predisponentes perjudiciales para los seres humanos (Aguirre, 2002).

Los microorganismo oportunistas como los hongos del género *Candida* encuentran un ambiente favorable en la cavidad bucal, considerado que cuatro de cada mil pacientes que acuden a una consulta odontológica presentan síntomas de infección candidiásica (Pérez, Cosetti y Crestanello, 2004).

La aplicación de la medicina natural ha dado excelentes resultados con nuestros ancestros, pero hoy en día se ve ignorada y sustituida por productos sintéticos, por falta de experimentación e investigación de las propiedades que poseen diversas plantas medicinales siendo desaprovechadas y reducida su utilidad en boca (García, 2016).

La utilización de sustancias medicinales como los aceites es una aplicación que actualmente vive un nuevo impulso. La gran variedad de plantas medicinales han demostrado empíricamente y metodológicamente su efectividad de naturaleza antimicrobiana diversa. El *Cinnamomun zeylanicum* (canela) ha mostrado efectos sobre una serie de bacterias (García, 2016).

Ante la incidencia de la candidiasis bucal, existe la necesidad inmediata de trabajar en la prevención y tratamiento, por ello debemos tener alternativas terapéuticas con efectos eficaces y seguros como se les atribuye a las plantas medicinales; se indica el uso del AECZ como agente antifúngico como alternativa natural, cuya obtención es económica, útil para la comunidad, la salud, pudiendo presentar menores efectos secundarios y además para que sirva de precursor para estudios posteriores.

En resumen, nos formulamos la siguiente pregunta:

¿Cuál es la efectividad antifúngica in vitro del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) al 25%, 50%, 75% y 100% versus Nistatina sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 10231?

II.- Marco Teórico

2.1 Bases teóricas

Los beneficios de las hierbas terapéuticas para motivos curativos, son una manera que se usa desde épocas remotas. Los remedios naturales, y en especial las plantas medicinales, fueron el primordial e incluso el único recurso de que disponían los médicos (Echegaray, Echegaray, Mosquera y Gerrikaetxebarria, 2011).

Se define a la Fitoterapia como la ciencia que estudia la beneficiación de los productos de origen vegetal con un propósito rehabilitador, sea este para prevención, mitigar o sanar una condición patológica. O es la intervención para recuperar la salud mediante el aprovechamiento de hierbas con propiedades medicinales o sus derivados (Hernández, 2005).

Son una combinación compleja de sustancias volátiles, elaborado del metabolismo secundario de las plantas, que se encuentra integra en la planta, de manera no uniforme, solo en unas de sus partes, por ejemplo, en flores, semillas, corteza, madera, raíces o rizomas, pero más frecuente en hojas y tallos; obtenidas de las plantas mediante arrastre con vapor, destilación con agua de vapor e hidrodestilación del material vegetal (Stashenko, 2009).

Los aceites esenciales (AE) padecen degeneración química en presencia de la luz solar, el aire, el calor, los ácidos y álcalis fuertes, produciendo oligómeros de naturaleza indeterminada. Son soluble en los disolventes orgánicos comunes y casi inmiscibles en disolventes polares asociados (agua, amoníaco) (Vega y López, 2009).

Están elaborados en su mayoría por: hidrocarburos terpénicos o terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos) y sus derivados oxigenados (alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, éteres y fenoles), que en conjunto se llaman terpenoides (Stashenko, 2009).

Pertenece a la familia de las *Lauraceae*. Su nombre científico “*Cinnamomum zeylanicum*” (CZ). Nombre común canela, que es un vocablo de origen francés Canne (que significa caño o tubo) que en diminutivo se pronuncia cannelle (Sánchez, 2013).

La palabra *Cinnamomum* procede de la raíz griega *kinnamon* o *kinnamomom*, que significa madera dulce, este término posiblemente tiene origen semítico del hebreo *quinamom*, es originario de la India aunque se siembra primordialmente en Sri Lanka, antigua Ceilán. También se siembra en otras islas del océano Índico como Madagascar o las islas Seychelles dando lugar a distintos tipos (Sánchez, 2013).

Árbol pequeño, de hasta unos 8 o 18 metros de altura, posee hojas opuestas, coriáceas, ovaladas, con tres (raramente cinco) nervios prominentes. Al inicio las hojas son de color rojizo adquiriendo color verde oscuro al madurar. Las flores son pequeñas, de color amarillo pálido. Los frutos son drupas ovoides con una semilla (Krapp y Longe, 2006).

Su corteza es gruesa y rugosa, en forma de canuto enrollados debido a la presencia de su parénquima cortical de un anillo de células pétreas que cuando la corteza se deseca origina un plegamiento hacia el interior de la misma. También es frecuente su presentación en forma pulverizada (Krapp y Longe, 2006).

Requiere un clima tropical húmedo cuya temperatura no sea inferior a 25 °C y con una precipitación pluvial de unos a dos metros anuales; puede prosperar bien cerca del nivel del mar hasta unos 500 metros en terrenos de aluvión. En el Perú lo encontramos en la región Amazónica (Bussmann y Sharon, 2005).

Pertenece al Reino, Plantae; División, Magnoliophyta; Clase, Magnoliopsida; Orden, Laurales; Familia, *Lauraceae*; Género, *Cinnamomum*; Especie, *C.zeylanicum* (González, 2010).

Compuesto principalmente por aldehídos aromáticos entre los que destacan: aldehído cinámico (60-75%), eugenol (10%, y en sus hojas en un 80%), hidroxicinamaldehído, benzaldehído y cuminaldeído; tranzas de carburos terpénicos (alfa-pineno, alfatерpineno, alfa-ylangeno, beta-pineno camfeno, cariofileno, limoneno, linalol) y de metilamilcetona; glúcidos, mucílagos, taninos y trazas de cumarinas, etc (García, 2016).

Comprende más de 250 especies de árboles y arbustos, conocidos como caneleros. Las más empleadas son *Cinnamomun zeylanicum* (*C. verum*) llamado canelero de Ceilán y *C. cassia* (*C. aromaticum*) o canelero de China (Sánchez y Lujan, 2013).

Es una sustancia común en muchos productos, como la pasta de dientes, los enjuagues bucales, perfume, jabón, lápices de labios, chicle, jarabes para la tos, vaporizadores nasales y bebidas. Se emplea como remedio para náuseas, vómitos, diarrea, úlceras de estómago, indigestión, pirosis, falta de apetito y trastornos abdominales (Krapp y Longe, 2006).

Tintura estomacal.- Colocar 50g de corteza de canela en 250 cm³ de alcohol a 60°, durante un día. Filtrar, pasar a una botella de vidrio y tomar en cucharadas, antes de las comidas (Itzik, 2005).

Infusión antigripal.- Echar 5g de corteza de canela, 5g de eucalipto y 10g de orozuz en una taza de agua hirviendo. Dejar 10 minutos en infusión. Filtrar, endulzar con miel y beber (Itzik, 2005).

Puede provocar reacciones alérgicas en algunas personas. No se recomienda en mujeres embarazadas o que den el pecho. Considerado también uno de los más peligrosos y no debe emplearse sobre la piel. No debe administrarse en niños menores de dos años. Y se considera tóxica si se toma en exceso (Krapp y Longe, 2006).

Se realiza con un vapor seco sobrecalentado, que penetra en el material vegetal a presión más alta que la atmosférica, la corriente de vapor rompe las células o canales oleíferos en la planta y arrastra la mezcla volátil, que se condensa luego de atravesar un refrigerante (Olaya, 2003).

El aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (AECZ) es un líquido amarillento o parduzco que se oscurece y espesa con el tiempo o por exposición prolongada al aire. Su olor y sabor son característicos. Es poco soluble con el agua y muy soluble en alcohol y en ácido acético glacial (González, 2010).

Contiene como componente principal 60-75% de cinamaldehído, carácter aromático y características antimicrobianas, y contiene 5% de eugenol, características antibacterianas, las cuales se encuentran presentes en las células de la canela (González, 2010).

Tienen la capacidad de alterar y penetrar en la estructura lipídica de la pared celular perturbando estructuras celulares lo que lleva a la desnaturalización de las proteínas y a la destrucción de la membrana celular, haciéndolas más permeables, lo que conduce a rupturas o fugas citoplásmicas, lisis celular y eventualmente la muerte del microorganismo. Respecto a sus componentes, actúan como agentes que interfieren con la translocación de protones y la fosforilación del ATP (Reyes, Palou y López, 2012).

Tiene propiedades antibacterianas, antisépticas, antivirales, antiespasmódicas y antimicóticas, y funciona como protector estomacal. Es recomendable **en el tratamiento de** tratamiento de diabetes, gripes y resfriados. Un estudio japonés ha desmotrado que el cinamaldehído funciona como sedante y analgésico; el eugenol tiene propiedades analgésicas (Krapp y Longe, 2006).

Son la principal causa de infecciones humana, especialmente entre los huéspedes inmunocomprometidos, que tiene un enorme impacto en la morbilidad y la mortalidad (Jayaprakasha, Jaganmohan y Sakariah, 2002).

Sustancia capaz de provocar una variación de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, cambiando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita la actividad del sistema de defensa del huésped (Gregorí, 2005).

Según criterios convencionales que atienden a su estructura en: polienos, azoles, alilaminas, entre otros; de acuerdo con su origen en sustancias producidas por organismos vivos o derivados de síntesis química; de acuerdo con su espectro de acción en: amplio o restringido y de acuerdo con el sitio de acción (Gregorí, 2005).

