



**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
CARRERA DE ODONTOLOGÍA**

**"EFECTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE
ORÉGANO DE LAS PROVINCIAS DE CHIMBORAZO Y SANTA
ELENA AL 100% DE CONCENTRACIÓN SOBRE *CANDIDA*
ALBICANS"**

Proyecto de investigación presentado como requisito previo a la obtención
del título Odontólogo.

Autora: Valverde Quinaluisa Patricia Yaquelin

Tutor: PhD Wilfrido Edesmín Palacios Paredes

Quito, Mayo 2017

DERECHOS DE AUTOR

Yo, Valverde Quinaluisa Patricia Yaquelin en calidad de autor del trabajo de investigación: **EFFECTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO DE LAS PROVINCIAS DE CHIMBORAZO Y SANTA ELENA AL 100% DE CONCENTRACIÓN SOBRE *CANDIDA ALBICANS***, autorizo a la Universidad Central del Ecuador a hacer uso de todos los contenidos que me pertenecen o parte de los que contiene esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

Los derechos que como autora me corresponden, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a mi favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8; 19 y demás pertinentes de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

También, autorizo a la Universidad Central del Ecuador a realizar la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Valverde Quinaluisa Patricia Yaquelin

C.I. 172054019-2

APROBACIÓN DEL TUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, PhD Wilfrido Edesmín Palacios Paredes, en mi calidad de tutor del trabajo de titulación, modalidad Proyecto de Investigación, elaborado por Valverde Quinaluisa Patricia Yaquelin cuyo título es: **EFFECTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO DE LAS PROVINCIAS DE CHIMBORAZO Y SANTA ELENA AL 100% DE CONCENTRACIÓN SOBRE *CANDIDA ALBICANS***, previo a la obtención de grado de **ODONTÓLOGA**, considero que el mismo reúne los requisitos y méritos necesarios en el campo metodológico y epistemológico, para ser sometido a la evaluación por parte del tribunal examinador que se designe, por lo que lo **APRUEBO**, a fin de que el trabajo investigativo sea habilitado para continuar con el proceso de titulación determinado por la Universidad Central del Ecuador.

En la ciudad de Quito a los 10 días del mes de Mayo del 2017.

PhD Wilfrido Edesmín Palacios Paredes

DOCENTE-TUTOR

C.I. 0502077266

APROBACIÓN DE LA PRESENTACIÓN ORAL/TRIBUNAL

El Tribunal constituido por Dra. Andrea Monserrat González Bustamante, Dr. José Luis Viteri García.

Luego de recepcionar la presentación oral del trabajo de titulación previo a la obtención del título de Odontólogo presentado por la señorita Valverde Quinaluisa Patricia Yaquelin.

Con el título:

EFFECTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO DE LAS PROVINCIAS DE CHIMBORAZO Y SANTA ELENA AL 100% DE CONCENTRACIÓN SOBRE *CANDIDA ALBICANS*

Emite el siguiente veredicto: **APROBADO**

Fecha: 10 de Mayo del 2017

Para constancia de lo actuado firman

	Nombre Apellido	Calificación	Firma
Presidente	Dra. Andrea González	18
Vocal 1	Dr. José Luis Viteri	19

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación está dedicado a Dios quien es mi guía y mi luz.

A mi familia, quienes han sido mi apoyo para concluir mi carrera. Especialmente dedicado a mis queridos padres Carlos y Rosario quienes con su esfuerzo, ejemplo, amor y su apoyo me han alentado a ser un buen estudiante, profesional y ser humano.

A mis hermanos que mediante sus consejos, han estado siempre presentes.

Dedico este trabajo también a mi tutor PhD Wilfrido Palacios por su gran ayuda, paciencia, amistad; por compartir sus conocimientos, para la realización y culminación de esta tesis con éxito.

Patricia Yaquelin Valverde Quinaluisa

AGRADECIMIENTO

Le agradezco a Dios y a mi madre Santísima por haberme ser sido mi guía y mi fortaleza en momentos de debilidad, pero también en momentos de alegría en todo el transcurso de mi carrera.

