

**UNIVERSIDAD INTERAMERICANA PARA EL  
DESARROLLO**



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD  
CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**Efecto antifúngico in vitro del aceite esencial de clavo de  
olor (*Syzygium aromaticum*) frente a *Cándida albicans***

**ATCC 10231**

**AUTORES**

**Moran Andrade Gladis**

**Sicha Quispe Dora**

**Tasayco Yataco Nesquen José**

**Lima Perú  
2018**

## **DEDICATORIA**

A la Universidad Interamericana para el Desarrollo por darnos las facilidades, fortaleza y perseverancia para continuar siempre adelante y no rendirse a pesar de las circunstancias.

A toda nuestra familia que son pilar importante en nuestra vida por el gran cariño y apoyo incondicional.

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios, por iluminar nuestro camino, brindarnos fortaleza y sabiduría, permitirnos vencer los obstáculos que se presentaron en nuestras vidas.

A la Universidad Interamericana para el Desarrollo, Facultad Ciencias de la Salud, por darnos la oportunidad de llevar a cabo nuestro proyecto de investigación

## INDICE GENERAL

	Pág
Dedicatoria	
Agradecimiento	
Índice general	
Índice tablas	
Índice de figuras	
Resumen	
Abstract	
Introducción	1
<b>CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>2</b>
1.1. Descripción de la realidad problemática	2
1.2. Formulación del Problemas	3
1.2.1. Problema general	3
1.2.2. Problemas específicos	3
1.3. Objetivos	3
1.3.1. Objetivo general	3
1.3.2. Objetivos específicos	3
1.4. Justificación	4
<b>CAPÍTULO II: FUNDAMENTOS TEÓRICOS</b>	<b>5</b>
2.1. Antecedentes	5
2.1.1. Antecedentes Nacionales	5
2.1.2. Antecedentes Internacionales	7
2.2. Bases teóricas	11

2.3. Marco conceptual	18
2.4. Hipótesis y Variables	19
2.4.1. Hipótesis general	19
2.4.2. Hipótesis específicas	20
2.4.3. Operacionalización de variables e indicadores	20
<b>CAPÍTULO III: MÉTODODOLOGÍA</b>	<b>21</b>
3.1. Tipo y diseño de investigación	21
3.2. Descripción del método y diseño	21
3.2. Población y muestra	24
3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	24
3.4. Técnicas de procesamiento y análisis de datos	26
<b>CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS</b>	<b>27</b>
4.1. Presentación de resultados	27
4.2. Discusión	32
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>	<b>34</b>
5.1. Conclusiones	34
5.2. Recomendaciones	34
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>35</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>40</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Concentraciones del aceite esencial clavo de olor ( <i>Syzigium aromaticum</i> ) en los discos.	25
Tabla 2. Preparación de volúmenes para Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).	25
Tabla 3. Características organolépticas del aceite esencial del clavo de olor ( <i>Syzigium aromaticum</i> ).	27
Tabla 4. Componente de metabolitos secundarios presentes en el clavo de olor ( <i>Syzigium aromaticum</i> ).	27
Tabla 5. Determinación de solubilidad del aceite esencial del clavo de olor ( <i>Syzigium aromaticum</i> )	28
Tabla 6. Ensayo de actividad antimicótica del aceite esencial del clavo de olor ( <i>Syzigium aromaticum</i> ) frente a cultivos de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231 por el método de difusión del disco (kirby Bauer)	28
Tabla 7. Determinación del grado de sensibilidad de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231 a diferentes concentraciones del aceite esencial del clavo de olor ( <i>Syzigium aromaticum</i> )	30
Tabla 8. Análisis de varianza de (ANOVA) de la actividad antimicótica del aceite esencial del clavo de olor ( <i>Syzigium aromaticum</i> )	32

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Pág
Gráficas 1. Distribución de promedios de halos de inhibición en base al efecto del aceite esencial del clavo de olor ( <i>Syzigium aromaticum</i> ) frente a cultivos de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231	29
Gráfica 2. Gráfica del grado de sensibilidad de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231 a diferentes concentraciones del aceite esencial del clavo de olor ( <i>Syzigium aromaticum</i> ). (Duraffourd y Lapraz)	31

## RESUMEN

**Objetivo:** Determinar el efecto antifúngico in vitro del aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) frente a *Cándida albicans* ATCC 10231. **Método:** Estudio de tipo experimental, prospectivo y transversal. El aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) se obtuvo por destilación de arrastre de vapor de agua. Por el método de Lock se ensayó la marcha de solubilidad y fitoquímica. Se usó el método de Kirby Bauer para hallar la sensibilidad de *Cándida albicans* en función a la medida de los halos de inhibición y por dilución en medio líquido se halló la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). **Resultados:** Por cada 200 g de muestra de clavo de olor se obtuvo 2 mL de aceite esencial, se observó que es soluble en vaselina líquida y etanol, insoluble en agua, los componentes químicos presentes fueron taninos, glúcidos y alcaloide. Se halló que *Cándida albicans* presentó mayor sensibilidad según tamaño de formación de halos de inhibición al aceite esencial de clavo de olor en las concentraciones de 50% (26.0 mm) y menor sensibilidad en concentración del 15% (11.6 mm), seguida de las concentraciones de 100% (12.1 mm) y 25% (17.2mm) respectivamente siendo significativo al ser comparado con el grupo control ( $p < 0,05$ ). La CMI fue 15% y la concentración máxima inhibitoria fue 50%. **Conclusión:** El aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) presentó efecto antifúngico frente a *Cándida albicans*.

**Palabras claves:** *Syzygium aromaticum*, *Cándida albicans*, antimicótico.



## ABSTRACT

**Objective:** To determine the antifungal effect in vitro of the essential oil of clove (*Syzigium aromaticum*) against *Candida albicans* ATCC 10231. **Method:** Experimental, prospective and transversal type study. The essential oil of the clove (*Syzigium aromaticum*) was obtained by steam distillation. By the method of Lock, the march of solubility and phytochemistry was tested. The Kirby Bauer method was used to find the sensitivity of *Candida albicans* according to the measurement of the inhibition zones and, by dilution in liquid medium, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was found. **Results:** For each 200 g of clove sample, 2 mL of essential oil was obtained, it was observed that it is soluble in liquid petrolatum and ethanol, insoluble in water, the chemical components present were tannins, glucides and alkaloids. It was found that *Candida albicans* showed greater sensitivity according to size of formation of haloes of inhibition to the essential oil of cloves in the concentrations of 50% (26.0 mm) and lower sensitivity in concentration of 15% (11.6 mm), followed by the concentrations of 100% (12.1 mm) and 25% (17.2 mm) respectively, being significant when compared to the control group ( $p < 0.05$ ). The MIC was 15% and the maximum inhibitory concentration was 50%. **Conclusion:** The essential oil of the clove (*Syzigium aromaticum*) presented antifungal effect against *Candida albicans*.

Key words: *Syzigium aromaticum*, *Candida albicans*, antifungal.

## INTRODUCCION

Las infecciones micóticas superficiales son comunes en todo el mundo y son un problema de salud para la población en especial en países tropicales. La sobrepoblación, las malas condiciones higiénicas y el clima húmedo, han conducido al aumento de la prevalencia de estos patógenos. Estas micosis constituyen causa frecuente de consulta médica. Dentro de las infecciones por hongos, la *Cándida* es uno de los patógenos más comunes y en especial por la presentación de cuadros invasivos en pacientes inmunocomprometidos <sup>(1)</sup>.

La incidencia de infecciones fúngicas en especial por *Cándida albicans* adquiridas en la comunidad y en la nosocomial se han incrementado significativamente en las últimas décadas, acompañando el creciente número de pacientes de alto riesgo, particularmente en aquellos donde su sistema inmunitario es bajo. La mayoría de antifúngicos utilizados clínicamente tienen varios inconvenientes en términos de toxicidad, interacciones fármaco-fármaco, falta de eficacia fungicida, costo y emergencia de cepas resistentes causadas por uso frecuente de algunos de estos fármacos. A pesar de la introducción de nuevos fármacos antimicóticos todavía son limitadas en número. Por lo tanto, hay una gran demanda de nuevos agentes antifúngicos, lo que justifica la búsqueda intensa de nuevos medicamentos que sean más efectivos y tengan menor toxicidad que las existentes <sup>(2)</sup>.

## CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1. Descripción de la realidad problemática

El número de antifúngicos disponibles para tratar las micosis invasoras por hongos filamentosos es muy escaso, entre los de mayor uso tenemos los de tipo polieno los azoles, triazoles como itraconazol, fluconazol y nistatinas. La eficacia de éstos fármacos antifúngicos para el tratamiento de infecciones micóticas sistémicas graves es limitada, lo que puede explicarse por ausencia de técnicas que diagnostiquen la infección de forma precoz, toxicidad y limitaciones que presenta la dosificación de algunos antifúngicos como anfotericina B, escasas de alternativas terapéuticas, aparición de cepas resistentes a los antifúngicos. Se encuentran estudios en los que se ha reportado la actividad antidermatofítica del aceite esencial y otras fracciones orgánicas extraídas de plantas como *Magnolia liliflora*, evaluada contra varias cepas de hongos tales como *Microsporus canis*, *Trichophyton rubrum* y *T. metagrophytes*, hongos relacionados con infecciones de piel en humanos. En este mismo contexto, discuten la eficacia de los aceites esenciales de eucaliptus, lavanda, canela y menta contra microorganismos resistentes a los antibióticos de ambientes hospitalarios dentro de los que se contemplan bacterias como *S. aureus* y algunas especies del género *Cándida* <sup>(3)</sup>.