Se caracterizan debido a que se unen al ergosterol presente en la membrana celular fúngica, donde se forman poros que transforman la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes, causas de la muerte celular (Gregorí, 2005).

Pertenece a un miembro transcendente de un grupo relativamente grande y compuesto de antibióticos antifúngicos altamente insaturados que se aísla de cultivos de *Streptomyce noursei* (Lescano, Pettigrosso y Llabot, 2014).

Se la incluye dentro del grupo denominado antibióticos antifúngicos de tipo poliénico, para diferenciarla de otros antibióticos con propiedades antifúngicas. Presenta tres formas polimórficas, llamadas Tipo A, Tipo B y Tipo C. Los polimorfos tipo A y B son los más comunes y pueden interconvertirse por efecto de condiciones ambientales (Lescano *et al.*, 2014).

La nistatina se une a los esteroides de la membrana celular fúngica, transforma la permeabilidad de la membrana y permite la pérdida de sus elementos básicos celulares (Vademécum, 2012).

Es un hongo polimórfico debido a que puede presentar morfología levaduriforme o bien, crecer como hongo filamentoso formando hifas verdaderas. Se considera un comensal

oportunista presente en las mucosas de seres vivos de sangre caliente, siendo habitualmente como parte de la microbiota del área mucocutánea, gastrointestinal y genitourinaria, y coloniza las membranas mucosas en el 30 a 60 % de las personas (De la Calle, Santa y Cardona, 2012).

Pertenece al Reino, Fungi; División, Ascomycota; Clase, Ascomycetes; Orden, Saccharomycetales; Familia, *Saccharomycetaceae*; Género, *Cándida*; Especie, *C. albicans* (Laforet, 2009).

El género *Candida* incluye aproximadamente a 154 especies, entre ellas, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. dublinensis*, son frecuentemente aisladas de infecciones en humanos, siendo *Candida albicans* la más relevante en termino de patogenicidad (Laforet, 2009).

Candida albicans (CA) es una infección oportunista fúngica. Además, tiene la capacidad de adherirse a las superficies del huésped o de la prótesis para facilitar la adhesión, la infección y la resistencia a los antimicóticos (Tangarife, Correa, Zapata, Durán, Stanshenko y Mesa, 2011).

Los principales factores de patogenicidad de *Candida albicans* son: switch fenotípico (cambio morfológico entre levadura, formación de hifas y pseudohifas), secreción enzimática, manifestación diferencial de genes en reacción al ambiente, síntesis de adhesinas y su capacidad para formar biofilms (Castrillón, Palma y Padilla, 2005).

Vamos a dividirlos en locales, sistémicos e iatrogénicos (Otero, Peñamaría, Rodríguez, Martín y Blanco, 2015).

Factores predisponentes locales:

- Uso de prótesis removible. Especialmente las prótesis mucosoportadas, muy empleadas en los pacientes de edad avanzada, la simple fisuración del epitelio incluso en prótesis bien adaptadas puede ser suficiente. Las prótesis son un importante reservorio, y eso hace que en entre el 11 y el 77% de las estomatitis protéticas resultan en cultivo positivo. Otra presentación

crónica relacionada con la edad y traumatismo repetidos es la queilitis angular (Otero *et al.*, 2015).

- Modificaciones en la viscosidad de la mucosa. Cuando el epitelio se atrofia, facilita la penetración de la *Candida* y la propia *C. albicans* es capaz de inducir cambios, en especial incrementado la actividad micótica (Otero *et al.*, 2015).
- Alteraciones salivales. La disminución en calidad y cantidad está directamente relacionada con la sobreinfección y de manera muy especial su acidificación (Otero *et al.*, 2015).
- Flora comensal. El papel es dual, así lo demuestran diferentes estudios in vitro (Otero *et al.*, 2015).
- Dieta rica en hidratos de carbono. Aparte del efecto sistémico también actúa a nivel local, su metabolismo ocasiona una reducción del pH local y las concentraciones altas de glucosa aumentan los receptores iC3b en la *C. albicans*, incrementando su resistencia a la fagocitosis (Otero *et al.*, 2015).
- Tabaco. El hábito de fumar puede favorecer la presencia de lesiones en la mucosa que promueve la colonización. El humo implica nutrientes para la *C. albicans*, incluso algunas especies de *Candida* pueden convertir los hidrocarburos aromáticos del humo en metabolitos carcinogénicos (Otero *et al.*, 2015).

Factores predisponentes sistémicos:

- Edad. La candidiasis bucal, especialmente la palatitis candidiásica crónica y la queilitis angular, es una enfermedad frecuente en los ancianos, con una prevalencia de 38% 26% respectivamente ya que son pacientes más polimedicados y con más patología sistémica (Otero *et al.*, 2015).

- Alteraciones endocrinas. Diabetes mellitus es la más relacionada, dato no aceptado por todos los estudiosos. El mecanismo no está claro, la concentración de glucosa, la mejora en la facilidad de adhesión de hongo o el uso asociado de prótesis y tabaco. Hipertiroidismo e hipotiroidismo, así como el embarazo ayuda al crecimiento de la enfermedad. En este último caso, son los cambios hormonales los principales responsables (Otero *et al.*, 2015).
- Alteraciones nutricionales. La anemia ferropénica es la más frecuentemente implicada, pero no todos comparten esta idea, la etiopatogenia puede estar en la afectación que esta deficiencia ocasionada en el epitelio (Otero *et al.*, 2015).
- Alteraciones del sistema inmune. En los pacientes con sida, ancianos o no, es la infección oportunista más frecuente, entre 11% y el 96%. Su aparición está directamente con niveles de CD4. También constituye un hallazgo habitual en determinados síndromes graves de inmunodeficiencia (síndrome de Di George, síndrome de Glanzmann-Riniker). Los cuadros de candidiasis mucocutánea también se relacionan con trastornos inmunológicos y/o endocrinos (Otero *et al.*, 2015).
- Enfermedades sistémicas. Como comentamos anteriormente, la anemia ferropénica se asocia en numerosas ocasiones a candidiasis oral en sus distintas presentaciones clínicas (candidiasis mucocutánea crónica, candidiasis atrófica crónica, glositis atrófica y boqueras). Las formas agudas de candidiasis orales son constantes en pacientes con síndromes mieloproliferativos (Otero *et al.*, 2015).
- Grupos sanguíneos. Es conocida la relación en medio de los grupos sanguíneos y la vulnerabilidad a enfermedades infecciosas, abarcando las infecciones micóticas. El antígeno H funciona como un receptor para *C. albicans*; por ello las personas con grupo O son más susceptibles a la colonización y posterior infección (Otero *et al.*, 2015).

Factores iatrogénicos:

- Tratamiento con antibióticos. El ejemplo más claro es el de la glositis candidiásica atrófica aguda. Puede suceder que, en condiciones normales, existía una competencia entre la *Cándida* y las bacterias por los nutrientes esenciales y/o por los receptores en la superficie de las células epiteliales. Por otro lado algunos antibióticos pueden actuar via sistémica sobre la flora fúngica oral. Antibióticos como la eritromicina, el cotrimoxazol y algunos aminoglucósidos reducen la actividad anticándida de los neutrófilos in vitro, mientras que otros como la penicilina y la tetraciclina aumentan la respuesta inmune frente a la *Cándida*. Así mismo, el empleo desmedido de enjuagues con antibacterianos también puede favorecer la infección oral por hongos (Otero *et al.*, 2015).

- Tratamiento con corticoides. Diversos estudios han descrito que los corticoides de forma sistémica facilita el desarrollo de la *C. albicans*. Sin embargo, al efecto de los corticoides debería añadirse el papel de la enfermedad de base para la cual se administran. La creciente utilización de corticoides vía inhalatoria, muy utilizada en los pacientes mayores, para manejar las formas leves o como coadyuvante en su expresión más grave de asma se acompaña de un aumento de la prevalencia oral de *Candida* y de una mayor predisposición a la infección por esta, pero la incidencia de candidiasis oral debida a esta causa es baja y carece de importancia clínica (Otero *et al.*, 2015).

- Anticonceptivos y terapia sustitutiva. Existe la creencia general de que los anticonceptivos hormonales predisponen a candidiasis vaginal, pero no disponemos de estudios sobre la prevalencia oral (Otero *et al.*, 2015).

- Tratamiento con quimio y/o radioterapia. En algunos centros, las infecciones fúngicas, en particular las candidiasis, forman la primordial causa de muerte en pacientes leucémicos sujeto a

terapias con quimioterapia. La neutropenia asociada a la medicación y toxicidad directa de los productos sobre la mucosa parecen las causas más directamente relacionadas con la sobreinfección. Así la frecuencia de candidiasis oral en los pacientes sometidos a tratamiento quimioterápico se ha cifrado en un 16% para los casos de leucemia y en un 7% para los pacientes con tumores sólidos (Otero *et al.*, 2015).

Candidiasis bucal es una de las tres primordiales motivos de referencia de pacientes adultos mayores, junto con la sospecha de lesiones premalignas y cáncer, e inflamaciones orales vesículo-erosivas (Ibáñez, Díaz, Flores y López, 2010).

Candidiasis oral aguda

- Pseudomembranosa. Se caracteriza por la presencia de placas blandas de “requesón” o placas blancas y cremosas en varios puntos del interior de la boca. Las placas blandas pueden desprenderse fácilmente con un depresor lingual o una gasa dejando una zona eritematosa, erosionada o ulcerada, en ocasiones dolorosa, con una mucosa adyacente normal en apariencia. Algunas causas frecuentes son el uso prolongado de antibióticos, que trastorna la homeostasis de la flora bucal; uso de corticoides sistémicos, que induce inmunodepresión; infección por el VIH; xerostomía crónica debida a radioterapia, quimioterapia o medicación; síndrome de Sjögren y diabetes mellitus (Sapp, Eversole y Wysocki, 2005).