Gracias infinitas a mis padres Carlos y Rosario por su inagotable apoyo y paciencia; por darme la oportunidad de estudiar, por inculcarme valores y su valioso ejemplo de humildad, honestidad y lucha constante.

A mis hermanos Marco y Mónica su ejemplo de buenos profesionales, por sus consejos que me han ayudado a continuar vencer los obstáculos y no detenerme.

Muy agradecida con mi familia, especialmente mis queridos primos por ser mis primeros pacientes, me han brindado su confianza, gracias por esa excelente ayuda, se han convertido en grandes experiencias profesionales. A mis amigas y amigos, quienes a lo largo de esta carrera hemos compartido experiencias, gracias por su valiosa amistad.

Gracias a mi tutor PhD. Wilfrido Palacios, por su gran ayuda, por brindar con paciencia sus conocimientos para el éxito de mi trabajo de investigación.

Gracias a mis profesores, de mi querida Facultad de Odontología de la honorable Universidad Central del Ecuador quienes son los responsables de formar excelentes profesionales, con sólidos conocimientos que nos hacen capaces de afrontar y solucionar los problemas de salud oral que existe en nuestro país. Muy orgullosa de haberme formado en esta institución.

Patricia Yaquelin Valverde Quinaluisa

ÍNDICE DE CONTENIDOS

DERECHOS DE AUTOR.....	ii
APROBACIÓN DEL TUTOR DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	iii
APROBACIÓN DE LA PRESENTACIÓN ORAL/TRIBUNAL	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE GRAFICOS.....	x
LISTA DE ANEXOS	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	5
1. EL PROBLEMA	5
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	5
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	7
1.3. OBJETIVOS.....	8
OBJETIVO GENERAL	8
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
1.4. HIPÓTESIS.....	9
CAPITULO II.....	10
2. MARCO TEORICO.....	10
2.1. MEDICINA NATURAL.....	10
2.1.1.1. Uso terapéutico de las plantas medicinales y fitoterapia.....	10
2.1.1.2. Plantas medicinales de la costa y sierra ecuatoriana	11
2.1.1.3. Tipos de plantas medicinales de la costa y sierra ecuatoriana.	12
2.1.1.4. OREGANO	13
2.1.1.4.1. Tipos de Orégano	13
2.1.1.4.2. ORÉGANO – TOMILLO (THYMUS VULGARIS L. LABIACEA) PROVENIENTE DE LA SIERRA ECUATORIANA	15

2.1.1.5. ORÉGANO (PLECTRANTHUS AMBOINICUS LOUR SPRENG) PROVENIENTE DE SANTA ELENA.....	17
2.1.1.5.1. ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO.....	20
2.2. MICOSIS OPORTUNISTAS.....	25
2.2.1 GÉNERO CÁNDIDA.....	26
2.2.1.1. Descripción de la cepa.....	26
2.2.1.2. Taxonomía.....	27
2.2.1.3. Factores de Virulencia.....	27
2.2.1.4. Antifúngicos convencionales para tratar patologías por <i>Candida albicans</i>	29
CAPITULO III	31
3. METODOLOGÍA	31
3.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	31
3.2. CLASIFICACION DE LAS VARIABLES	32
3.3. POBLACION Y MUESTRA	33
3.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	34
CRITERIOS DE INCLUSIÓN:	34
3.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:	35
3.5. INSTRUMENTOS:	35
3.6. PROCEDIMIENTO	36
3.7. Análisis de Datos.....	42
3.8. Aspectos Jurídicos.....	42
CAPITULO IV	45
4. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	45
4.1. Análisis Estadístico de los Resultados	45
4.1.1 Análisis del Conteo de células en Cámara de Neubauer.	45
4.2. DISCUSIÓN.....	63
CAPITULO V	67
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	67
5.1 CONCLUSIONES:.....	67
5.1. RECOMENDACIONES:	68
BIBLIOGRAFIA	69
ANEXOS	75