Al clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) se le confiere propiedades como antiséptico, analgésico, antiséptico, antibacteriano, carminativo y antifúngico. cuyo principal ingrediente activo es el eugenol (85-95 %); está compuesto además por acetileugeno,  $\alpha$  y  $\beta$  cariofilenos y pequeñas cantidades de ésteres, cetonas y alcoholes. Como antiséptico, la acción del aceite esencial es similar a un efecto bacteriostático; sin embargo, algunos de sus componentes químicos parecen tener propiedades bactericidas <sup>(4)</sup>.

Los aceites esenciales son productos naturales de valor e importancia económica. Su bioactividad se investiga por sus efectos farmacológicos, producidos por sus componentes químicos obtenidos por diversas técnicas físicas y químicas de las células vegetales <sup>(5)</sup>. Los estudios in vitro resultan ser útiles ya que aportan nuevos conocimientos de actividad biológica de productos vegetales como es en nuestro caso, el efecto antifúngico del aceite esencial del clavo de olor.

## **1.2. Formulación del problema**

### **1.2.1. Problema general**

1. ¿Tendrá efecto antifúngico in vitro el aceite esencial del clavo de olor (*Syzigium aromaticum*) frente a *Cándida albicans*?

### **1.2.2. Problemas específicos**

1. ¿Qué concentración del aceite esencial del clavo de olor (*Syzigium aromaticum*) tendrá mayor efecto antifungico in vitro frente a *Cándida albicans*?
2. ¿Cuáles serán los principales grupos de constituyentes químicos presentes en el aceite esencial clavo de olor (*Syzigium aromaticum*)?

## **1.3. Objetivos de la investigación**

### **1.3.1. Objetivo general.**

1. Determinar el efecto antifúngico in vitro del aceite esencial del clavo de olor (*Syzigium aromatum*) frente a *Cándida albicans*.

### **1.3.2. Objetivos específicos**

1. Determinar en qué concentración el aceite esencial del clavo de olor (*Syzigium aromaticum*) tiene mayor efecto antifungico in vitro frente a *Cándida albicans*.

2. Determinar cuáles son los principales constituyentes químicos presentes en el aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*).

#### **1.4. Justificación de la investigación**

Un aspecto que motiva investigar en este campo y en especial con los antimicóticos es el desarrollo de mecanismos de resistencia por algunas especies, se explica en parte porque la mayor parte de fármacos son fungistáticos y requieren administración prolongada en los tratamientos que permite que aparezcan clones resistentes. Ante este aumento de infecciones por hongos, se lleva a cabo una constante búsqueda de alternativas terapéuticas provenientes de las plantas medicinales como fuente de nuevos y variados agentes antimicóticos. Se reconoce que las acciones de los aceites esenciales dependen de sus propiedades fisicoquímicas <sup>(6)</sup>. Existe en el mercado un significativo número de fármacos productos de síntesis química, con la presente investigación se pretende aportar a los conocimientos actuales del uso terapéutico del aceite esencial del clavo de olor a la población y comunidad académica. La candidiasis causada por *Cándida albicans*, es una infección que está incrementando cada día, su afección no solo en pacientes inmunosuprimidos y hospitalizados sino también en aquellos que se exponen por circunstancias laborales y el hogar en donde viven. Esta investigación permitirá aportar que el aceite esencial extraída del clavo de olor tiene efecto antifúngico in vitro frente a *Cándida albicans*; de esta manera se contribuirá con nueva alternativa natural para tratar diversas afecciones micóticas en las personas.

## CAPÍTULO II: FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.1. Antecedentes

#### 2.1.1. Antecedentes Nacionales

**Gastelu V, et al. 2016.** Evaluaron el “Efecto antimicótico in vitro de aceite esencial de *Origanum vulgare*, sobre cepa de *Cándida albicans* ATCC 10231”. Seleccionaron cuatro especies diferentes de orégano, mediante destilación por arrastre de vapor obtuvieron los aceites esenciales; determinaron cualitativamente su composición química por Cromatografía de Gases, Espectrometría de Masas (CG/EM). Evaluaron in vitro la actividad antimicótica por pruebas de sensibilidad con el método de difusión por discos en cultivo de agar frente a *Cándida albicans*. Hallaron actividad antimicótica de todos los aceites a partir de las concentraciones de 12,5%. Concluyen que los aceites esenciales del *Origanum vulgare* de los diversos geotipos presentan diferencias en sus efectos antimicóticos. El aceite esencial obtenido del *Origanum vulgare* puede ser una alternativa terapéutica para el tratamiento de infecciones fúngicas <sup>(7)</sup>.

**Marca C. 2012.** Realizo la investigación “Actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” frente a *Cándida albicans* ATCC 6538”. Obtuvieron de la corteza el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn "canela" por destilación de arrastre de vapor. Utilizaron la técnica de Kirby Bauer, para determinar el grado de sensibilidad frente a *Cándida albicans* en función del tamaño de los halos de inhibición, usaron la técnica por dilución en medio líquido para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y por difusión en agar para determinar la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del aceite esencial. Demostraron que *Cándida albicans* presentó sensibilidad alta al aceite esencial. Hallaron que la CMI para *Cándida albicans* fue 0,01895 mg/ml y la CMF fue de 0,020529166 mg/ml. Concluyen que el aceite

esencial de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn presenta actividad antimicótica in vitro frente a *Cándida albicans* <sup>(8)</sup>.

**Cano C, et al. 2006.** Estudiaron la “Actividad antimicótica in vitro y la elucidación de algunos de los metabolitos del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña)”. Obtenido del distrito de Huacrapuquio ubicado a 2700 msnm, Provincia de Tarma. Obtuvieron el aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* por destilación de arrastre de vapor. Realizaron estudios físicoquímico y determinaron la composición química mediante técnica de cromatografía de gases (CG), obteniendo los siguientes monoterpenos: Pulegona, Mentona, Limoneno y Mirceno, a los que atribuyeron la actividad fungicida-fungistática. Por la técnica de agar en difusión, determinaron la actividad antimicótica, frente la inhibición del crecimiento de los hongos: *Trichophytun tonsurans*, *Trichophytun mentagophytus*, *Microsporun canis*. Hallaron los diámetros de la prueba de difusión de las cepas de: *Cándida albicans* y por dilución en tubo de agar de *Cándida albicans*, fueron de: 30 mm al 100 % del Aceite esencial de la muña y 35 mm al 50% del aceite esencial y los dermatofitos (*Trichophytun tonsurans*, *Trichophytun mentagophytus*, *Microsporun canis*), su crecimiento se inhibió con el aceite esencial <sup>(9)</sup>.

**Apaza S. 2015.** Realizó el estudio “Efecto antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Cándida albicans*”. Recolectaron la muña en el departamento de Puno, la obtención del aceite esencial se efectuó en Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Altiplano (UNA) – Puno. Las muestras de esputo se obtuvieron de pacientes con tuberculosis del Hospital Regional “Manuel Núñez Butrón”, la identificación, el aislamiento y determinación del efecto antimicótico, se efectuó en laboratorio de Microbiología y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA – Puno. Determinaron el efecto antimicótico

mediante mediciones de 105 halos de inhibición, usaron el método de Kirby – Bauer (antibiograma antimicótico), utilizaron cepa clínica de *Cándida albicans* aislados de pacientes con tuberculosis. Los grupos de estudio fueron concentraciones de 1 mL/25 µL (T1), 1 mL/50 µL (T2), 1 mL/100 µL (T3), 1 mL/150 µL (T4), 1 mL/200 µL (T5), 1 mL/250 µL (T6), donde (mL/µL) fue la proporción de agua destilada y aceite de muña respectivamente), un grupo control positivo (Fluconazol), y un grupo control negativo (agua destilada estéril). Emplearon el análisis estadístico ANVA para determinar el efecto antimicótico y Tukey para la concentración inhibitoria adecuada y la evaluación de los halos de inhibición. Hallaron; la media de los halos de inhibición del T1 fue de 3,4mm (0,0 – 4,9); del T2 11,1mm (10,1 – 11,9); del T3 15,7mm (14,4 – 16,9); del T4 19,0mm (17,9 – 20,0); del T5 24,1mm (23,4 – 25,2); del T6 29,2mm (28,3 – 30,0); y del grupo de Fluconazol 25,5mm (24,8 – 26,8). No obtuvieron halos de inhibición en el grupo de control negativo. Encontraron diferencia significativa entre el T1 – T6 y el grupo de Fluconazol a ( $p < .0001$ ), a un  $\alpha = 0.05$ . Concluyen que de los seis tratamientos, el sexto demostró una concentración inhibitoria adecuada de 1 mL/250 uL (T6), el cual fue superior con diámetro de halo de inhibición mayor, al comparar con Fluconazol (control positivo), demostraron que el aceite de *Minthostachys mollis* tiene efecto antimicótico sobre cepas de *Cándida albicans*<sup>(10)</sup>.

### 2.1.2. Antecedentes Internacionales

**Moura J, et al. 2012.** Estudiaron la “Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Cándida tropicalis* de aislados clínicos”, utilizaron el método de difusión en disco, la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración fungicida mínima (CFM). La difusión en disco, con los aceites esenciales de *Cinnamomum zeylanicum*, *Eugenia caryophyllata* y *Origanum vulgare*



obtuvieron mayor valor de inhibición. La CIM y CFM del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* fue 512 y 1024 µg/mL respectivamente, y la anfotericina B fueron idéntico, 2 µg/mL. Concluyen que el aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* tiene potente actividad antifúngica <sup>(11)</sup>.