- Eritematosa. Es más frecuente en portadores de prótesis removibles mal ajustadas o en quienes llevan dicha dentadura puesta continuamente. Se denomina estomatitis protética y se presenta en forma de una zona roja generalizada de tejido atrófico, por lo común en el dorso de la lengua y en el paladar. En etapas iniciales existen áreas de erosión superficial y petequias. La primordial molestia es una sensación de quemazón continua en el área afectada. Los pacientes se

quejan de sensibilidad intensa y dolor ante la exposición a líquidos calientes y fríos, alimentos picantes y bebidas alcohólicas (Sapp *et al.*, 2005).

Candidiasis oral crónica

- Hiperplásica. Suele presentarse en forma de placa mucosa blanca. Se encuentra mayor constancia en la mucosa yugal, a lo largo de la línea oclusal, ensanchándose en forma de V al acercarse a la comisura labial, y también en las superficies laterodorsales de la lengua y los rebordes alveolares. Dado que se presenta como una mancha o placa en la mucosa, se denomina frecuentemente leucoplasia candidiásica (Sapp *et al.*, 2005).
- Queilitis angular. Inflación bilateral crónica de las comisuras (ángulos) de la boca, caracterizada por atrofia y fisuras lineales. Es frecuente en pacientes con reducción de la dimensión vertical debido a pérdida de dientes, desgaste de éstos o uso muy prolongado de una misma prótesis dental (Sapp *et al.*, 2005).
- Glositis romboidal media. Ubica en la línea media del dorso de la lengua. Se pensó que representaba un defecto del desarrollo y por ello no solía tratarse. La lesión empieza como un área estrecha levemente eritomatosa situada a lo largo de la fisura media de la lengua. La lesión es asintomática y aumenta de tamaño lentamente, permaneciendo a menudo ignorada por el paciente durante muchos años (Sapp *et al.*, 2005).
- Candidiasis mucocutánea crónica. Se utiliza para describir un trastorno en el cual se presenta candidiasis persistente y refractaria en las mucosas, piel y uñas de los pacientes afectados. La mayoría de esos pacientes presentan endocrinopatías y defectos del sistema inmunitario (Sapp *et al.*, 2005).

El análisis de laboratorio establece el criterio diagnóstico definitivo. Requieren la demostración del hongo en la lesión clínica. Se puede realizar por frotis, biopsia o cultivo (Velasco, Mendiola y Pizano, 2013).

Se basa en cuatro pilares: Realización de un diagnóstico temprano y preciso de la infección, solucionar de los factores facilitadores o de las enfermedades subyacentes, identificación del tipo de infección candidiásica, utilizar fármacos antifúngicos apropiados (Aguirre, 2002).

En la candidiasis bucal el tratamiento farmacológico debe ser previamente tópico y en casos graves o resistentes la terapia debe ser combinada sistémica y tópica. Los dos grupos principales de antifúngicos, polifónicos y azólicos, son útiles para tratar estas infecciones (Aguirre, 2002).

El tratamiento incluirá medidas locales y sistémicas. Las medidas locales emplean mejoramiento de las condiciones de higiene de la boca del paciente. Esto incluirá el cepillado de la lengua, del paladar, de las mejillas; el retiro de la prótesis y su aseo. También se pueden usar fármacos antifúngicos en forma de enjuagatorios. Las medidas sistémicas requieren, por un lado, de identificación de cualquier enfermedad sistémica que pueda estar asociado al crecimiento de la candidiasis bucal, ya que es necesario su tratamiento para lograr la curación e impedir la recidiva. Por otro lado, comprenden el empleo de fármacos antifúngicos (Pérez *et al.*, 2004).

Los fármacos más usados como los antifúngicos poliénicos, la anfotericina B y la nistatina, es por medio de la unión a los esteroides de la membrana de la *Candida spp.* alterando su permeabilidad y destruyendo al hongo (Pérez *et al.*, 2004).

Otros fármacos como los azoles, imidazol, miconazol, ketoconazol y los triazoles, fluconazol, itraconazol; inhiben la síntesis de ergosterol, triglicéridos y fosfolípidos de la membrana del retículo endoplásmico y de la mitocondria por su unión al citocromo P 450 del hongo e inhiben las funciones enzimáticas implicadas en la biosíntesis del microorganismo (Pérez *et al.*, 2004).

Educar al paciente en lo que se refiere a los procedimientos de higiene oral y al mantenimiento de sus prótesis sea ésta fija, parcial, total incluso implantes. En caso de continuar con los factores de riesgo el paciente debe realizar un control periódico de la cavidad bucal (Aizaga, 2017).

2.2 Antecedentes

Montero *et al.* (2017) realizaron un estudio en Riobamba, Ecuador, cuyo propósito fue conocer el efecto antimicrobiano del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre cepas de *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella typhimurium*. Utilizaron el método de destilación por arrastre de vapor y sometido a decantación. Se empleó cinco tratamientos (10, 30, 50, 70, 90% de aceite de canela) y cinco repeticiones. Concluyeron que las cepas de *Salmonella* son sensibles al aceite esencial de canela a concentraciones de 50% o superiores y que la cepa *S. typhimurium* presentó mayor sensibilidad al aceite de canela que la cepa *S. choleraesuis*, en referencia al diámetro de los halos de sensibilidad.

Ortiz (2017) realizó un estudio en Riobamba, Ecuador, cuyo objetivo fue evaluar la actividad antifúngica del aceite esencial y extracto alcohólico de *Cinnamomum verum* (canela) sobre *Candida albicans* cepa ATCC 10231. Se empleó el sistema de extracción de aceite; por la trampa de cleverger y un Rotavapor R-300 para el aceite y el extracto alcohólico respectivamente. Se utilizó la técnica de dilución en caldo y el método de Kirby Bauer. Concluyeron que el aceite esencial presenta mayor actividad antifúngica, con respecto al extracto alcohólico el hongo no presentó sensibilidad alguna.

Mendoza (2016) realizó un estudio en Trujillo, Perú, con el objetivo de evaluar el efecto antimicrobiano del extracto oleoso de *Cinnamomum zeylanicum* “canela” sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* comparado con Ceftazidima. Se consiguió el aceite esencial por arrastre de vapor, dilución cultivo y método Kirby-Bauer, encontrándose que *Cinnamomum zeylanicum* sí tiene efecto antibacteriano frente a cepas de *P. aeruginosa*, que dentro de las diluciones realizadas la de menor cantidad es al 25%. Concluyeron a pesar de presentar efecto positivo frente a la bacteria, la Ceftazidima tiene mayor poder antimicrobiano con respecto a las concentraciones del aceite.

Sánchez y Luján (2013) realizaron un estudio en Trujillo, Perú, cuyo objetivo fue evaluar la MIC y la EA. Se aplicó en seis concentraciones para cada presentación de canela. La MIC se evaluó a través del método de diluciones en tubos mientras que el efecto antimicrobiano se determinó a través del método de difusión de discos. Los resultados mostraron que la MIC del extracto acuoso y el AE de canela sobre el desarrollo de la *Candida albicans*, fue de 1 mg/ml. Se obtuvo que la MIC del extracto acuoso y del AE de canela sobre el crecimiento del *Streptococcus mutans* fue 0,8 mg/ml y 1 mg/ml, respectivamente. Concluyeron que respecto al efecto antimicrobiano de todos los preparados sólo el AECZ tuvo EA sobre la CA en el periodo de 24 horas.

Almeida (2012) realizó un trabajo de investigación cuyo objetivo fue evaluar la EA de los AE de *Ocimum basilicum* L. (albahaca), *Cymbopogon Martini* L. (palmarosa), *Thymus vulgaris* L. (tomillo) y *Cinnamomum cassia* Blume (canela) en cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes VIH-positivos y cepa estándar (ATCC 76845). Quince aislados clínicos de *C. albicans* (C1-C15) se subcultivaron. Se utilizaron como controles nistatina y miconazol positivo (50 mg L-1). Para *C. albicans* (ATCC 76845), la MIC del AECZ fue de 64 mg L-1, así mismo se

encontró que ésta concentración mínima inhibitoria el 80% de la cepas presentaron inhibición ($P < 0,05$). Encontraron también que la nistatina no mostró actividad contra los aislados clínicos, mientras que el miconazol presentó actividad antifúngica. Se concluyó que el AECZ en diferentes concentraciones, tienen EA contra cepas de CA.

Wang *et al.* (2012) realizaron una investigación en Shijiazhuang, China, cuyo propósito fue investigar los mecanismos anti-hongos y los efectos curativos del AECZ hacia la CA. Midieron los valores de MIC de los complejos contra los hongos fueron 0,064 mg/ml AECZ para CA. Sesenta pacientes infectados con *Candida* fueron tratados con una capsula que contiene canela y aceite de pogostemón. La relación curativa fue 71,67% (43/60), y la relación de mejora fue 28,33% (17/60), dando una relación total de 100%. Por lo que concluyeron, el aceite de canela tuvo fuertes EA contra la CA ($P < 0.05$). Ellos tuvieron impacto en las estructuras morfológicas y sub-micro del hongo dentro de 48 a 72 h, finalmente desnaturalizado y mataron a las células.