LISTA DE TABLAS

Tabla A. Pruebas de Normalidad.....	50
Tabla B. Comparación entre sustancias en volumen 0.3 ml. Descriptivos.....	51
Tabla C. Comparaciones múltiples entre Controles y aceites esenciales en 0.3ml.....	52
Tabla D. Prueba Tukey para subconjuntos homogéneos entre aceite esenciales 0.3ml y controles.....	53
Tabla E. Descriptivos ANOVA: comparación entre sustancias en 0,5 ml.....	55
Tabla F. Comparaciones múltiples entre aceites esenciales en volumen de 0.5 ml. Pruebas post hoc.....	56
Tabla G. Prueba Tukey para subconjuntos homogéneos entre aceite esenciales 0.5ml y controles.....	57
Tabla 1. Resultados - Promedios del Conteo celular en cámara de Neubauer de aceites esenciales de orégano 0.3 y 0.5 ml y controles.....	59
TABLA 2. Conteo en cámara de Neubauer – Comparación entre resultados de controles y aceites.....	62
TABLA 3. Conteo en cámara de Neubauer – Comparación entre resultados de aceites.....	64
TABLA 4. Conteo de colonias en Agar – Comparación entre resultados de controles y aceites.....	65
TABLA 5. Conteo de colonias en Agar – Comparación entre resultados de aceites.....	66

LISTA DE GRAFICOS

Grafico A. Grupos de control 0.3ml.....	54
Grafico B. Grupos de control 0.5mL.....	58
Grafico 1. Curvas de crecimiento de los promedios del conteo celular de 0.3 ml y 0.5 ml de aceite esencial de orégano y controles en Cámara de Neubauer.....	60
GRAFICO 1A. Curva de crecimiento en cámara de Neubauer. Aceite esencial 0.3ml de Chimborazo y Santa Elena.....	61
GRAFICO 1B. Curva de crecimiento en cámara de Neubauer. Aceite esencial 0.5ml de Chimborazo y Santa Elena.....	62
GRÁFICO 2. Conteo en cámara de Neubauer – Comparación entre resultados de controles y aceites.....	63
GRÁFICO 3 Conteo en cámara de Neubauer – Comparación entre resultados de aceites.....	64
GRÁFICO 4. Conteo de colonias en Agar – Comparación entre resultados de controles y aceites.....	65
GRÁFICO 5. Conteo de colonias en Agar – Comparación entre resultados de aceites.....	66

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. INFORME DE IDENTIFICACION BIOLÓGICA.....	79
ANEXO 2. CONSEJO DE BIOETICA.....	81
ANEXO 3. CERTIFICADO DE REALIZACION DE LA FASE EXPERIMENTAL EN EL CENTRO DE BIOLOGIA. UCE. Y DE RESULTADOS.....	82
ANEXO 4. CERTIFICADO DE LA REALIZACION DE LA EXTRACCION DE ACEITES ESENCIALES DE ORÉGANO EN EL CENTRO DE QUIMICA DE LA UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR.....	83
ANEXO 5. INSTRUCCIONES PARA ACTIVACION DE LA CEPA – CANDIDA ALBICANS ATCC 10231.....	84
ANEXO 6. FACTURA DE COMPRA DE CEPA DE CANDIDA ALBICANS ATCC 10231.....	87
ANEXO 7. LICENCIA DE CEPA DE CANDIDA ALBICANS ATCC 10231.....	88
NEXO8. FOTOGRAFIAS ANEXO.....	89

TEMA: “Efectividad antimicótica del aceite esencial de orégano de las provincias de Chimborazo y Santa Elena al 100% de concentración sobre *Candida albicans*”