**Carranza L, et al. 2016.** Evaluaron el “Efecto anti fúngico “in vitro” de aceite esencial y EARO (Extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis*) en concentraciones al 100%,75%,50% y 25% sobre *Cándida albicans* cepa ATCC 10231”. Sembraron en agar Sabouraud por el método de difusión en pocillos con las soluciones experimentales y se incubó durante 18 h a 37° C, luego se procedió a la medición de los diámetros del halo de inhibición. Los resultados de la medición fue en promedio de 5,8 mm en 15% de EARO, 9,1 mm en 20% de EARO, 10,66 mm en 25% de EARO, 11,83 mm en 50% de EARO, 12,5 mm en 75% de EARO, 14,73 mm en 100% de EARO, el halo de inhibición generado por el aceite esencial fue de 9,2 mm. Comprobaron que el extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* “Romero”, presentó efecto anti fúngico sobre *Cándida albicans* cepa ATCC 10231 <sup>(12)</sup>.

**Chamba L, et al. 2015.** Evaluaron el “Efecto antifúngico del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), sobre cepas de *Cándida albicans* en comparación con la nistatina estudio in vitro”. Obtuvieron el aceite esencial mediante técnica de arrastre a vapor en diferentes concentraciones. Activaron la cepa micológica y la preparación del inóculo con una turbidez de 0,5 en la escala Mc Farland, la siembra se realizó en 19 cajas petri con el medio de cultivo Dextrosa Sabouraud a una temperatura de 37°C luego procedieron a la colocación de discos estériles impregnados de las diversas concentraciones de aceites esenciales (25%, 50%, 75%, 100%), usaron nistatina como control positivo y tween 80 como control negativo. Incubaron el material durante 72 horas para la posterior medición de los halos de inhibición mediante

una regla pie de rey. Concluyen que existieron discrepancias significativas por grupo de estudio según la prueba de Kruswal <sup>(13)</sup>.

**Lozada B, al et. 2012.** Evaluaron el “Efecto antifúngico in vitro de cinco aceites esenciales (AEs) (AE1, AE2, AE3, AE4 y AE5) extraídos de *Lippia origanoides*, *L. citriodora* y *L. alba* sobre aislados de monilia (*Moniliophthora roreri*)” obtenidos de los frutos de cacao provenientes de San Vicente de Chucurí, Santander, Colombia. Las especies vegetales de *Lippia* fueron recolectadas en cinco localidades colombianas. Los aislados de monilia (M1, M2, M3, M4 y M5) se caracterizaron por su morfología, germinación y crecimiento en medios de cultivo. El efecto antifúngico de diversas concentraciones de los AEs se evaluó contra el aislado M2 y la cepa de *M. roreri* (ATCC 64239), para identificar su efecto sobre la germinación y la inhibición del crecimiento micelial. Los AEs estudiados inhibieron 100% de la germinación y del crecimiento micelial, usaron concentraciones de 800 - 1000 µg/ml. Concentraciones de 200µg/ml mostraron efecto antifungico, siendo los más activos los AEs obtenidos de *L. origanoides* (AE2 y AE3). Sobre la susceptibilidad se observaron en general más susceptibilidad el aislado M2 que la cepa ATCC. Los AEs de *L. origanoides* son candidatos para ser utilizados como probables biofungicidas en el control de la moniliasis. Es necesario estudios futuros orientados a determinar la actividad in vivo antifúngica de estos AEs y sus principales componentes <sup>(14)</sup>.

**Gomez C, et al. 2010.** Realizó el estudio “Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de *Myrciantes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku yuyo), especies reportadas en Peguche – Imbabura, sobre *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Cándida albicans* causantes de enfermedades bucofaríngeas.” Realizaron identificación botánica, métodos fitoquímicos para elaborar los extractos usaron solventes de polaridad creciente hexano, etanol, agua. Efectuaron pruebas

microbiológicas in vitro mediante la técnica de difusión en agar. El mejor extracto fue *Myrcianthes hallii* (arrayán) en etanol, que inhibió a *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*, consideraron al extracto de gran espectro. En la etapa final se identificaron metabolitos secundarios del extracto, mediante ensayos fitoquímicas preliminares, hallaron la presencia de flavonoides, taninos, alacloides y saponinas. De esta manera se considera la *Myrcianthes hallii* (arrayán) para tratar problemas bucofaríngeas <sup>(15)</sup>.

**Suarez E. 2012.** Estudiaron la “Actividad antibacterial que manifiestan los aceites esenciales de: Zacate de limón (*Cymbopogon Citratus* DC. Stapf.), Eucalipto (*Eucalyptus ssp.*) y Clavo de olor (*Syzygium aromaticum* L.) solos y en combinación contra la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853”. Usaron el método de arrastre de vapor la la obtención de aceites esenciales. Los aceites se almacenaron en recipientes de vidrio (vol. 125 mL) a 4 °C. La actividad antibacterial se realizó por método de Kirby-Bauer en réplicas de 10 para cada uno de los aceites esenciales; en cada réplica usaron los siguientes volúmenes 5, 10 y 15 µL y como control positivo, Polimixina B (300 units). Hallaron que el aceite esencial de Eucalipto no presentó actividad antibacteriana a un volumen de 5µL, a un volumen de 10µL si mostró actividad antibacteriana intermedia contra la cepa y volumen de 15µL mostró actividad positiva. La combinación de aceite esencial mostró actividad intermedia a volúmenes de 5µL y 10µL y positivo a 15µL. Los aceites esenciales de Zacate de limón y Clavo de olor no mostraron actividad contra la cepa, en ninguno de los volúmenes estudiados. Se evidenció la actividad antibacterial de los aceites esenciales principalmente el aceite esencial de Eucalipto procedente del área periurbana del municipio de Ciudad Sandino, contra la cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 <sup>(16)</sup>.

## **2.2. Bases teóricas**

### **2.2.1. Aceites esenciales (AE)**

Los aceites esenciales son mezclas de lípidos o grasas peso molecular bajo muy hidrofóbicas, por lo general menos densos que el agua, volátiles, aromáticos, son producidos por el metabolismo secundario de las plantas, formados por terpenos, en particular monoterpenos y sesquiterpenos, así como sus derivados oxigenados, aldehídos, alcoholes, ácidos y ésteres terpénicos que se denominan respectivamente, monoterpenoides y sesquiterpenoides <sup>(17)</sup>.

Los aceites esenciales son fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y son de importancia en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes). Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas. En su gran mayoría son de olor agradable <sup>(18)</sup>.

#### **2.2.1.1. Propiedades antibacterianas y antifúngicas de los aceites esenciales.**

El aceite esencial con gran espectro de acción tenemos al tomillo, seguido de orégano, clavo, nuez moscada, geranio y pimienta negra. La actividad biológica de los aceites esenciales estaría relacionada con los componentes de los volátiles de los aceites de las plantas y sus grupos funcionales, y una posible interacción sinérgica entre sus componentes. Los componentes con estructura fenólica como el carvacrol, el eugenol y el timol, fueron muy efectivos frente a los microorganismos fúngicos en estudio in vitro. La aplicación de aceites esenciales es un muy atractivo para controlar enfermedades tanto en cosecha como en postcosecha. Estos materiales son mezclas complejas de componentes volátiles producidos en diversas partes de las plantas, y han sido reconocidos por poseer diferentes funciones, incluyendo resistencia a plagas y

enfermedades; algunos aceites esenciales, así como sus componentes, han demostrado poseer propiedades antifúngicas y antibacterianas <sup>(19)</sup>.

### 2.2.2. Clavo de olor

Pertenece a la familia Myrtaceae (Mirtáceas), su nombre científico es *Syzygium aromaticum* o *Eugenia caryophyllus*. Se origina en los climas tropicales, es un árbol grande que puede alcanzar los 15 m de altura, los botones que aún no abren se cosechan y seca, esos son los indicados para comercializar. Fue utilizado en la antigüedad para calmar el dolor dental y en la actualidad se conoce que sus propiedades son atribuidas a su aceite esencial, este aceite se obtiene mediante un proceso llamado destilación por arrastre de vapor <sup>(20)</sup>.

#### 2.2.2.1. Clasificación taxonómica

*Reino: Plantae*

*Clase: Magnoliosida*

*Orden: Myrtales*

*Familia: Myrtaceae*

*Género: Syzygium*

*Especie: aromaticum*

#### 2.2.2.2. Estructura

- **Flores:** Tiene 4 pétalos, su cáliz posee un tubo de 1,5 cm de longitud y con pedículos pequeños <sup>(19)</sup>.
- **Fruto:** Con una longitud que oscila de 2 a 2,5 cm y con una semilla <sup>(19)</sup>.
- **Tallo y hojas:** El tronco posee un diámetro de 40 cm y las hojas de forma elíptica a lanceolada, con una longitud de 12 cm y un ancho de 3,5 cm <sup>(19)</sup>.

### 2.2.2.3. Composición química del clavo de olor

El Eugenol (2-metoxi-4alil fenol) y el aldehído cinámico (3-fenil-2-propenal), son los principales constituyentes volátiles del clavo y de la canela, con alta actividad antimicrobiana <sup>(20)</sup>.

El tomillo y el orégano poseen terpenos Carvacrol, p-cimeno y timol como componentes volátiles y de alta actividad inhibitoria sobre bacterias, hongos y levaduras, siendo el timol el que se encuentra en mayor proporción en ambas especias. La composición del aceite esencial de clavo de olor según, contiene Eugenol en un 83.6%, acetato de Eugenilo en un 11.6% y cariofileno al 4,2% <sup>(20)</sup>.

Las esencias son mezclas complejas en cuya componentes se encuentran los hidrocarburos como terpenos, aldehídos, ésteres y compuestos fenólicos, los cuales son responsables del aroma que caracteriza a los aceites esenciales <sup>(21)</sup>.

La actividad antifúngica de los aceites esenciales se asocia al contenido de fenoles monoterpenos especialmente el de tomillo (*Thymus vulgaris* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) y clavo (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) <sup>(22)</sup>.

Su mecanismo de acción se asocia con la capacidad de interactuar con el citoplasma del patógeno y su modo de acción parece estar estrechamente relacionado con la solubilidad de cada compuesto <sup>(21)</sup>.