2.3 Justificación de la Investigación

Los antibióticos hoy en día constituyen la principal fuente para el manejo de las diversas infecciones microbianas (bacterianas y fúngicas). A partir del descubrimiento de estos antibióticos y el empleo de los agentes quimioterapéuticos, se de estos antibióticos y el uso de los agentes quimioterapéuticos, se consideró asegurada la erradicación de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, el empleo indiscriminado de estos antibióticos trajo consigo la aparición de cepas multidrogo resistentes. Por ello, la rápida y generalizada aparición de resistencia frente a los agentes antimicrobianos impulsó la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. Por tal razón, en esta investigación se propone aportar conocimientos a los especialistas de la salud un tratamiento natural contra esta enfermedad micótica utilizando el aceite esencial en microorganismos que habitan en la cavidad bucal, una de las enfermedades

fúngicas más frecuentes es la candidiasis oral que es causada principalmente por la CA. Se recomienda esta nueva alternativa natural debido a su fácil recolección y pudiendo presentar menores efectos secundarios es que se propone su uso medicinal.

La candidiasis mayormente causada por *Candida albicans*, en la actualidad está experimentando un incremento en la frecuencia de su aparición, por ello la acción del AECZ podría tener un efecto realmente positivo y aceptado por la población debido a su bajo costo de obtención, y a largo plazo hacer un compuesto de enjuague dental que nos brindaría una alternativa tratamiento contra esta patología de la cavidad bucal.

Mediante los métodos observacionales directos, y medición de halos inhibitorios se realizó el presente estudio para la demostración y conclusión de la posible hipótesis planteada recolectando la muestra mediante un estudio piloto.

2.4 Hipótesis

Dado que el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (Canela) al 25%, 50%, 75% y 100% tiene propiedades antifúngicas que inhiben la formación de la *Candida albicans* es probable que el efecto antifúngico sea mayor que la nistatina.

III.- Objetivos

3.1 Objetivo General

Comparar la efectividad antifúngica in vitro del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (Canela) al 25%, 50%, 75% y 100% versus Nistatina sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1. Conocer los valores del halo inhibitorio en mm del AECZ al 25%, 50%, 75%, 100% y la nistatina durante el periodo de 24 horas.

3.2.2. Conocer los valores del halo inhibitorio en mm del AECZ al 25%, 50%, 75%, 100% y la nistatina durante el periodo de 48 horas.

3.2.3. Comparar los promedios de halo de inhibición entre el AECZ al 25%, 50%, 75%, 100% y la nistatina durante el periodo de 24 horas.

3.2.4. Comparar los promedios de halo de inhibición entre el AECZ al 25%, 50%, 75%, 100% y la nistatina durante el periodo de 48 horas.

3.2.5. Conocer las correlaciones promedial del halo inhibitorio durante el periodo de 24 y 48 horas del AECZ al 25%, 50%, 75%, 100% y la nistatina.

3.2.6. Hallar las correlaciones promedial del halo inhibitorio de las muestras emparejadas del AECZ al 25%, 50%, 75%, 100% y la nistatina durante el periodo de 24 y 48 horas.

IV.- Materiales y método

4.1.- Tipo de Estudio

Experimental, prospectivo, longitudinal, comparativo.

4.2.- Población/Muestra/Criterios de Selección

4.2.1.- Población

Cepa de CA ATCC 10231.

Unidad de análisis

Placa Petri inoculada con cepa de CA ATCC 10231.

4.2.2.- Muestra

Se realizó un trabajo piloto para definir el tamaño de la muestra y quedo conformada por 15 placas Petri por grupo.

4.2.3.- Criterios de Selección

4.2.3.1.- Criterios de inclusión:

- Placas Petri de CA ATCC 10231.
- AE de canela de la especie *Cinnamomum zeylanicum*.
- Dilución del AECZ al 25%, 50%, 75% y 100% estériles.

4.2.3.2.- Criterios de exclusión:

• Placas Petri de CA ATCC 10231, que hayan sufrido contaminaciones y/o alteraciones por mala incubación o mano propia del operador.

• AE de canela que no pertenezca a la especie de *Cinnamomum zeylanicum*.

• AE de canela en concentraciones que no correspondan a las propuestas en la investigación.

- AE de canela con compuestos minerales que puedan producir sedimentaciones.

4.3.- Variables/Definición/Operacionalización

Variable Dependiente:

- Efectividad antifúngica: Es identificado y midiendo la presencia de halos de inhibición alrededor de los discos de papel embebidos del aceite de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) en cada una de las placas Petri observadas.

Variables Independientes:

- Aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela): Contiene como componente principal 75-85% de eugenol, con una alta actividad antibacterial, y contiene 5% de cinamaldehído, el cual contribuye con su carácter aromático y características antimicrobianas.
- Nistatina: Es un macrólido polieno, que se caracteriza por ser toxico al ser administrado vía parenteral, por lo que aplica generalmente solo por vía tópica.

4.3.2.- Operacionalización de las Variables

Variables	Definición operacional	Indicador	Escala	Valores
Efectividad antifúngica	Es identificado y midiendo la presencia de halos de inhibición alrededor de los discos de papel embebidos del aceite de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela) en cada una de las placas Petri observadas.	Diámetro del halo de inhibición formado alrededor del disco embebido con el aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela).	Razón	Diámetro del halo de inhibición (0-X mm.)
Aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela)	Contiene como componente principal 75-85% de eugenol, con una alta actividad antibacterial, y contiene 5% de cinamaldehído, el cual contribuye con su carácter aromático y características antimicrobianas.	Grado de sensibilidad de inhibición.	Nominal	25% 50% 75% 100%
Nistatina	Es un macrólido polieno, que se caracteriza por ser toxico al ser administrado vía parenteral, por lo que aplica generalmente solo por vía tópica.	Grado de sensibilidad de inhibición.	Nominal	100,000 UI/ml

4.4.- Método/Técnica/Procedimientos

4.4.1.- Método

Observación directa del halo inhibitorio.

4.4.2.- Técnica

Se realizó una observación directa, y medición del halo inhibitorio de la concentración al 25%, 50%, 75%, 100% del AECZ y Nistatina sobre cepa de CA ATCC 10231, los datos obtenidos, serán registrados en una ficha de recolección de datos (ver Anexo 3).

Tendrá la función de recolectar y registrar los datos sobre la medida individual de los halos en mm, formados en cada uno los discos embebidos con el AECZ, presentes en las placas sembradas. En el periodo de 24 y 48 horas de haber realizado la siembra se procedió a hacer las lecturas y el llenado de la ficha de recolección, tomando en cuenta:

1. Identificación de la muestra.
2. Identificación de la concentración utilizada.
3. Medida en milímetros del halo de inhibición formado.

4.4.3.- Procedimiento

Se recolectó 1000g de corteza de la canela, verificando que no presenten signos de enfermedades que interfieran en el desarrollo de la tesis, obtenido del mercado Mayorista que procede de la comunidad de Villa el Salvador en el mes de agosto del 2018. Posteriormente se transportó al laboratorio de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, donde se almaceno en bolsas de papel Kraft para evitar influencia del medio ambiente sobre sus propiedades.

Cada grupo de 250 g se colocó en un balón de fondo plano y sometida a corriente de vapor de agua sobrecalentada; de esta manera se arrastró la esencia que por acción refrigerante, se condensó. El hidrolato, el resultado del destilado, se separó tomando en cuenta sus propiedades

de inmiscibilidad y diferencia de densidades entre el agua y el aceite esencial, utilizando una pera de separación de vidrio, deshidratando las impurezas de agua y aceite esencial con sulfato de sodio (Na_2SO_4) anhidro, filtrándose el aceite puro (Anexo 3).

Posteriormente, del resultado de la extracción del aceite esencial se prepararon las diluciones al 25%, 50%, 75% en tween 80 y 100%, colocados en frascos distintos y debidamente rotulados (Anexo 3).

Se efectuó a realizar las siembras bacteriológicas en un medio de cultivo.

Sembrado en Sabouraud Dextrosa: Son medios utilizados para aislamiento y cultivo de hongos (levaduras, hongos y dermatofitos) (Anexo 4).

Realizada las siembras se llevó a la incubadora a 37°C por un periodo de 24 horas.

Luego de haber logrado el crecimiento de las colonias bacterianas, se llevó a cabo realizar las pruebas de sensibilidad (Anexo 4).

Se acondicionó las placas Petri con el agar Mueller Hinton: el cual cada placa fue sembrado con *Candida albicans* ATCC 10231 (Anexo 5).

Seguidamente se realizó 5 pocillos: 4 primeros pocillos a los alrededores para las 4 concentraciones de aceite esencial de canela y el último pocillo en el centro para la Nistatina por cada placa Petri (Anexo 5).

En cada pozo se colocó los materiales de medicación:

Pocillo número 1; AECZ al 25%

Pocillo número 2; AECZ al 50%

Pocillo número 3; AECZ al 75%

Pocillo número 4; AECZ al 100%

Pocillo número 5; Nistatina

Luego del sembrado se midió los halos de inhibición con un pie de rey, en intervalos de: 24 horas y 48horas (Anexo 6 y 7).

4.5 Consideraciones Éticas

El presente estudio contó con la autorización de la casa de estudio (UNFV), en concordancia con las recomendaciones establecidas en la declaración de Helsinki, adoptada por la 18^o Asamblea Médica Mundial en Helsinki, Finlandia, junio 1964 y modificada por la Asamblea Médica Mundial en Tokio, enero 2004.