Autora: Valverde Quinaluisa Patricia Yaquelin

Tutor: PhD. Wilfrido Edesmín Palacios Paredes

RESUMEN

Con el objetivo de tratar patologías orales producidas por *Candida albicans* mediante sustancias alternativas a base de plantas medicinales, se ha planteado identificar la efectividad antimicótica de los aceites esenciales de Orégano de las provincias de Chimborazo y Santa Elena al 100% de concentración sobre *Candida albicans*, cepas que han sido inoculadas en láminas de acrílico, para lo cual se tomó como medicamento control a Nistatina. Metodología: una vez seleccionado las plantas de orégano, se obtuvo el aceite esencial de las mismas, al 100% de concentración a través de la técnica de arrastre de vapor de agua. La activación de la levadura se realizó con 0,5 en la escala Mc Farland, posteriormente fueron colocadas en vasos estériles, donde se incorporó 50ml de agua más 0,3 y 0.5ml de aceite esencial de Orégano. Para determinar la efectividad del aceite sobre *C. albicans* se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias mediante el uso de la cámara de Neubauer, en cuatro tiempos; a la vez se respaldó los resultados de esta investigación con la siembra del inóculo, bajo técnica de Digrafsky, en dos tiempos: inicial y final. Dando como resultado que ambos aceites esenciales de orégano mostraron diferencias significativas sobre las levaduras en comparación con nistatina. Conclusión: El aceite esencial obtenido de los oréganos provenientes de las provincias de Chimborazo y Santa Elena reveló valores más altos de efectividad antimicótica frente a *Candida albicans*.

PALABRAS CLAVES: ACEITE ESENCIAL ORÉGANO, CANDIDA ALBICANS

TITLE: “Anti-mycosis effectiveness of the 100% oregano essential oil from Chimborazo and Santa Elena on *Candida albicans*”

Author: Valverde Quinaluisa Patricia Yaquelin

Tutor: Phd Wilfrido Edesmín Palacios Paredes

ABSTRACT

In order to treat oral pathologies caused by *Candida Albicans*, by using alternative substances taken from medicinal plants, we addressed to identify the anti-mycosis activity of 100% Oregano essential oils from Chimborazo and Santa Elena provinces on *Candida Albicans*, strains that have been inoculated in acrylic plates, for which Nystatin was used as control medicament and water as a positive control. Procedure: once Oregano plants were selected, essential oil was obtained from them with a 100% concentration, by using water steam dragging technics. Yeast activation was conducted with 0.5ml in the McFarland scale. Afterwards, they were placed in sterile glasses, where 50ml of water was poured, plus 0.3 and 0.5ml of Oregano essential oil. In order to determine effectiveness of oil on *Candida Albicans*, they were counted by using Neubauer’s camera in four times. At the same time, results of this investigation were supported by using inoculum, with Digralsky’s technics in two times: initial and final. Both Oregano essential oils showed significant differences on yeasts, in comparison to water and Nystatin controls. Conclusion: essential oil obtained from Oregano from Chimborazo and Santa Elena provinces showed higher anti-mycosis effectiveness on *Candida Albicans*.

KEYWORDS: OREGANO ESSENTIAL OIL / INHIBITORY EFFECT / *CANDIDA ALBICANS*

INTRODUCCIÓN

De la Torre et al (1) señalaron que las plantas han sido una gran fuente de recursos materiales y de sustancias importantes como son los fitoquímicos para complementar las necesidades básicas vitales del ser humano. Así, Chamorro et al (2) explicaron que las plantas dentro de la medicina natural y fitoterapia han cobrado mucho interés por parte de investigadores de distintas áreas, para la contribución a los avances de la humanidad.

Según OMS (3) han indicado que la población en todos los continentes que usa medicina tradicional para atenuar diferentes patologías está alrededor del '60 al 90%', tomando en cuenta que la información ancestral sobre los beneficios de la medicina natural y fitoterapia viene de generación a generación. Aludieron Chamorro et al (2) que en el Ecuador el '80%' de la población ecuatoriana han utilizado a la medicina tradicional para conseguir bienestar y mejora de su salud a través de plantas y productos de origen natural.

Mencionó Calixto (4) que ha realizado su investigación con el objetivo de lograr el uso adecuado de las plantas en cuanto a sus extractos o aceites esenciales, con el debido sustento científico para tratar y prevenir enfermedades bucales, ya que al implementar plantas medicinales, no se han visto resultados adversos.