### 2.2.2.4. Compuestos activos

- **Aceite esencial.** Líquido amarillento, olor característico e intenso, sabor picoso y fresco, soluble en alcohol no en agua <sup>(22)</sup>.
- **Fitoesteroles.** Son esteroides de las plantas es decir que tiene un origen vegetal, aquí tienen la misma función que cumple el colesterol en los animales que al formar parte de la membrana celular repara y forma nuevas células que se llama bloque de construcción <sup>(22)</sup>.
- **Taninos.** Son compuestos fenólicos es decir en su estructura tienen mínimo un grupo fenol, un grupo funcional y un anillo aromático, le

proveen a la planta una defensa contra patógenos. Tiene efecto astringente <sup>(22)</sup>.

- **Flavonoides.** Son compuestos fenólicos, pigmentos que contienen las plantas y que a su vez va a protegerla de daños oxidantes hacia a ella. En su estructura química se encuentra varios grupos hidroxilo fenólico <sup>(22)</sup>.

#### **2.2.2.5. Mecanismo de acción**

La acción del aceite esencial del clavo de olor lo atribuye a los compuestos fenólicos ya que desnaturalizan las proteínas de la membrana del microorganismo reaccionando con los fosfolípidos y así cambian la permeabilidad del celular produciendo su muerte. Para que exista dicha labor del aceite en el microorganismo va a influir en gran magnitud la forma o método utilizado para la extracción ya que variará su composición y por ende acción <sup>(22)</sup>.

#### **2.2.2.6. Método de extracción del aceite esencial**

La extracción del aceite esencial se aplicó el método de destilación por arrastre de vapor de los capullos aún no abiertos de las flores o de las hojas del árbol, el aceite es más pesado que el agua y tiene un color amarillo que se vuelve pardo cuando entra en contacto con el aire, su aroma es fuerte y dulzón <sup>(3)</sup>.

#### **2.2.3. Hongos**

Crecen en una gran variedad de hábitats, se han descrito alrededor de 100,000 especies de hongos, pero la biodiversidad del reino Fungi aún no se conoce totalmente. Los hongos son un grupo de microorganismos eucariotas que incluyen a las levaduras, los mohos, así como las setas (macromicetos). Son productores de esporas, y su reproducción puede ser sexual y/o asexual, presentan crecimiento levaduriforme por lo general dan lugar a colonias lisas en medios de cultivo sólido, las cuales son agregados de células individuales a los que se les denomina levaduras. Existen alrededor de 1,500 especies de levaduras descritas, son microorganismos

unicelulares, algunas especies pueden ser multicelulares a través de la formación de pseudohifas. El tamaño de la levadura varía entre especies, típicamente miden entre 3 y 4  $\mu\text{m}$  de diámetro, puede haber algunas especies que alcancen los 40  $\mu\text{m}$  <sup>(23)</sup>.

### **2.2.3.1 Reino Fungí**

Organismos diferenciados estructural y morfológicamente de las bacterias, animales y vegetales. A lo largo de la historia los seres humanos han implementado el uso de los hongos a su vida cotidiana, para la fermentación y maduración de quesos, embutidos, pan, alcohol. Se emplea los hongos para producir ácido glutámico, cítrico, antibióticos y antifúngicos <sup>(24)</sup>.

### **2.2.3.2. *Cándida albicans***

Es una levadura gram positiva, aerobia, gemante, capaz de desarrollar pseudofilamentos y producir clamidosporas (tipo de spora asexual). Sus colonias son de tamaño mediano, húmedas, cremosas que tienen un olor dulzón y en medios de cultivos cromogénicos adoptan coloración verde esmeralda. La membrana está constituida por una doble capa de diversos fosfolípidos entre los que destacan la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina <sup>(25)</sup>.

*Cándida albicans*, es la especie que comúnmente produce infecciones orales, comprendiendo hasta el 70 % de los aislados, éstas son cada vez más prevalentes, especialmente en pacientes hospitalizados, niños, adultos y adultos mayores. La resistencia de *Cándida* sp representa un reto terapéutico que deja un menor número de posibilidades para el tratamiento de estas infecciones que se caracterizan, a su vez, por una alta morbimortalidad <sup>(26)</sup>.



### **2.2.3.3. Características del género *Candida*.**

Los cultivos de *Candida* crecen como levaduras ovoides en gemación (3 a 6 µm de tamaño). También forma pseudohifas cuando las yemas continúan su crecimiento, pero sin desprenderse, para generar cadenas de células alargadas pinzadas o constreñidas en los tabiques entre las células. Las especies de *Candida* producen colonias blandas, lisas, de colores cremosos con olor a levadura y las pseudohifas se manifiestan como crecimiento bajo la superficie del agar <sup>(27)</sup>.

### **2.2.3.4. Aislamiento**

El género *Candida* se utiliza el cultivo en agar dextrosa Sabouraud con y sin cicloheximida. Crecimiento de colonias levaduriformes, de bordes enteros, limitadas, poco elevadas y de color blanco. Crecen en un promedio de 3 a 5 días a temperatura ambiente. Al examen microscópico, se observan múltiples levaduras, redondas u ovoides, únicas o en gemación y en ocasiones formando pseudomicelio <sup>(27)</sup>.

### **2.2.3.5. Factores de virulencia**

#### **a. Adherencia**

En la superficie de la *Candida* encontramos moléculas implicadas a la adherencia, que son las adhesinas. Dichas adhesinas incluyen las monoproteínas, las adhesinas se unen a los receptores, los cuales son el componente de la célula huésped con que la adhesina interactúa <sup>(28)</sup>.

#### **b. Morfología**

Crecen en varios estadios morfológicos, como gemaciones de la célula de levadura, pseudohifas e hifas filamentosas, que reduce la probabilidad de fagocitosis <sup>(28)</sup>.

### **c. Dimorfismo fenotípico**

Indican que se refiere a la modificación antigénica a través de frecuentes cambios en la superficie celular <sup>(28)</sup>.

### **c. Enzimas hidrolíticas**

Contribuyen a la destrucción de los tejidos del huésped <sup>(28)</sup>.

### **d. Fosfolipasas**

Son aquellas enzimas que hidrolizan fosfolípidos en los ácidos grasos. Existen 4 tipos (A, B, C, D). Se cree que pueden contribuir al daño de la membrana del huésped <sup>(28)</sup>.

### **e. Secreción de aspartil proteasa**

En estudios dicen que es confuso el papel exacto de esta enzima, sin embargo, se conoce la capacidad de degradar proteínas extracelulares de la matriz del huésped. Se han encontrado 10 diversos genes que codifican para la Candida SAP <sup>(28)</sup>.

## **2.2.3.6. Fármacos Antifúngicos**

La resistencia a los medicamentos por parte del hospedero hace que constantemente se requiera nuevas alternativas de fármacos, capaces de inhibir y combatir patologías; es por eso que es necesaria la investigación de nuevos productos capaces de actuar frente a levaduras que han desarrollado formas de resistencia. Se requiere encontrar medicamentos capaces de provocar acciones fungicidas o fungistáticos sin provocar daño al organismo humano. Agente antifúngico es toda aquella sustancia que actúa directamente sobre la membrana plasmática del microorganismo deteniendo su desarrollo, desactivando su crecimiento y retirando su capacidad de supervivencia <sup>(29)</sup>.

#### 2.2.4. Agar Sabouraud

El agar Sabouraud es un medio de cultivo que por sus características funciona como medio de enriquecimiento para hongos y que, en caso de contener cloranfenicol u otro antibiótico, se convierte en un medio selectivo para los mismos. El medio contiene peptonas y una elevada concentración de glucosa que favorece el crecimiento de los hongos sobre las bacterias. Es utilizado para el cultivo de hongos, especialmente dermatofitos, aunque también pueden desarrollarse en él cierto tipo de bacterias filamentosas tales como Nocardia. Fue utilizado por primera vez por Raymond Sabouraud en 1892. Más tarde Chester W. Emmons mejoró el medio acercando el pH al neutro y disminuyendo el nivel de glucosa para permitir el crecimiento de otros sub cultivos de hongos <sup>(30)</sup>.

### 2.3. Marco conceptual

**1. Aceite esencial.** Líquido oleoso volátil, generalmente insaponificable, algo soluble, contiene terpenos, alcoholes, cetonas, fenoles, ácidos, aldehídos, éteres, se encuentran generalmente en las flores, hojas y tallos de plantas.

**2. Solubilidad:** Los aceites esenciales suelen ser insolubles en agua (aunque hay ciertas esencias que son parcialmente solubles porque alguno de sus componentes se solubiliza, como por ejemplo los fenoles).

**3. Antimicótico.** Sustancia que tiene la capacidad de evitar el crecimiento de algunos tipos de hongos.

**4. Candidiasis.** Infección producida por el género Cándida.

**5. Candidiasis genital:** una de las más habituales, afecta a la mucosa vaginal y/o al endocérvix, provocando la aparición de flujo espeso y blanquecino y la aparición de enrojecimiento, quemazón e hipersensibilidad.

**6. Concentración mínima inhibitoria (CMI).** Concentración mínima de una sustancia necesaria para impedir el crecimiento microbiano.

**7. Cepa.** Conjunto de virus bacterias u hongos que tienen el mismo patrimonio genético.

**8. Destilación.** Separación de una mezcla de varios componentes aprovechando sus distintas volatilidades, o bien separar los materiales volátiles de los no volátiles.

**9. Destilación por arrastre de vapor con agua.** Destilación por medio de una corriente de vapor que arrastra selectivamente algunos compuestos de la mezcla.

**10. Hongo.** Organismo eucariota que pertenece al reino fungi.

**11. Inhibición.** Impedir o reprimir el ejercicio de facultades o hábitos.

**12. Inmunosupresión.** Disminución o anulación de la respuesta inmunológica del organismo mediante tratamiento médico u otras causas.