4.6 Plan de Análisis

Los datos fueron recolectados utilizando el paquete estadístico SPSS 24.0 versión en español y la base de datos en Excel. Primero se aplicó la prueba de normalidad a través de la prueba Shapiro Wilk (Anexo 9), para decidir el tipo de prueba en comparaciones múltiples aplicamos la prueba de homogeneidad de varianza de Levene, luego se trabajó con la prueba Tukey, correlación de Pearson y T student para comparaciones múltiples y obtener un resultado prospectivo de un antes y un después. El nivel de significancia estadística que se utilizó es de 0.05.

V.- Resultados

1. Existió un mayor EA del AECZ al 100% mostrándose una media de halo inhibitorio de 22,1 mm por encima de la nistatina que obtuvo una media de halo inhibitorio de 15,11 mm durante las 24 horas sobre cepa de CA ATCC 10231 (Ver tabla 1 y fig. I).
2. Se observó nuevamente un mayor EA del AECZ al 100% observando una media de halo inhibitorio de 31,22 mm superior a la nistatina que consiguió una media de halo inhibitorio de 19,9 mm durante las 48 horas sobre cepa de CA ATCC 10231 (Ver tabla 2 y fig. II).
3. El AECZ al 75% fue estadísticamente similar a la acción del AECZ al 100% ($p=0,101$); es decir no existe diferencia significativa entre ambos durante las 24 horas sobre cepa de CA ATCC 10231 (Ver tabla 3 y fig. III).
4. El AECZ al 50% fue estadísticamente similar a la acción del AECZ al 75% ($p=0,740$); es decir no existe diferencia significativa entre ambos durante las 48 horas sobre cepa de CA ATCC 10231 (Ver tabla 4 y fig. IV).
5. Se evidenció que existe una fuerte correlación positiva; es decir, a medida que transcurre las horas el efecto antifúngico aumenta, siendo la media del halo inhibitorio a las 48 horas mayor sobre cepa de CA ATCC 10231 (Ver tabla 5 y fig. V).
6. Se evaluó que el AECZ al 25% presentó crecimiento de halo inhibitorio constante en el rango de 24 a 48 horas, superando estadísticamente a la nistatina sobre cepa de CA ATCC 10231 (Ver tabla 6 y fig. VI).

Tabla 1

Valores descriptivos del halo inhibitorio en el periodo de 24 horas.

Grupo	N	Media	DS	Mínimo	Máximo
AEC 25%	15	17,9200	1,61829	15,00	19,90
AEC 50%	15	19,5133	1,11090	18,00	21,00
AEC 75%	15	20,9733	1,15664	18,70	22,60
AEC 100%	15	22,1000	1,13515	19,90	23,50
Nistatina	15	15,1133	1,05144	13,10	16,90

La tabla 1, se observa que la canela 100% presenta mayor media de halo inhibitorio (22,1 mm), y la nistatina presento menor halo inhibitorio (15,11 mm). Además, en el total de los grupos el valor mínimo y máximo de medias fue de 13,10 mm y 23,50 mm respectivamente.

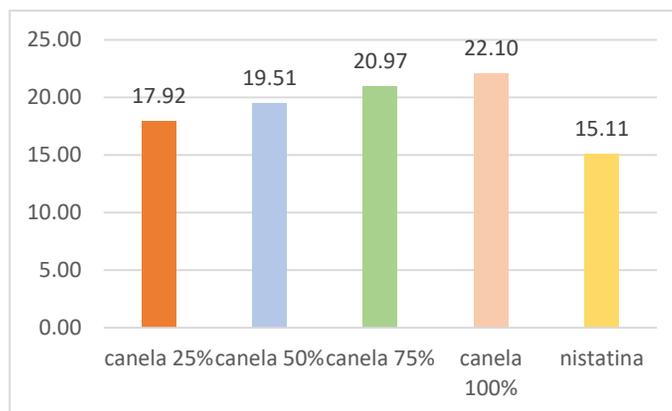


Figura I. Valores descriptivos del halo inhibitorio en el periodo de 24 horas.

Tabla 2

Valores descriptivos del halo inhibitorio en el periodo de 48 horas.

Grupo	N	Media	DS	Mínimo	Máximo
AEC 25%	15	22,6067	1,70900	20,00	25,50
AEC 50%	15	27,0000	0,81679	25,90	28,10
AEC 75%	15	27,8600	2,08423	23,50	30,90
AEC 100%	15	31,2267	3,26813	26,00	36,90
Nistatina	15	19,9067	0,13345	19,70	20,00

La tabla 2, se observa que la canela 100% presenta mayor media de halo inhibitorio (31,22 mm), y la nistatina presento menor halo inhibitorio (19,90 mm). Además, se observa que en el total de los grupos el valor mínimo y máximo de medias fue de 19,70 mm y 36,90 mm respectivamente.

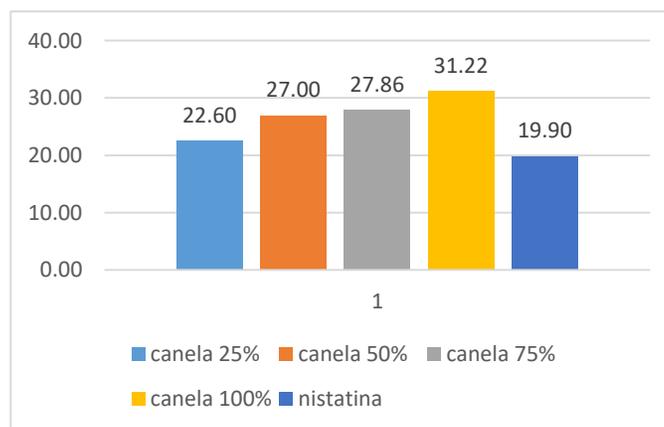


Figura II. Valores descriptivos del halo inhibitorio en el periodo de 48 horas.

Tabla 3

Comparación de promedios de halo inhibitorio de las muestras en el periodo de 24 horas.

Grupo A	Grupo B	Media	Diferencia de Media (A-B)	Sig.
AEC 25%	AEC 50%	19,5133	-1,59333*	0,006
	AEC 75%	20,9733	-3,05333*	0,000
	AEC 100%	22,1000	-4,18000*	0,000
	Nistatina	15,1133	2,80667*	0,000
AEC 50%	AEC 25%	17,9200	1,59333*	0,006
	AEC 75%	20,9733	-1,46000*	0,015
	AEC 100%	22,1000	-2,58667*	0,000
	Nistatina	15,1133	4,40000*	0,000
AEC 75%	AEC 25%	17,9200	3,05333*	0,000
	AEC 50%	19,5133	1,46000*	0,015
	AEC 100%	22,1000	-1,12667	0,101
	Nistatina	15,1133	5,86000*	0,000
AEC 100%	AEC 25%	17,9200	4,18000*	0,000
	AEC 50%	19,5133	2,58667*	0,000
	AEC 75%	20,9733	1,12667	0,101
	Nistatina	15,1133	6,98667*	0,000
Nistatina	AEC 25%	17,9200	-2,80667*	0,000
	AEC 50%	19,5133	-4,40000*	0,000
	AEC 75%	20,9733	-5,86000*	0,000
	AEC 100%	22,1000	-6,98667*	0,000

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

La tabla 3, se observa que la canela 75% con la canela 100% tienen la misma actividad inhibitoria (P=0,101).

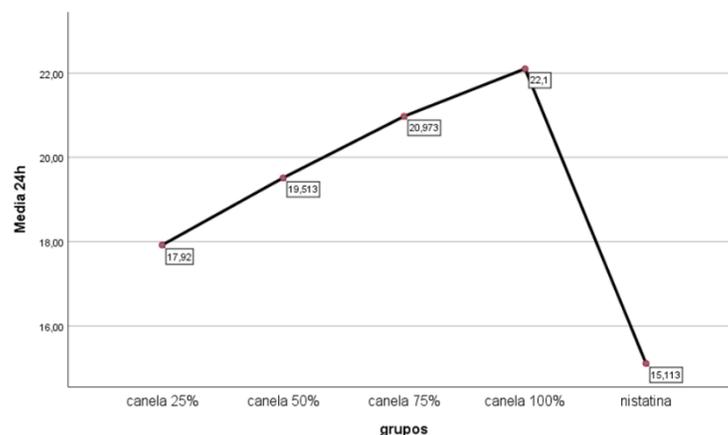


Figura III. Comparación de promedios de halo inhibitorio de las muestras en el periodo de 24 horas.

Tabla 4

Comparación de promedios de halo inhibitorio de las muestras en el periodo de 48 horas.

Grupo A	Grupo B	Media	Diferencia de Media (A-B)	Sig.
AEC 25%	AEC 50%	27,0000	-4,39333*	0,000
	AEC 75%	27,8600	-5,25333*	0,000
	AEC 100%	31,2267	-8,62000*	0,000
	Nistatina	19,9067	2,70000*	0,002
AEC 50%	AEC 25%	22,6067	4,39333*	0,000
	AEC 75%	27,8600	-0,86000	0,740
	AEC 100%	31,2267	-4,22667*	0,000
	Nistatina	19,9067	7,09333*	0,000
AEC 75%	AEC 25%	22,6067	5,25333*	0,000
	AEC 50%	27,0000	0,86000	0,740
	AEC 100%	31,2267	-3,36667*	0,000
	Nistatina	19,9067	7,95333*	0,000
AEC 100%	AEC 25%	22,6067	8,62000*	0,000
	AEC 50%	27,0000	4,22667*	0,000
	AEC 75%	27,8600	3,36667*	0,000
	Nistatina	19,9067	11,32000*	0,000
Nistatina	AEC 25%	22,6067	-2,70000*	0,002
	AEC 50%	27,0000	-7,09333*	0,000
	AEC 75%	27,8600	-7,95333*	0,000
	AEC 100%	31,2267	-11,32000*	0,000

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

La tabla 4, se observa que la canela 75% con la canela 50% tienen la misma actividad inhibitoria ($p=0,740$).