Dentro de los materiales usados como medicina natural, encontramos a los aceites esenciales; Acosta et al (5) explicaron, que la extracción de estos está encaminado no solo para uso industrial en el campo de la perfumería, sino que también es de gran importancia su elaboración para ser usado en el área de la medicina, debido a sus propiedades terapéuticas. Entonces Maraví (6) mencionó en su estudio la composición química del aceite de orégano, donde sustancias como timol y carvacrol, le dan características bactericidas, bacteriostáticas, antifúngicas, entre otras, siendo de gran importancia frente a patógenos que puedan causar algún tipo de daño al organismo humano.

Según Muñoz (7) y Acevedo et al (8) indicaron que la planta de orégano se ha utilizado, contra afecciones respiratorias, específicamente para la tos ferina; en dolencias estomacales, como cicatrizante de heridas. Arcila et al (9) explicaron que se han registrado

informes sobre el efecto antimutagénico y anticarcinogénico del orégano sugiriendo que representan una alternativa potencial como tratamiento o para prevenir del cáncer.

Arango et al (10), dijeron que, el aceite esencial de orégano presentó en su estudio grandes cantidades de timol, a este compuesto se le ha atribuido propiedades que inducen al control del dolor. Explica además que tiene efectos antibacterianos, antiinflamatorios, fungicida e insecticida. Albado (11), Arcila et al., (9) consolidaron la información sobre la actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (Orégano). El resultado de su investigación confirmó que el aceite esencial del orégano, posee efecto antimicrobiano frente a bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus* y sobre bacterias gram negativas, así como el orégano presentó una buena capacidad antioxidante y antimicrobiana contra microorganismos patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, entre otros.

Es importante mencionar el uso del aceite esencial el área de la salud; en odontología también se han realizado varios estudios donde Ucar et al (12) indicaron que en su investigación se pudo comprobar la inhibición de *Candida albicans* inoculadas sobre placas de acrílico de termocurado, esta inhibición se realizó con productos químicos desinfectantes, entre los cuales se destacan ácidos y peróxidos, productos con componentes que pueden ser nocivos o alterantes de las estructuras tratadas bajo estas sustancias.

La Candidiasis oral o Candidosis son las infecciones micóticas orales más frecuentes producidas por la levadura *Candida*, que se encuentra según Sapp et al (13) presente en la flora normal de la cavidad bucal y de los intestinos. Mencionaron Otero et al (14) que la candidiasis es una infección oportunista, que ataca cuando el sistema inmunológico del paciente se ve disminuida.

Carranza et al (15), manifestaron que entre los factores que inducen a presentar Candidiasis, están: la reducción de las defensas del hospedador, donde encontramos a personas portadoras del VIH, pacientes con diabetes mellitus, personas que han recibido tratamientos con radiación y quimioterapia, así como también pacientes geriátricos

portadores de prótesis dentales, quienes son susceptibles al padecimiento de Candidiasis atrófica o candidiasis protética.

Por lo que Aguirre (16) menciona que la incidencia de Candidiasis protética en la actualidad está en aumento en los países desarrollados debido a diferentes factores facilitadores como la generalización del uso de prótesis dentales, la xerostomía, las múltiples terapias con antibióticos, inmunosupresores, antineoplásicos y por supuesto el sistema inmunológico disminuido.

Aguirre (16) y Sapp et al (13) mencionaron existen tratamientos farmacológicos contra *Candida albicans*, con agentes antifúngicos, que en su mayoría son de uso tópico, dichos fármacos actúan no solo para inhibir estos microorganismos sino también interfieren en el metabolismo de las células humanas, causando toxicidad a las mismas.

Por lo que Fernández (17) indicó que persiste la necesidad de determinar si los antifúngicos habituales podrían ser remplazados por medicamentos alternativos naturales que ofrezcan la misma capacidad antimicótica con menores efectos adversos que los medicamentos comúnmente utilizados, para ser aplicados a nivel médico y por supuesto en odontología.