**13. Levadura.** Hongo unicelular redondeado u ovoide que se reproduce sexual o asexualmente.

**14. Micosis.** Enfermedad infecciosa producida por hongos microscópicos que puede afectar a cualquier parte del organismo.

**15. Planta medicinal.** Especie vegetal que contiene en toda o en alguna de sus partes constitutivas, principios activos útiles para combatir enfermedades.

## **2.4. Hipótesis y variables**

### **2.4.1. Hipótesis general**

1. El aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) tiene

efecto antifúngico in vitro frente a *Cándida albicans*.

#### 2.4.2. Hipótesis específicas

1. La concentración al 50% del aceite esencial del clavo de olor (*Syzigium aromaticum*) tienen mejor efecto antifúngico in vitro frente a *Cándida albicans*.
2. Los principales constituyentes químicos del aceite esencial del clavo de olor (*Syzigium aromaticum*) son alcaloides, taninos y glúcidos.

#### 2.4.3. Operacionalización de variables e indicadores

Variables	Definición conceptual	Dimensión o aspecto	Indicadores
<p><b>variable independiente</b></p> <p>Aceite esencial del clavo de olor</p>	<p>El clavo de olor es un árbol que puede alcanzar hasta los 15 m de altura pertenece a la familia Myrtaceae su nombre científico es <i>Syzigium aromaticum</i>. Se origina en los climas tropicales, su aceite esencial se suele usar para calmar el dolor dental, este aceite se obtiene mediante un proceso llamado destilación por arrastre de vapor, su principal componente es el eugenol.<sup>(19)</sup></p>	<p>Constituyentes químicos</p>	<p>Taninos Alcaloides Glúcidos</p>
<p><b>Variable dependiente</b></p> <p>Efecto antimicótico</p>	<p>Actividad antimicótica es la capacidad o propiedad que tiene toda sustancia natural para evitar el crecimiento de algunos tipos de hongo.</p>	<p>Muestras de cepas de <i>Cándida albicans</i> ATCC 10231</p>	<p>Porcentaje de inhibición antimicótica.</p>

## CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

### 3.1. Tipo y nivel de la investigación

El presente estudio es un estudio experimental, prospectivo, transversal de nivel aplicado.

**a. Prospectivo:** Porque se realizó del presente al futuro

**b. Transversal:** Porque se realizó una sola medida

**c. Experimental:** Porque se manipuló la variable independiente y se trabajó con grupo control

### 3.2. Descripción del método y diseño de la investigación

#### 3.2.1. Recolección, identificación y preparación de la muestra del clavo de olor (*Syzigium aromaticum*).

La muestra del clavo de olor (*Syzigium aromaticum*) fue obtenido en el mercado “Mayorista de la Parada” distrito de La Victoria, provincia de Lima, se compró 1000 gramos de muestra, fue seleccionada, se realizó la desinfección de las semillas de uno en uno a temperatura 37°, verificando que no tenga productos u objetos que altere el desarrollo de la investigación, fueron almacenados en papel Kraft para su traslado y conservación. Para la extracción del aceite esencial se usó un molino, para reducir el tamaño del clavo de olor y facilidad la extracción, posteriormente fue almacenado en papel kraft.

#### 3.2.2. Método de destilación por arrastre de vapor / también conocida como hidrodestilación (HD)

Para la obtención de la muestra se utilizó 1000 gramos, se coloca aproximadamente 200 gramos de la muestra molida en cada destilación. Luego se procede a llenar agua el balón destilador; previa instalación del conducto refrigerante, haciendo circular el agua a través del mismo y se

realiza calentamiento hasta desprendimiento de un líquido inmiscible conteniendo vapor de agua condensada y el aceite esencial, siendo recolectados en un beacker, para posteriormente decantar y obtener la muestra del aceite y guardar en un frasco de vidrio color ámbar a temperatura ambiente.

### **3.2.3. Determinación de los principales grupos de metabolitos secundarios.**

Se realizó las siguientes pruebas en el aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*).

#### **a) Determinación de taninos**

**Gelatina.** En 1 mL de muestra se agrega gotas de reactivo en donde se observa en el fondo un precipitado de color blanco que confirma la presencia de taninos.

**Cloruro férrico.** En la muestra se agregó gotas de cloruro férrico observándose una coloración verde el cual nos indica presencia de taninos.

#### **b) Determinación de glúcidos**

**Reactivo de benedict.** En una muestra problema se agregó gotas del reactivo de benedict, se calentó de 5 a 10 min en baño maria en donde aparece la coloración de rojo ladrillo que indica presencia de azucares reductores.

#### **c) Determinación de alcaloide**

**Reactivo de Dragendorff.** En la muestra se agregó unas gotas de este reactivo en donde se observó la aparición de un precipitado de color rojo naranja el cual nos indica presencia de alcaloides.

**Reactivo de Mayer.** En la muestra se agregó unas gotas del reactivo mayer en donde se observó la aparición de un precipitado de blanco que confirma presencia de alcaloides.

### 3.2.4. Preparación de la dilución

#### a. Método de Kirby Bauer (difusión en disco)

El aceite esencial de clavo de olor, se diluyó con vaselina líquida para obtener las concentraciones de 15%, 25%, 50% y 100%, teniendo en cuenta la siguiente fórmula. Las cuales fueron colocadas en discos, también se preparó discos con la dilución del aceite esencial de clavo de olor con el solvente (vaselina líquida) y se colocaron en las cajas Petri.

#### b. Cálculo para cada porcentaje:

<p>Fórmula</p> $C1 \times V1 = C2 \times V2$	<p>Ejemplo al 15%</p> $100\% \times v1 = 15\% \times 1\text{ml}$ $v1 = 0.15\text{ml de AE}_s$
--	---

### 3.2.5. Determinación de la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial del clavo de olor (*Syzigium aromaticum*) frente a cepas de *Cándida albicans*.

#### a) Cepas de *Cándida albicans*

Las cepas de *Cándida albicans* ATCC 10231 Fue adquirido con fines de estudio experimental del hospital Edgardo Rebagliati conservado a temperatura ambiente.

#### b) Preparación de los medios de cultivo

##### Métodos diagnósticos convencionales

El medio de cultivo agar Sabouraud fue preparado según las instrucciones del fabricante en este caso fue 6.5 gramos para 100ml, la preparación se realizó en un matraz Erlenmeyer que fue llevada a la cocinilla hasta obtener una mezcla homogénea en estado de gelificación fue llevado al proceso de esterilización.



Luego de este proceso el preparado fue distribuido de manera equilibrada en las placas Petri, a razón de un espesor de 5 mm por placa aproximadamente.

**c) Desactivación de las cepas *Cándida albicans*.**

Con ayuda del asa de siembra se inocula las cepas de *Cándida albicans* en las placas de agar sabouraud utilizando mecheros para evitar la contaminación.

**d) Aplicación de los discos a las placas inoculadas con cepas de *Cándida albicans*.**

Se procedió a colocar en cada placa reactivada con cepas de *Cándida albicans* los respectivos discos (dos discos por placa) embebidos cada uno en 1ml de las sustancias de clavo de olor a concentraciones de “15% 25%, 50% y 100%”.

**e) Incubación**

Posteriormente se empaqueta con papel kraft las placas Petri con los cultivos, y se deja en incubación a temperatura ambiente durante 24 horas.

**3.3. Población y muestra**

**3.3.1. Población**

Cepas de *Cándida albicans*.

**3.3.2. Muestra**

12 placas Petri con cultivos de *Cándida albicans* a una temperatura de 25 °C y 60 % de humedad, las 24 horas cubiertas con papel kraft.

**3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

**3.4.1 Técnica**

Observación directa.

**3.4.2 Instrumento**

De los resultados obtenidos de cada muestra se registraron los datos de los halos formados en los cultivos en una ficha formulada para tal fin, esta actividad fue realizada de forma manual y visual con la ayuda de un vernier o regla pie de rey, la lectura consistió en medir

los halos de inhibición alrededor del disco, siendo esta zona directamente proporcional a la actividad de las diferentes concentraciones del aceite.

**Tabla 1:** Concentraciones del aceite esencial clavo de olor (*Syzigium aromaticum*) en los discos.

Porcentaje	Volumen aceite	Solvente (vaselina liquida)	N° Discos
15%	0.15ml	0.85ml	3
25%	0.25ml	0.75ml	3
50%	0.50ml	0.50ml	3
100%	1ml	0.0ml	3

**Tabla 2:** Preparación de volúmenes para Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

Porcentaje	Volumen aceite	Solvente (vaselina liquida)	Volumen total
15%	0.15ml	0.85ml	1ml
25%	0.25ml	0.75ml	1ml
50%	0.50ml	0.50ml	1ml
100%	1ml	0.0ml	1ml

Se lleva a incubación por un espacio de 24 horas a temperatura ambiente. Luego los diferentes tratamientos se compararon entre los porcentajes

15%, 25%,50%,100%. Al terminar las 24 horas se observó y se comparó el desarrollo de los halos al tratamiento a diferentes concentraciones 15%, 25%, 50%, 100%.

### **3.5. Técnicas de procesamiento y análisis de datos**

En el presente trabajo de investigación se calculó la media y desviación estándar que son presentadas en tablas y gráficas, para establecer la distribución de los datos recolectados a través de medidas de tendencia central, forma, dispersión y posición. Los datos fueron procesados en el programa estadístico SPSS, y se utilizó el Análisis de Varianza (ANOVA), ya que permite la comparación de las puntuaciones medias entre dos o más grupos muestrales.

## CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

### 4.1. Presentación de resultados

**Tabla 3.** Obtención y características organolépticas del aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*).

Clavo de olor	Aceite esencial obtenido	Descripción	Características organolépticas
1000g	10 mL	Aspecto	Líquido translúcido
		Color	Marrón
		Olor	Característico
		Sabor	Picante

Fuente: Elaboración propia

Mediante el método de destilación por arrastre de vapor de agua, a partir de 200g de clavo de olor con cinco destilaciones de un total de 1000g de muestra se logró obtener un total del aceite esencial puro de *Syzygium aromaticum* de 10ml. En la tabla 3 se observa las características organolépticas del aceite obtenido.

**Tabla 4.** Principales grupos de constituyentes químicos presentes en el clavo de olor (*Syzygium aromaticum*).

Metabolito secundario	Reactivo utilizado	Resultados
Taninos	Cloruro férrico	(+)
	Gelatina	(+)
glúcidos	Benedict	(+)
Alcaloide	Dragendorff	(+)
	Mayer	(+)

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 4 se aprecia que los principales constituyentes químicos del aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) según el análisis cualitativo de reacciones de coloración y precipitación son taninos, glúcidos y alcaloides.

**Tabla 5.** Determinación de solubilidad del aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*)

N°	Solvente	Resultado
1	Agua	-
2	Vaselina líquida	+
3	Etanol	+

Fuente: Elaboración propia

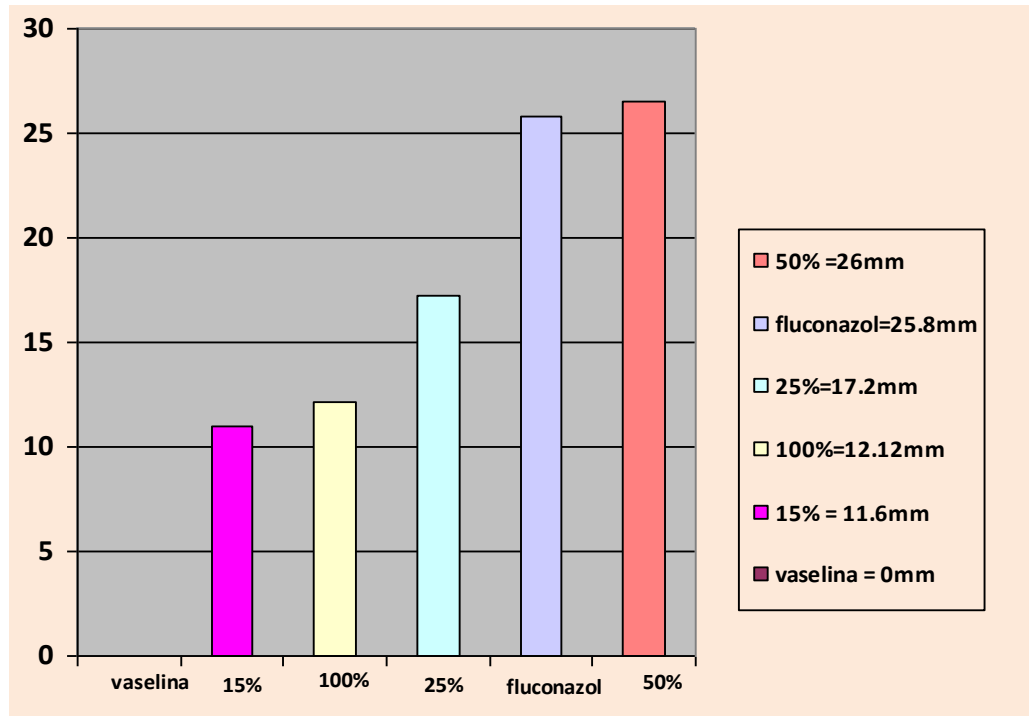
En la tabla 5 se observa que el aceite esencial de clavo de olor mostró ser insoluble en agua y soluble en vaselina líquida y etanol.

**Tabla 6.** Ensayo de actividad antimicótica del aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) frente a cultivos de *Cándida albicans* ATCC 10231 por el método de difusión en disco (Kirby Bauer)

Concentración	Volumen aceite	Solvente Vaselina líquida	N° Discos	Placa1	Placa2	Placa3	Promedio Final Halos (mm)
				Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	
15%	0.15ml	0.85ml	3	11.6	12.2	11	11.6
25%	0.25ml	0.75ml	3	16.35	17.25	18	17.2
50%	0.50ml	0.50ml	3	25.05	26.95	26	26.0
100%	1ml	0.0ml	3	11	12.9	12.45	12.1
vaselina	-	1ml	3	0	0	0	0
Fluconazol 1ml	-	-	3	26	25.5	26	25.8

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 6 se aprecia las medidas y los promedios de halos de inhibición producidos por las diferentes concentraciones del aceite esencial del clavo de olor (*Syzigium aromaticum*) frente a *Cándida albicans* ATCC 10231. Los resultados obtenidos indican mayor promedio de halo de inhibición a la concentración de 50% (26 mm) seguido del fluconazol (25.8 mm) y el de menor promedio de inhibición fue del 15% (11.6 mm) de diámetro.



**Gráfica 1.** Distribución de promedios de halos de inhibición con las diferentes concentraciones del aceite esencial del clavo de olor (*Syzigium aromaticum*) frente a cultivos de *Cándida albicans* ATCC 10231

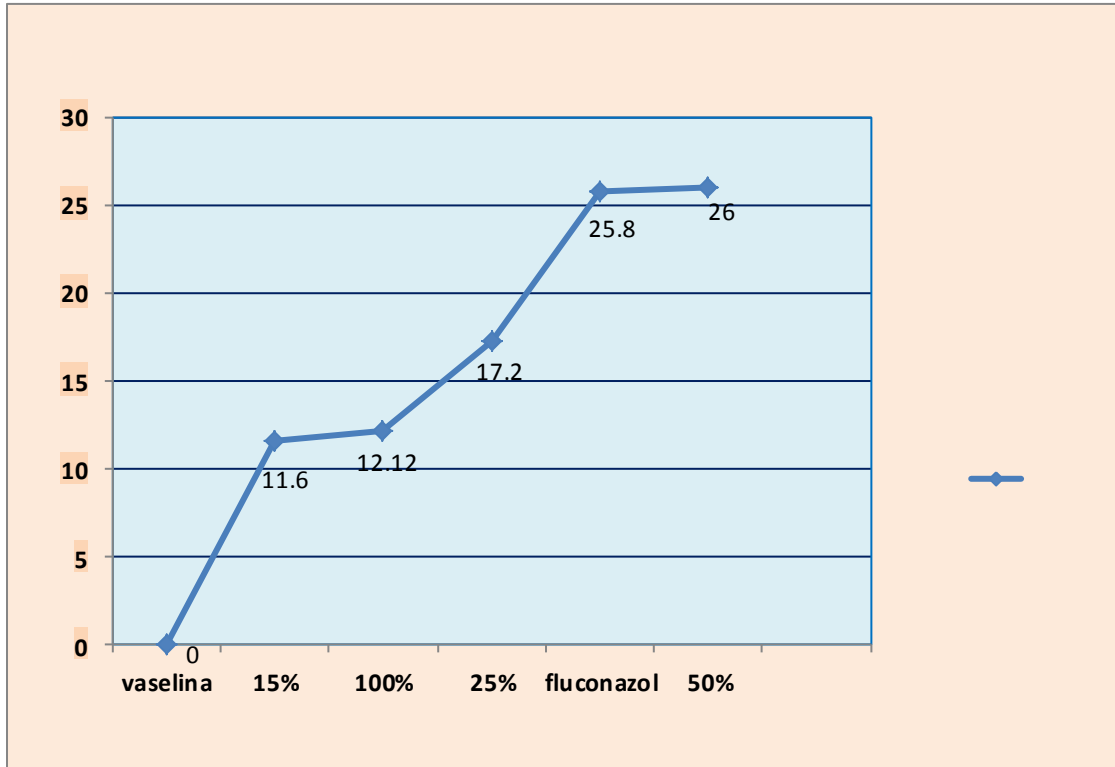
En el grafico 1 se observa que la actividad antimicótica del aceite esencial del clavo de olor fue mayor con la concentración 50% y es estadísticamente significativa con las otras concentraciones estudiadas del aceite ( $p < 0.05$ ), y no es significativa al comparar con el fluconazol ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 7.** Determinación del grado de sensibilidad de *Cándida albicans* ATCC 10231 a diferentes concentraciones del aceite esencial del clavo de olor (*Syzigium aromaticum*)

Aceite esencial		Grado de sensibilidad			
Concentración	Volumen de aceite	Solvente	Sensibilidad límite 9-14mm (sensible=+)	Sensibilidad media 15-19mm (muy sensible=++)	Sumamente sensible 20mm a mas (S.S.=+++)
15%	0.15ml	0.85ml	11.6	-	-
25%	0.25ml	0.75ml	-	17.2	-
50%	0.50ml	0.50ml	-	-	26
100%	1ml	0ml	12.12	-	-

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 7, se presenta el grado de sensibilidad de *Cándida albicans* al aceite esencial de clavo de olor, según la escala de Duraffourd y Lapraz.; se observa que, no en todas las concentraciones del aceite esencial dan halos de inhibición mayores a 20,0 mm; por lo cual indican que *Cándida albicans* ATCC 10231 es sumamente sensible a la concentración de 50%, presenta sensibilidad media al 25% y sensibilidad límite al 15% y 100% al aceite esencial del clavo de olor (*Syzigium aromaticum*).



**Gráfica 2.** Gráfica del grado de sensibilidad de *Cándida albicans* ATCC 10231 a diferentes concentraciones del aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*)

En la gráfica 2 se muestra el grado de sensibilidad de los promedios de los halos de inhibición de acuerdo a la escala de Duraffourd y Lapraz. La sensibilidad de la concentración de 50% y el fluconazol son similares ( $p > 0.05$ ) y el promedio de halos es mayor de 20 mm, por lo tanto, el aceite esencial del clavo de olor al 50% se encuentran en la categoría de sumamente sensible frente a cultivos de *Cándida albicans*.