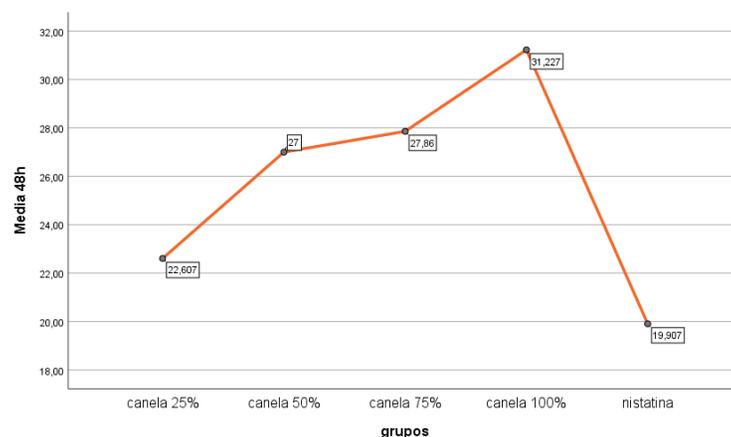


Figura IV. Comparación de promedios de halo inhibitorio de las muestras en el periodo de 24 horas.

Tabla 5

Correlaciones de media de halo inhibitorio a las 24 y 48 horas.

		Grupo 24h	Grupo 48h
Grupo 24h	Correlación de Pearson	1	0,919**
	Sig, (bilateral)		0,000
	N	75	75
Grupo 48h	Correlación de Pearson	0,919**	1
	Sig, (bilateral)	0,000	
	N	75	75

** La correlación es significativa en el nivel 0,01 (bilateral).

La tabla 5, se plantea la hipótesis nula que las medias del halo inhibitorio están incorreladas. El estadístico de contraste es menor a 0,05 ($p=0,000$) se rechaza la hipótesis nula y se acepta que existe fuerte correlación positiva, es decir, el promedio de halo inhibitorio es mayor en el periodo de 48 horas (0,919).

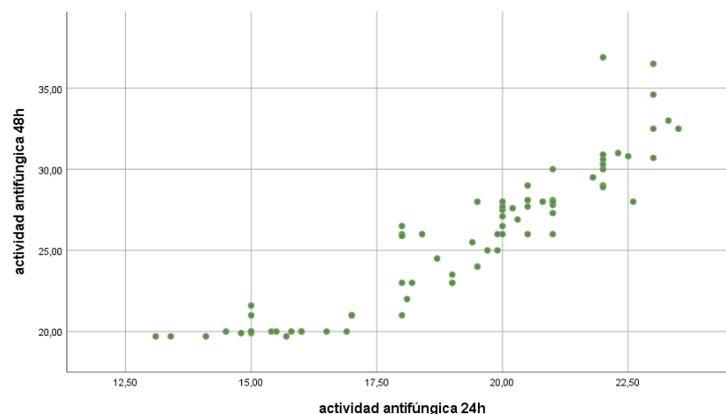


Figura V. Correlaciones de media de halo inhibitorio a las 24 y 48 horas.

Tabla 6

Correlaciones de muestras emparejadas.

	N	Correlación	Sig.
Par 1 AEC 25% 24h & AEC 25% 48h	15	0,822	0,000
Par 2 AEC 50% 24h & AEC 50% 48h	15	0,806	0,000
Par 3 AEC 75% 24h & AEC 75% 48h	15	0,804	0,000
Par 4 AEC 100% 24h & AEC 100% 48h	15	0,745	0,001
Par 5 Nistatina 24h & Nistatina 48h	15	0,656	0,008

La tabla 6, se plantea la hipótesis nula que no existe correlación del halo inhibitorio de muestras emparejadas en los grupos de estudio. El estadístico de contraste es menor a 0,05 ($p=0,000$) se rechaza la hipótesis nula y se acepta que existe correlación de muestras emparejadas. Observamos que la correlación es positiva, siendo la canela 25% quien presenta una alta correlación (0,822); es decir, que la canela 25% presentó crecimiento de halo inhibitorio constante a las 48 horas, superando estadísticamente a la nistatina.

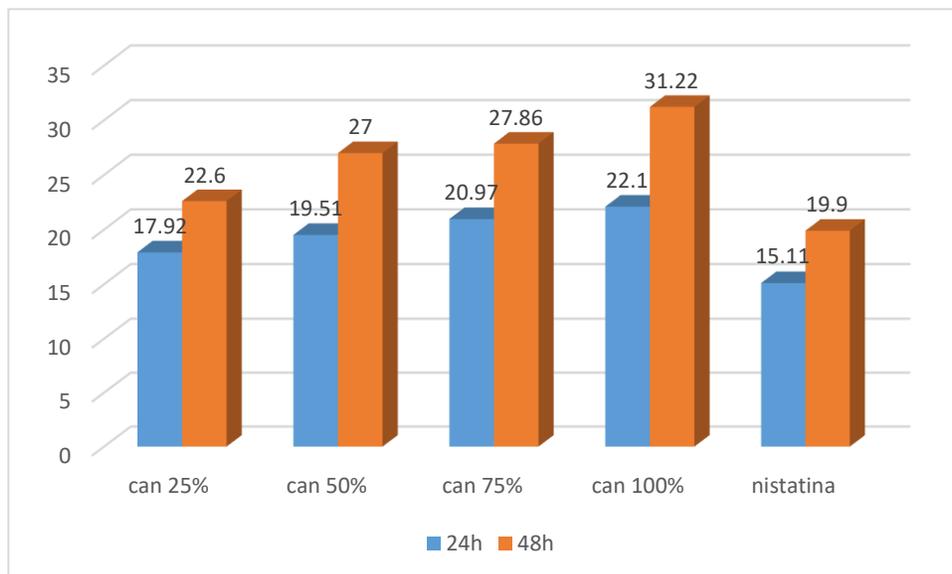


Figura VI. Correlaciones de muestras emparejadas.

VI.- Discusión

Uno de los inconvenientes en el éxito del tratamiento de enfermedades es la resistencia que los microorganismos desarrollan frente al uso de medicamentos convencionales, por lo que surge la necesidad de desarrollar compuestos antifúngicos con gran actividad y baja toxicidad. Por esta razón, se inician investigaciones en plantas y sus componentes como agentes antifúngicos potenciales.

Montero *et al.* (2017) realizaron un estudio in-vitro por la técnica de sembrado en Agar Mueller-Hinton y el método de Kirby-Bauer, con el propósito de conocer el efecto antimicrobiano del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre cepas de *Salmonella choleraesuis* y *Salmonella typhimurium*. Utilizaron el método de destilación por arrastre de vapor y sometido a decantación. Se empleó cinco tratamientos (10, 30, 50, 70, 90% de aceite de canela) y cinco repeticiones. Lo que resultó que la *S. choleraesuis* presentó un halo de sensibilidad de 11,4; 14,8; 19,0; 18,8 y 21,6 mm a la concentración de 10, 30, 50, 70 y 90% respectivamente; mientras que la *S. typhimurium* presentó un halo de sensibilidad de 14,6; 21,2; 26,0; 20,6 y 29,4 mm a la concentración de 10, 30, 50, 70 y 90% respectivamente. Concluyeron que las cepas de *Salmonella* son sensibles al aceite esencial de canela a concentraciones de 50% o superiores y que la cepa *S. typhimurium* presentó mayor sensibilidad al aceite de canela que la cepa *S. choleraesuis*, en referencia al diámetro de los halos de sensibilidad; los resultados son similares a nuestra investigación con respecto a la *S. choleraesuis* en el periodo de 24 horas.

Mendoza (2016) estimó el efecto antimicrobiano del extracto oleoso de *Cinnamomum zeylanicum* “canela” sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* comparado con Cefotaxidima. Se consiguió el aceite esencial por arrastre de vapor, dilución cultivo y método Kirby-Bauer, encontrándose que *Cinnamomum zeylanicum* sí tiene efecto antibacteriano frente a cepas de *P.*

aeruginosa, que dentro de las diluciones realizadas la de menor cantidad es al 25%. Concluyeron a pesar de presentar efecto positivo frente a la bacteria, la Ceftazidima tiene mayor poder antimicrobiano con respecto a las concentraciones del aceite; los resultados difieren con nuestra investigación, a pesar de haberse empleado las mismas concentraciones en el periodo de 24 horas.

Sánchez y Luján (2013) ejecutó un estudio comparativo en el periodo de 24 horas con el objetivo, valorar efecto antifúngico que poseen dos diferentes tipos de extractos (acuoso y oleoso) sobre *Candida albicans* y *Streptococcus mutans* y evaluar de esa forma cuál de ellas es la mejor opción en tratamientos para dichos microorganismos. Como resultado de esta investigación, observaron que el extracto acuoso de canela no tuvo efecto antifúngico mientras que el AE si tuvo resultados positivos sobre la *Candida albicans*. Dichos resultados tienen concordancia con nuestra investigación, porque el aceite esencial de *Cinamomum zeylanicum* (canela) obtuvo una mayor efectividad antifúngica, formando un mayor halo de inhibición comparado con la nistatina en el periodo de 24 horas.