Es así que Jackson et al (18) y Srivatstava et al (19) han realizado en sus estudios, la inhibición de *Candida albicans* presentes en acondicionadores de tejidos dentales con el uso de compuestos naturales, ya que el uso de adhesivos o acondicionadores bucales, está en auge, sin embargo, por ser una estructura blanda, esta es susceptible a la colonización de microorganismos, como es el hongo *Candida albicans*; los mencionados autores han comprobado que el Orégano presenta propiedades químicas antifúngicas como son el Timol y el Carvacrol, presentes en su aceite esencial, demostrando su eficacia como fungicida ante dicho microorganismo. Es importante mencionar que en este estudio el aceite esencial de orégano fue incluido en el acondicionador de tejidos, sin alterar las características físicas adhesivas del mismo.

Ortega et al (20) y Acevedo et al (8) indicaron que los componentes fenólicos de la planta como son Timol y Carvacrol, serían los responsables de la acción antimicótica del aceite esencial de orégano. Pero Arcila et al (9) expusieron que la cantidad de dichas sustancias

pueden modificarse, es decir que no presentan las mismas características en su composición química, ya que estas podrían variar según el tiempo de cosecha de la planta, el clima y altitud en el que crece, y por supuesto de la especie de orégano a la que pertenece.

Se han realizado varias investigaciones con el uso de plantas medicinales, en el ámbito odontológico, donde Huamaní (21), Fernández (22), (23)Srivatstava A et al (19), Cano (24), han demostrado la efectividad de dichas plantas sobre microorganismos presentes en la cavidad bucal, pero no se ha especificado en dichos estudios, si la efectividad antimicrobiana y antifúngica podría variar según la especie o que los componentes de una planta de determinada región, podría variar según el lugar de origen de dicha planta. Así Gonzales (25), comparó la acción antibacteriana del orégano de diferentes regiones de México, donde observó que existen diferencias significativas, dentro de su composición química, por ende denotó variación en su efectividad frente a microorganismos.

Con nuestra investigación se esperan resultados positivos contra *C. albicans*, y contribuir a un posible tratamiento natural, de bajo costo, accesible a personas de bajos recursos económicos que no tienen acceso a la salud oral integral, mejorando su calidad de vida. Siendo entonces un precedente en posteriores estudios y poderlo emplear en productos antimicóticos contra alteraciones buco dentales, que afectan a la población ecuatoriana.

CAPITULO I

1. EL PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Lindhe (26) mencionó que dentro de las enfermedades gingivales de origen micótico con más recurrencia e importancia, fueron originadas por *Cándida* donde el género *Albicans* denotó ser el más común. Sapp et al (13) y Aguirre (16) indicaron que *Candida albicans*, es un huésped común de la cavidad bucal, que puede mostrarse como oportunista por deterioro de la inmunidad del huésped, causando alteraciones que no se manifiestan solo en cavidad bucal sino se extienden e involucran a la faringe, laringe y el esófago.

Carranza (15) afirmó que las alteraciones de la mucosa bucal originadas por hongos serían escasas en pacientes inmunocompetentes, pero muy frecuentes en aquellas personas con deterioro inmunitario, o aquellas que hayan sido sometidas a un tiempo prolongado de antibioticoterapia. Por lo que Sapp et al (13) mostraron que las personas portadoras de prótesis son propensas a contaminarse con *cándida albicans*, ya sea el uso prolongado o por escasa higiene de la misma, esto favorece a la colonización de este microorganismo en dichas prótesis, llevando a un posterior contaminación a los tejidos blandos de la cavidad bucal, provocando Candidiasis de tipo ‘atrófica’. Otero et al (14) añadieron que la incidencia real de candidiasis se desconoce, se sabe que existe una prevalencia aumentada en ciertas ocasiones como ocurre en ancianos, en presencia del uso de prótesis mucosoportadas, xerostomía, polifarmacología, enfermedades crónicas o en patologías asociadas frecuentemente en los adultos mayores.

Hay estudios que manifiestan la contaminación de las prótesis dentales con *C. albicans*, pero es escasa la evidencia científica, que determine el tiempo de inoculación de *Candida albicans* sobre las placas de acrílico con la que están fabricadas las prótesis dentales.