**Tabla 8.** Análisis de varianza de (ANOVA) de la actividad antimicótica del aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*)

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F. Calculado	Sig.F Tabular 0.05 0.01
Tratamiento	280,627	5	56,125	0,893	0,524 0,029
Error	565,674	9	62,853		
Total	846,301	14			

Se observa los resultados de análisis de varianza (ANOVA) del promedio de los halos de inhibición de *Cándida albicans* producidas a diferentes concentraciones del aceite esencial del clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) a niveles de confiabilidad al 95% con 5 y 9 grados de libertad. Siendo el F calculado 0,893 mayor a los valores del F Tabular que nos demuestra que existe diferencias estadísticas significativas entre los promedios de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite (*Syzygium aromaticum*) frente a *Cándida albicans* ATCC 10231.

#### 4.2. Discusión

El aceite esencial del clavo de olor mostró ser soluble en vaselina líquida y etanol (tabla 3) esto indica la presencia de taninos que son solubles en etanol así también los alcaloides, respecto a la solubilidad de la vaselina se debe a la presencia de compuestos apolares en el aceite <sup>(31)</sup>. Díaz V. 2016 halló la presencia de compuestos fenólicos en el aceite esencial de clavo de olor al cual atribuyeron su actividad frente a *Streptococcus mutans* al actuar sobre los fosfolípidos y proteínas de membrana de la bacteria <sup>(19)</sup>. Armas C y col. 2011

reportaron que el aceite esencial de clavo de olor tienen efecto antifúngico frente a *Aspergillus flavus* en estudio in vitro con máxima actividad a la concentración de 0,20% <sup>(32)</sup>. Estos estudios son compatibles con nuestros resultados ya que se halló la presencia de taninos que son compuestos fenólicos y alcaloides al cual puede deberse su propiedad antifúngica frente a *Cándida albicans*, la máxima actividad fue a concentración del 50% el cual mostró halo de inhibición de 26 mm (tabla 6 y figura 1) y al comparar con el fluconazol no es significativo el efecto ( $p > 0,05$ ) el cual podría constituir una alternativa de tratamiento frente a este tipo de hongo que infecta con frecuencia a la población. Se ha descrito que los alcaloides poseen diversas propiedades terapéuticas como bloquear los canales de calcio, actuar como analgésico como es el caso de la morfina así como propiedades antimicrobianas <sup>(33)</sup>. De la misma forma a los taninos se le atribuye propiedades como bactericida, antioxidantes, precipitar proteínas <sup>(34)</sup>. Por otro lado el aceite de clavo de olor ha mostrado tener actividad antibacteriana frente a *S. aureus* y *E. coli* en estudio in vitro a concentraciones de 150 mg/mL y 100 mg/mL respectivamente atribuyeron esta propiedad al eugenol principal componente del aceite al inhibir enzimas extracelulares como la proteasa y amilasa provocando deterioro de la pared y lisis celular del microorganismo <sup>(35)</sup>. Se requiere otros estudios específicos para determinar el mecanismo de acción del aceite de clavo de olor frente a la actividad de *Cándida albicans*.

## **CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **5.1. Conclusiones**

1. La concentración del aceite esencial del clavo de olor que tuvo mayor efecto antimicótico in vitro fue 50% frente a cultivos de *Cándida albicans*.
2. Los constituyentes químicos presentes en el aceite esencial del clavo de olor son taninos, glúcidos y alcaloides a los cuales puede atribuirse su efecto antimicótico, sin embargo se debe realizar estudios para determinar su mecanismo de acción.

### **5.2. Recomendaciones**

1. Realizar estudios de investigación del aceite de clavo de olor, para evaluar otros posibles efectos antiinfecciosos.
2. Realizar estudios de elucidación estructural de sus constituyentes químicos y evaluar efectos biológicos a nivel molecular

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Colpa M. Efecto inhibitor del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) y *Mentha piperita* (menta) frente a cepas de *Cándida albicans* estudio in vitro”. Lima. 2016.
2. Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, anSalgueiro L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species, University of Portugal. 2009.
3. Vaca V. “Estudio de la aplicación de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) para optimizar la calidad microbiológica y sensorial de cuatro tipos de hortalizas: col de repollo (*Brassica oleracea* var. capitata cv. bronco), colmorada (*Brassica oleracea* var. capitata f. rubra), lechuga iceberg tipo salinas (*Lactuca sativa* var. capitata) y espinaca (*Spinacia oleracea* L.)” Ambato. Ecuador. 2013.
4. Gamboa J. Vásquez M. Efecto del aceite esencial de *Syzygium aromaticum* sobre la supervivencia de *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi A* y *Bacillus cereus*. Trujillo. Perú. 2015.
5. Garza E. Caracterización taxonómica y molecular de *Cándida spp.* en aislados clínicos de origen bucal en pacientes sanos y diabéticos de Nuevo León. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 2012.
6. Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem.* 2003. 10(10): 813-29.
7. Gastelú, V, Nakata M, Salcedo D., Pineda M, Perfecto R, de la Peña Z, Álvarez B. Efecto Antimicótico in vitro de *Origanum vulgare* sobre cepas de *Cándida albicans*. UNMSM, Lima, 2016.

8. Marca M. Actividad Antimicótica “in vitro” del Aceite Esencial *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” Frente a *Cándida albicans* ATCC 6538, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna. Perú. 2013.
9. Cano C, Bonilla P, Roque M, Ruiz J. Actividad antimicótica in vitro y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* Muña". Ciencia e Investigación, 2006; 9(1): 27-31.
10. Salas A. Efecto antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Cándida albicans*. Puno. 2015.
11. Moura J, Sarmiento F, de Oliveira F, Pereira de Sousa J., Nogueira V, de Oliveira E. Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Cándida tropicalis* de aislados clínicos. Universidad de Santiago de Chile. 2012.
12. Carranza L, Vasconez G. Efecto anti fúngico “in vitro” de aceite esencial y extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* “Romero” sobre *Cándida albicans* cepa ATCC 10231. Universidad Nacional de Chimborazo. 2016.
13. Chamba L, Lanás G. Efecto antifúngico del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano) y *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), sobre cepas de *Cándida albicans* en comparación con la nistatina estudio invitro. Quito. 2015.
14. Lozada B, Herrera L, Efecto in vitro de aceites esenciales de tres especies de Lippia sobre *Moniliophthora roreri*. Bogota. 2012: 102-110.
15. Gomez C. Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de *Myrciastes hallii* (arrayán), *Amaranthus asplundii* (ataco), *Peperomia peltigera* (pataku yuyo), especies reportadas en Peguche, Imbabura, sobre *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Cándida albicans* causantes de enfermedades bucofaríngeas.” Sangolquí. 2010.

16. Suarez E. Evaluación de la Actividad Antibacteriana de los Aceites Esenciales de: Zacate de limón (*Cymbopogon Citratus* DC. Stapf), Eucalipto (*Eucalyptus ssp.*) y Clavo de olor (*Syzygium aromaticum* L), Sólidos y en Combinación, Contra *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, 2012.
17. Martínez A., Aceites Esenciales Facultad Química Farmacéutica Medellín, 2003.
18. León C. Determinación de la acción antifúngica de los aceites esenciales de pimienta negra (*Piper nigrum*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y orégano (*Origanum vulgare*) sobre hongos postcosecha en ají paprika (*Capsicum annum l.*) Lima. 2017.
19. Díaz V. Efecto inhibidor del aceite esencial de clavo de olor “*Syzygium aromaticum*” como agente antimicrobiano, sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Estudio in vitro Universidad Central de Ecuador. Quito. 2016.
20. Castaño S. Evaluación de la capacidad conservante de los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y canela (*Cinnamomum verum*), sobre la levadura (*Rhodotorula mucilaginosa*) en leche chocolatada. Universidad Nacional de Colombia. Medellín. 2012.
21. Gamarra. A. Efecto de la concentración de aceite esencial de clavo de olor en la cobertura comestible a base de gelatina–almidón y tiempo de almacenamiento sobre las características fisicoquímicas, recuento de mohos y levaduras y aceptabilidad general en bayas de aguaymanto (*Physalis peruviana l.*) Trujillo. 2017.
22. Dias V. “Efecto inhibidor del aceite esencial de clavo de olor “*Syzygium aromaticum*” como agente antimicrobiano, sobre cepas de *Streptococcus mutans*. Estudio in vitro” Quito. 2016.

23. Segovia I, Suárez L, Castro A, Suarez S, Ruiz J. Composición química del aceite esencial de *Tagetes elliptica Smith* "Chincho" y determinación de su actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica. Ciencia e investigación. 2010; 13(2):81 – 86.
24. Negroni M. Microbiología Estomatológica. Buenos Aires: Ed Médica Panamericana; 2009.
25. Churata D. Actividad antifúngica del *Citrus paradisi* "toronja" sobre cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con estomatitis subprotésica Lima. 2016.
26. Villavicencio J, Moromi H, Salcedo D, Pineda M. Efecto Antimicótico in vitro de *Origanum vulgare* sobre cepas de *Cándida albicans*. Odontol. Sanmarquina 2016; 19(2): 5-8
27. Buendía C, Rivas F. Comprobación de la efectividad del antifungico fluconazol contra *Cándida albicans* y su posible inhibición con *Lactobacillus rhamnosus* (howaru). El Salvador. 2018: 27-28.
28. Ortega N. Estudio in vitro del efecto anti fúngico del aceite esencial del *Pelargonium graveolens* (geranio) al 25%, 50%, 75% y 100% sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231. Quito. 2017.
29. Gregorí B. Estructura y actividad de los antifúngicos. Revista Cubana Farm. 2005; 2(39)
30. Colpa M. Efecto inhibidor del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) y *Mentha piperita* (menta) frente a cepas de *Cándida albicans*. estudio in vitro". Lima 2016.
31. Lock de Ugaz, O. Investigación Fitoquímica. Segunda Edición. Lima: Editorial Fondo Pontificia Universidad Católica del Perú. 1994
32. Armas C, Villacorta L, Pretell C. Efecto del aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y su

combinación sobre la acción antigúngica en *Aspergillus flavus* en agar chicha de maíz (*Zea mays L.*), variedad morado. Pueblo cont. 2011; 22(1): 123-132

33. De la Cruz I, González A, Riley C. Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. *Universitas Scientiarum*. 2012; 17(2): 189-202
34. Olivas F, Wall A, González G, López J, Álvarez E, De la Rosa L, Ramos A. Taninos hidrolizables, bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutrición Hospitalaria*. 2015; 31(1): 55-66
35. Pastrana Y, Durango A, Acevedo D. Efecto antimicrobiano del clavo y la canela sobre patógenos. *Biotechnología en el sector agropecuario y agroindustrial*. 2017; 15(1): 56-65



## ANEXOS

### Anexo 1: Matriz de consistencia

**Título:** “Efecto antifúngico in vitro del aceite esencial del clavo de olor (*Syzigium aromaticum*) frente a *Cándida albicans* ATCC 10231.

Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables e indicadores		
			Dimensiones	Indicador	N° Indicador
<p><b>Problema general</b></p> <p>¿Tendrá efecto antifúngico in vitro el aceite esencial del clavo de olor (<i>Syzigium aromaticum</i>) frente a <i>Cándida albicans</i>?</p>	<p><b>Objetivo general</b></p> <p>1. Determinar el efecto antifúngico in vitro del aceite esencial clavo de olor (<i>Syzigium aromaticum</i>) frente a <i>Cándida albicans</i></p>	<p><b>Hipótesis general</b></p> <p>1. El aceite esencial del clavo de olor (<i>Syzigium aromaticum</i>) tiene efecto antifúngico in vitro frente a <i>Cándida albicans</i></p>	Componentes activos	Metabolitos secundarios	3
<p><b>Problemas específicos</b></p> <p>1. ¿Qué concentración del aceite esencial del clavo de olor (<i>Syzigium aromaticum</i>) tendrá mayor efecto antifúngico in vitro frente a <i>Cándida albicans</i>?</p> <p>2. ¿Cuáles serán los principales grupos de constituyentes químicos presentes en el aceite esencial del clavo de olor (<i>Syzigium aromaticum</i>)?</p>	<p><b>Objetivos específicos</b></p> <p>1. Determinar qué concentración del aceite esencial del clavo de olor (<i>Syzigium aromaticum</i>) tendrá mayor efecto antifúngico in vitro frente a <i>Cándida albicans</i>.</p> <p>2. Determinar cuáles serán los principales constituyentes químicos presentes en el aceite esencial del clavo de olor (<i>Syzigium aromaticum</i>).</p>	<p><b>Hipótesis específicas</b></p> <p>1. La concentración del 50% del aceite esencial del clavo de olor (<i>Syzigium aromaticum</i>) tienen mejor efecto antifúngico in vitro frente a <i>Cándida albicans</i>.</p> <p>2. Los principales constituyentes químicos del aceite esencial clavo de olor (<i>Syzigium aromaticum</i>) son alcaloides, taninos y glúcidos</p>	Estudio de actividad antimicótica	Determinación del % de inhibición de la actividad antimicótica	4
			Estudio de actividad antimicótica frente a <i>Candida albicans</i>	Determinación de la CMA	1

Método y diseño	Población	Técnica de instrumento	Método de análisis de datos
<p><b>Tipo y nivel de la investigación</b></p> <p>Estudio experimental, prospectivo, transversal y aplicado.</p> <p><b>a. Prospectivo:</b> Porque se realizó del presente al futuro</p> <p><b>b. Transversal:</b> Porque se realizó una sola medición</p> <p><b>c. Experimental:</b> Porque se manipuló la variable independiente.</p>	<p><b>Población</b></p> <p>Cepas de <i>Cándida albicans</i>.</p> <p><b>Muestra</b></p> <p>12 placas Petri con cultivos de <i>Cándida albicans</i> a una temperatura de 25 °C y 60 % de humedad, las 24 horas cubiertas con papel kraff.</p>	<p><b>Técnica</b></p> <p>Observación directa.</p> <p><b>Instrumento</b></p> <p>Los resultados se registraron de forma manual y visual con la ayuda de un vernier o regla pie de rey, la lectura consistió en medir los halos de inhibición alrededor del disco, siendo esta zona directamente proporcional a la actividad de las diferentes concentraciones del aceite.</p>	<p>Se calculó la media y desviación estándar se presentan en tablas y gráficas para establecer la distribución de los datos recolectados a través de medidas de tendencia central, forma, dispersión y posición. Para constatar la hipótesis, se utilizó el Análisis de Varianza (ANOVA), con la finalidad de establecer si existen diferencias significativas entre los grupos. Así mismo, se empleó el método de Diferencia Significativa Honesta (DSH) de Tukey.</p>

## Anexo 2. Testimonios fotográficos



**Foto 1.** El clavo de olor *Syzygium aromaticum*, molido se pesó cantidades iguales de 200 gramos.



**Foto 2.** Se instala el equipo de destilación por arrastre de vapor, luego se inicia la extracción del aceite del *Syzygium aromaticum*



**Foto 3.** Decantación del aceite del *Syzygium aromaticum*, usando la pera decantadora.



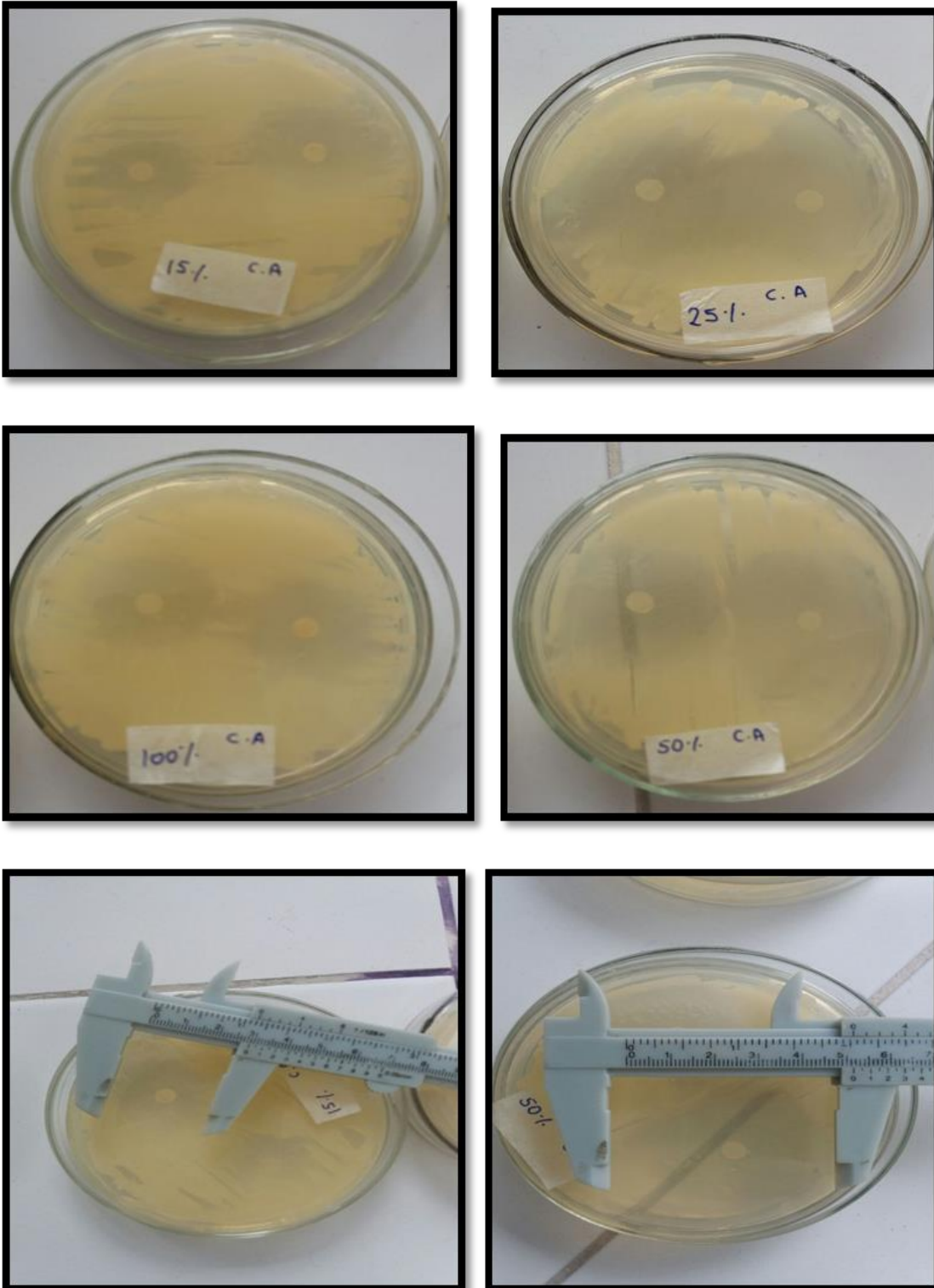
**ANEXO 4:** Preparación del agar sabouraud y el autoclavado



**Foto 5.** Preparación de los discos y dilución del aceite mientras mediante la Técnica de Kirby Bauer



**Foto 6.** Siembra de cepas del hongo *Cándida albicans*. Activación de *Cándida albicans*, en medio agar Sabouraud.



**Foto 7.** Sensibilidad de *Cándida albicans* frente al aceite esencial de *Syzigium arotamaticum* (clavo de olor), después de 24 horas