VII.- Conclusiones

- Se comparó la efectividad antifúngica in vitro del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) versus nistatina sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 10231; resultando que el aceite esencial tiene un mejor efecto antifúngico en comparación con la nistatina el cual tiene un precedente estandarizado.
- Al análisis de los resultados se concluye que el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) en diferentes concentraciones, presenta efectividad antifúngica y que a mayor concentración el efecto aumenta sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, en comparación a la nistatina.
- El aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) presenta mayor inhibición del crecimiento sobre cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, en tanto que los compuestos químicos que posee inhibieron totalmente su crecimiento. Lo que se concluye que podrían ser una alternativa atractiva para el control de enfermedades causadas por cepa de *Candida albicans*.

VIII.- Recomendaciones

- Ampliar el número de muestra y así obtener una mayor significancia estadística.
- Realizar estudios con otros medicamentos antifúngicos, en cuanto puede variar al compararlo con el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela).
- Utilizar las diluciones de la *Cinnamomum zeylanicum* (canela) en cada placa Petri para mayor comodidad de lectura de los halos de inhibición.
- Se debe valorar si es efectivo el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) frente a otras bacterias.
- Se recomienda realizar estudios similares utilizando menores concentraciones del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela).
- Se recomienda realizar estudios “in vivo” para valorar la efectividad y la toxicidad que pueden proporcionar los componentes activos de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), a fin de comprobar si los resultados “in vitro” son similares.

IX.- Referencias bibliográficas

- Aizaga, S. (2017). *Efecto antifúngico del aceite esencial de canela (Cinnamomum zeylanicum) al 25%, 50%, 75% y 100% sobre Cándida albicans ATCC 10231* (Tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Aguirre, J. (2002). Candidiasis orales. *Iberoamericana de Micología*, 19(1), 17-21.
- Almeida, L. (2012). Atividade antifungica de óleos essenciais frente a amostras clinicas de *Candida albicans* isoladas de pacientes HIV positivos. *Rev.bras.plantas med.*, 14(4), 236-239.
- Barceloux, D. (2009). *Cinnamomum (Cinnamomum species)*. *Dis. Mon.*, 55(6), 327-335.
- Bussmann, R. y Sharon, D. (2005). *Plantas medicinales de los Andes y la Amazonia- La flora mágica y medicinal del norte del Perú*. Trujillo, Perú: Centro William L. Brown-Jardín Botánico de Missouri.
- Castrillón, L., Palma, A. y Padilla, C. (2005). Factores de Virulencia en *Cándida sp.* *Dermatología Rev. Mex.*, 49(1), 12-27.
- De la Calle, N., Santa, C. y Cardona, N. (2012). Factores de virulencia para la infección de tejidos queratinizados por *Candida albicans* y hongos dermatofitos. *Rev CES Med*, 26(1), 43-55.
- Dias, R. (2010). *Atividade antifungica do óleo essencial de Cinnamomum verum Blume (Canela) e de sua associação com antifungicos sintéticos sobre espécies de Candida* (Tesis Doctoral). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brasil.
- Dias, R. y Oliveira, E. (2013). Anti-Candida activity and chemical composition of *Cinnamomum verum blume* essential oil. *Braz.arch.biol.technol*, 56(5), 749-755.

- Echegaray, J., Echegaray, P., Mosquera, A. y Gerrikaetxebarria, J. (2011). Fitoterapia y sus aplicaciones. *Rev. Española de Podología*, 22(6), 258-267.
- García, K. (2016). Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* (canela) frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in vitro. *Rev Simiykita*, 2(1), 9-15.
- Gómez, A. y López, A. (2009). Potencial antimicrobiano de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y canela (*Cinnamomun zeylanicum*). *Rev Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 33-45.
- González, M. (2010). *Conservación de Mora, uvilla y frutilla mediante la utilización del aceite esencial de canela (cinnamomum zeylanicum)* (Tesis pregrado). Escuela superior politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Gregorí, B. (2005). Estructura y actividad de los antifúngicos. *Rev Cubana Farm*, 39(2).
- Hernández, A. (2005). Fitoterapia. Bases científicas y legales para su aplicación. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 4(4), 71-74.
- Ibáñez, N., Díaz, M., Flores, D. y López, C. (2010). Candidiasis Oral y Prótesis dentales. *Med. Oral*, 12(3), 97-101.
- Ibáñez, N., Robles, C. y Lecona, J. (2017). Frecuencia de candidiasis oral asociado al uso de prótesis dentales en pacientes de la Clínica Odontológica de la Universidad Anáhuac Norte. *Rev. ADM.*, 74(2), 74-78.
- Itzik, A. (2005). *Las plantas curativas*. Montevideo, Uruguay: Cultural Librería Americana.
- Jayaprakasha, G., Jaganmohan, L. y Sakariah, K. (2002). Chemical composition of volatile oil from *Cinnamomun zeylanicum* buds. *Z. Naturforsch*, 57(1), 900-993.
- Krapp, K. y Longe, J. (2006). *Enciclopedia de las medicinas alternativas*. Barcelona, España: Oceano.

- Laforet, L. (2009). *Estudio de Pga26, una proteína implicada en la estructura de la pared celular de *Cándida albicans** (Tesis doctoral). Universidad de Valencia, Valencia, España.
- Lescano, G., Pettigrosso, R. y Llabot, J. (2014). Determinación de propiedades fisicoquímicas de Nistatina comercial empleando técnicas de caracterización de materiales. *Rev. Mexicana de ciencias farmacéuticas*, 45(2), 31-36.
- Mendoza, S. (2016). *Efecto antimicrobiano del extracto oleoso de *Cinnamomum zeylanicum* “canela” sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa* comparado con Cefotaxima, estudio *in vitro** (Tesis pregrado). Universidad César Vallejo, Trujillo, Perú.
- Montero, M., Revelo, J., Avilés, D., Valle, E. y Guevara, D. (2017). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) sobre cepas de Salmonella. *Rev. Inv. Vet.*, 28(4), 987-993.
- Pastrana, Y., Durango, A. y Acevedo, D. (2017). Efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre patógenos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(1), 56-65.
- Pérez, M., Cosetti, L. y Crestanello, J. (2004). Candidiasis oral. *Actas Odontológicas*, 1(1), 53-62.
- Olaya, J. (2003). *Guía de plantas y productos medicinales*. Bogotá, Colombia: Convenio Andrés Bello.
- Ortiz, M. (2017). *Actividad antifúngica “in vitro” del aceite esencial y extracto alcohólico del *Cinnamomum verum* “canela” sobre *Candida albicans* cepa ATCC 10231* (Tesis pregrado). Universidad Nacional de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Otero, E., Peñamaría, M., Rodríguez, M., Martín, B. y Blanco, A. (2015). Candidiasis oral en paciente mayor. *Avances en Odontoloestomatología*, 31(3), 135-148.

- Reyes, F., Palou, E. y López, A. (2012). Vapores de aceites esenciales: alternativa de antimicrobianos naturales. *Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 6(1), 29-39.
- Salas, A. (2017). Efecto antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Muña) en cepas de *Candida albicans*. *Rev de Investigacion de la escuela de Posgrado- UNA*, 6(2), 162-168.
- Sánchez, C. y Luján, M. (2013). Efecto antimicrobiano del aceite esencial y del extracto acuoso de canela (*Cinnamomun zeylanicum*) sobre *Candida albicans* y *Streptococcus mutans*. *Rev Sciendo*, 16(1), 68-78.
- Sánchez, C. y Padova, L. (2013). Efecto antimicrobiano del aceite esencial y del extracto acuoso de canela (*Cinnamomum verum*) sobre *Candida albicans* y *Streptococcus mutans*. *Sciendo*, 16(1), 159-163.
- Sánchez, L. (2013). *Determinación de compuestos funcionales de Canela (Cinnamomum zeylanicum)* (Tesis de pregrado). Instituto Politécnico Nacional-Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, D.F., México.
- Sapp, P., Eversole, L. y Wysocki, G. (2005). *Patología oral y maxilofacial contemporánea*. Barcelona, España: Elsevier.
- Stashenko, E. (2009). *Aceites Esenciales*. Bucaramanga, Colombia: Cenivam.
- Tamayo, M. (2004). *El proceso de la investigación científica*. D.F., México: Limusa.
- Tangarife, V., Correa, J., Zapata, B., Durán, C., Stanshenko, E. y Mesa, A. (2011). Actividad contra *Candida albicans*, citotoxicidad e interacción con antifúngicos de aceites esenciales y extractos de plantas medicinales y aromáticas. *Rev Infectio*, 15(3), 160-167.
- Vademécum Médico. (2012). Lima, Perú: Nueva Facultad.

- Vega, E. y López, A. (2009). Agentes antimicrobianos presentes en especias y hierbas. *Rev Temas selectos de Ingeniería de Alimentos*, 3(1), 85-95.
- Velasco, E., Mendiola, A. y Pizano, M. (2013). Candidiasis oral en paciente pediátrico sano. *Revisión bibliográfica Oral*, 14(44), 956-964.
- Villasís, M. y Miranda, M. (2016). El protocolo de investigación II: Los diseños de estudio para investigación clínica. *Alergia México*, 63(1), 80-90.
- Wang, G., Deng, J., Ma, Y., Shi, M. y Li, B. (2012). Mechanisms, clinically curative effects, and antifungal activities of cinnamon oil and pogostemon oil complex against three species of *Candida*. *J Tradit Chin Med.*, 32(2), 19-24.

X.- Anexos

Anexo 1. Carta presentación para laboratorio experimental.



**Universidad Nacional
Federico Villarreal**

"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

DEPARTAMENTO ACADÉMICO

Pueblo Libre, 05 de diciembre de 2018.