Se ha determinado en estudios previos de Acosta et al (5) y Alvado et al (11) la eficacia del aceite esencial al 100% sobre *Cándida albicans*, pero no hay evidencia científica que demuestre, si este aceite pierde o no características químicas fungicidas contra *C. albicans* al ser combinada con agua. Se desconoce el volumen de agua, y de aceite esencial de orégano que se podría utilizar para sumergir una prótesis dental; así como también se

desconoce el tiempo en que la placa de acrílico deba permanecer sumergida en esta combinación para observar el efecto antimicótico del aceite esencial de orégano.

Calixto (4) indica que hace falta realizar más estudios con plantas medicinales para tratar patologías bucales. Por lo mencionado anteriormente, esta investigación se realizará con el fin de determinar la efectividad antimicótica del aceite esencial de orégano al 100% de concentración sobre *Candida albicans*; ya que está comprobado que inhibe su crecimiento, pero no existe evidencia científica, de acuerdo al volumen o cantidad exacta de aceite esencial de orégano para ser usado con este fin, Así como también no existe evidencia científica de cómo utilizarlo, en productos para uso odontológico, para la eliminación de *Candida Albicans*.

Por este motivo surge la necesidad de obtener y emplear productos naturales a base de plantas, que han sido utilizado por nuestros indígenas; para la prevención y tratamiento de patologías bucales, así podríamos minimizar los efectos secundarios que pueden producir los fármacos utilizados comúnmente

Es así que para definir el problema de esta investigación formulamos la siguiente pregunta: ¿El aceite esencial de orégano procedente de las provincias de Chimborazo y Santa Elena; tiene el mismo efecto antimicótico sobre *Candida albicans* inoculada en láminas de acrílico al ser estos provenientes de diferentes regiones de nuestro país?

1.2. JUSTIFICACIÓN

Calixto (4) menciona la importancia del uso de plantas dentro de la medicina tradicional, dicho conocimiento de ciertas especies ha sido escasamente desarrollado, existiendo la necesidad de fomentar investigaciones acerca de los beneficios de los recursos naturales, en beneficio de la salud. Así Ansaloni et al (27) indicaron la importancia del uso de las plantas medicinales, dentro del campo de la medicina, para favorecer la 'salud' y el 'bienestar' de las comunidades rurales del Ecuador, lo que a su vez generaría interés en la investigación antropológica de la fitoterapia y su posible colaboración en la medicina tradicional.

Por ende Acevedo (8) indicó la importancia de desarrollar investigaciones con extractos de ciertas plantas; dentro de su estudio dijo que el aceite de orégano, presentó sustancias químicas que ayudan a detener el crecimiento y desarrollo de microorganismos como hongos y bacterias. Indicaron Alvado et al (11) y Ardila et al (28) que dichas sustancias que fueron extraídas del aceite de Orégano como Timol y Carvacrol, actuaron como antibacterianos y antifúngicos contra microorganismos como el hongo *Cándida Albicans*. Calixto (4) mencionó la importancia del estudio de dichas sustancias naturales en el beneficio de la salud bucal, logrando un uso adecuado de las mismas, bajo un sustento científico.

Por lo que es importante realizar este estudio; así como indica Calixto (4), existen pocas investigaciones y publicaciones acerca del efecto de plantas medicinales sobre enfermedades bucales, aunque estos estudios hayan demostrado, que no se han referido efectos o indicaciones adversas por el uso de plantas medicinales. Entonces, se pretende con esta investigación que el aceite esencial de la planta de Orégano de resultados positivos contra la levadura *Candida albicans*, es decir que podamos demostrar inhibición de la misma, para que este actúe como un agente de limpieza del acrílico inoculado con esta levadura, con la finalidad de que en un futuro este compuesto a base de una planta medicinal oriunda del Ecuador, sea empleada como un posible tratamiento natural, alternativo y de bajo costo, que sea accesible a personas de bajos recursos económicos que no tienen acceso a la salud oral integral, mejorando su calidad de vida. Siendo entonces un precedente en posteriores estudios y poderlo emplear en productos antimicóticos contra alteraciones buco dentales, que afectan a la población ecuatoriana.