Oficio N° 301-2018-DA-FO-UNFV

C.D.
LUIS ALEJANDRO GONZALES GONZALES
 Responsable del Laboratorio de Microbiología de la
 Facultad de Odontología UNFV
 Presente. -

ASUNTO: Autorización para la recopilación de datos en el Laboratorio de
 Operatorio de la Facultad.
REFERENCIA: carta S/N DE GRADOS Y TITULOS (04/12/2018)

Es grato dirigirme a usted, para saludarla cordialmente y en atención al documento de la referencia, la Bachiller: **HURTADO ESCOBEDO RENE ALEXANDER**, quien se encuentra realizando su trabajo de tesis titulado:

"LA EFECTIVIDAD DE LA ACCION ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE CANELA (*Cinnamomum zeylanicum*) VS. NISTATINA EN CANDIDA ALBICANS IN VITRO"

En tal virtud, mucho agradeceré le brinde las facilidades del caso a la Bachiller, para la recopilación de datos en el Laboratorio de Operatorio, bajo su supervisión, la misma que permitirá desarrollar su trabajo de investigación.

Sin otro particular es propicia la oportunidad para expresarle los sentimientos de nuestra especial consideración.

Atentamente,




Mg. C.D. ELOY JAVIER MENDOZA GARCIA
 Director (*)
 Departamento Académico

10-12-2018

Se adjunta Protocolo de Tesis en 30 folios

Anexo 4. Fotografías de la obtención de la muestra microbiológica.

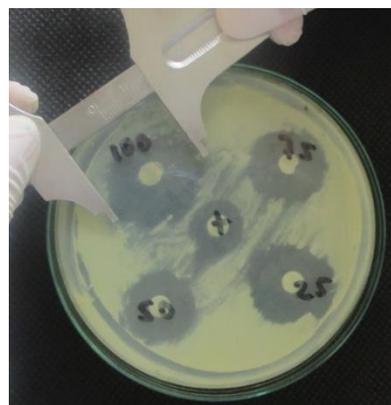
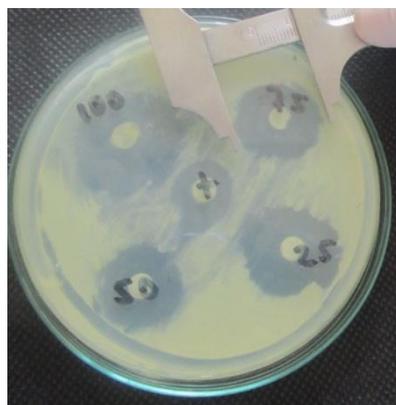
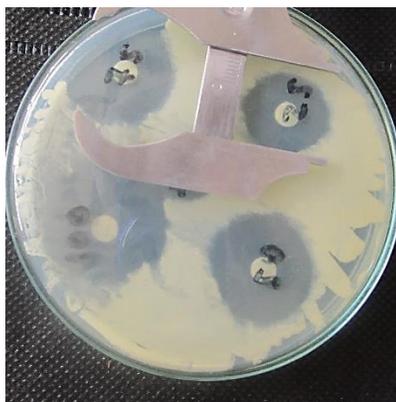


Anexo 4. Fotografías de la obtención de la muestra microbiológica.

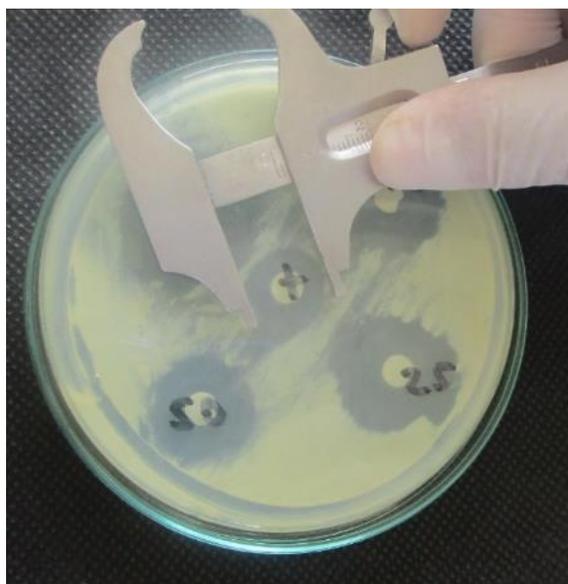
Anexo 5. Fotografías del método difusión en disco con el aceite esencial de canela.



Anexo 6. Fotografías de evaluación del efecto antifúngico del aceite esencial de canela frente a cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.



Anexo 7. Fotografías de evaluación del efecto antifúngico de la nistatina frente a cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.



Anexo 8. Matriz de consistencia

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Metodología
¿Cuál es la efectividad antifúngica in vitro del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela) al 25%, 50%, 75%, 100% versus Nistatina sobre cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231?	<p>Objetivo general:</p> <p>Comparar la efectividad antifúngica del aceite esencial in vitro de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela) al 25%, 50%, 75% y 100% versus Nistatina sobre cepa <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p> <p>Objetivos específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Conocer los valores de halo inhibitorio en mm del aceite esencial de canela al 25%, 50%, 75%, 100% y la nistatina a las 24 horas. • Conocer los valores de halo inhibitorio en mm del aceite esencial de canela al 25%, 50%, 75%, 100% y la nistatina a las 48 horas. • Comparar las medias del halo inhibitorio entre el aceite esencial de canela al 25%, 50%, 75%, 100% y la nistatina a las 24 horas. • Comparar las medias del halo inhibitorio entre el del aceite esencial de canela al 25%, 50%, 75%, 100% y la nistatina a las 48 horas. • Conocer las correlaciones de las medias del halo inhibitorio a las 24 horas y 48 horas del aceite esencial de canela al 25%, 50%, 75%, 100% y la nistatina. • Hallar las correlaciones de las medias del halo inhibitorio de las muestras emparejadas del aceite esencial de canela al 25%, 50%, 75%, 100% y la nistatina a las 24 y 48 horas. 	<p>Dado que el aceite esencial de canela al 25%, 50%, 75% y 100% antifúngicas que inhiben la formación de la <i>Candida albicans</i> es probable que el efecto antifúngico sea mayor que la nistatina.</p>	<p>Variable independiente: Aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> (canela) en diferentes concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%). Nistatina.</p> <p>Variable dependiente: Efectividad antifúngica del aceite esencial de <i>Cinnamomum zeylanicum</i> “canela”.</p>	<p>Tipo de investigación: Experimental, in vitro, prospectivo, longitudinal y comparativo.</p> <p>Muestra: La población de estudio estará conformada por 15 placas petri, con cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p> <p>Muestreo: Se realizó una asignación aleatoria simple.</p> <p>Población: Se realizó una muestra piloto de 5 placas petri inoculada con cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 para determinar el tamaño de la muestra.</p> <p>Unidad de análisis: Una placa petri inoculada con cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p>

Anexo 9. Pruebas paramétricas.

Tabla 7

Prueba de Normalidad.

	Estadístico	gl	Sig.
AEC25 % 24h	0,908	15	0,125
AEC50 % 24h	0,842	15	0,063
AEC75 % 24h	0,919	15	0,186
AEC100 % 24h	0,898	15	0,087
Nistatina 24h	0,974	15	0,917
AEC25 % 48h	0,926	15	0,238
AEC50 % 48h	0,900	15	0,096
AEC75 % 48h	0,940	15	0,385
AEC100 % 48h	0,957	15	0,637
Nistatina 48h	0,665	15	0,090

Luego de la estadística descriptiva se procede la aplicación de la estadística inferencial y para decidir la aplicación del tipo de prueba estadística para contrastar la diferencia de medias, se aplica la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk por ser muestras pequeñas ($n=15$). Y, observamos significancia mayor a 0,05 lo que indica que las medias de la muestra provienen de una distribución normal; por lo tanto, podemos utilizar pruebas paramétricas.

Figura VII. Cajas y bigotes.

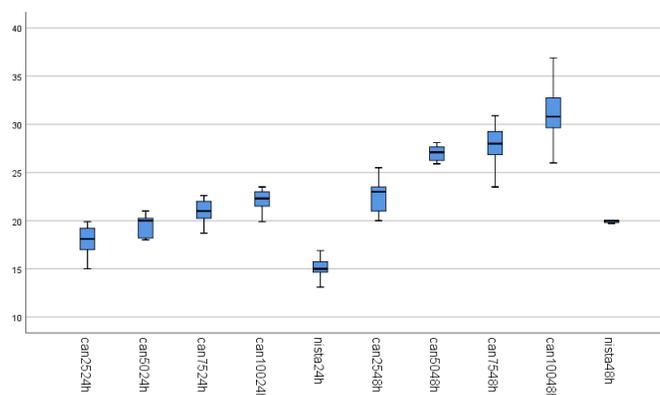


Tabla 8

Homogeneidad de varianza.

		Estadístico de Levene	gl 1	gl 2	Sig.
Grupo 24 h	Se basa en la media	1,043	4	70	0,391
	Se basa en la mediana	0,768	4	70	0,549
	Se basa en la mediana con gl ajustado	0,768	4	63,309	0,550
	Se basa en la media recortada	0,942	4	70	0,445
Grupo 48 h	Se basa en la media	9,041	4	70	0,301
	Se basa en la mediana	7,685	4	70	0,449
	Se basa en la mediana con gl ajustado	7,685	4	31,959	0,450
	Se basa en la media recortada	8,887	4	70	0,345

Para decidir el tipo de prueba en comparaciones múltiples aplicamos la prueba de homogeneidad de varianza de Levene y observamos significancia mayor a 0,05 lo que indica que si presentan homogeneidad de varianza a las 24 y 48 horas.