1.3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

1.3.1.1 Identificar el efecto antimicótico de dos aceites esenciales de orégano al 100% de concentración procedente de las provincias de Chimborazo y Santa Elena sobre láminas de acrílico de termocurado inoculadas con *Candida albicans*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.3.2.1 Identificar el efecto inhibitorio del aceite esencial de orégano de la provincia de Chimborazo en una concentración al 100% utilizando volúmenes de 0.3ml y 0.5ml sobre *Candida albicans* inoculadas en láminas de acrílico y sumergidas en agua, mediante contaje celular a través de la cámara de Neubauer, midiendo 4 veces en los tiempos: inicial, a las 12 horas, 24 y 48 horas.

1.3.2.2 Determinar el efecto inhibitorio del aceite esencial de orégano de la provincia de Santa Elena en una concentración al 100% utilizando volúmenes de 0.3ml y 0.5ml sobre *Candida albicans* inoculadas en láminas de acrílico y sumergidas en agua, mediante contaje celular en la cámara de Neubauer, midiendo 4 veces en los tiempos: inicial, a las 12 horas, 24 y 48 horas.

1.3.2.3 Comparar la actividad antimicótica entre los dos aceites esenciales de orégano al 100% de concentración procedentes de las provincias de Chimborazo y Santa Elena utilizando nistatina como control positivo.

1.4. HIPÓTESIS

Hipótesis de investigación

H1. El aceite esencial de la planta de orégano tiene acción antimicótica sobre las cepas de *Candida albicans* que se encuentra en el acrílico de termopolimerización de las prótesis dentales.

Hipótesis nula

H0. El aceite esencial de la planta de orégano no tiene acción antimicótica sobre las cepas de *Candida albicans* que se encuentran en el acrílico de termopolimerización de las prótesis dentales.

CAPITULO II

2. MARCO TEORICO

2.1. MEDICINA NATURAL

Dentro de la medicina Jiménez ⁽²⁹⁾ mencionó que el uso de medicina natural, se ha relacionado con la evolución del hombre y su raciocinio, ya que este ha estado en íntimo contacto con la naturaleza y mediante la observación de costumbres de otros animales, ha logrado tener conocimientos empíricos así como también experiencia con respecto al uso de plantas medicinales, dando origen a la medicina natural. Entonces Castro et al ⁽³⁰⁾ dijo que los productos a base de plantas medicinales pueden ser seguros y efectivos, aunque no están sustentados con suficientes bases científicas.

Conceptualizando a este tema Jiménez ⁽²⁹⁾ aseveró que la medicina natural ha sido descrita como una ciencia que abarca el uso terapéutico de las sustancias y elementos naturales del entorno del ser humano, así como de la aplicación de los procesos naturales, para fomentar la capacidad curativa del propio organismo. En este mismo sentido la OMS ⁽³⁾ afirmó que la medicina tradicional conlleva una acumulación de conocimientos en cuanto a usos, técnicas y procesos con materiales de origen natural así como también de las creencias y experiencias de diferentes culturas, con el fin no solo de tratar sino de prevenir y diagnosticar enfermedades tanto físicas como mentales.

2.1.1.1. Uso terapéutico de las plantas medicinales y fitoterapia

Cañigueral ⁽³¹⁾ indicó que la Fitoterapia ha sido considerada como una ciencia que estudia el uso de los productos de origen vegetal con un el fin de prevenir, mitigar o tratar los estados patológicos del ser humano. Así Castro et al ⁽³⁰⁾, aseveraron en su investigación la implementación de la elaboración de medicamentos con productos de origen natural, que serían una nueva alternativa contra microorganismos, que actualmente se presentaban como resistentes a fármacos producidos con materiales sintéticos, siendo esta una nueva alternativa para la terapéutica de varias patologías.

La OMS ⁽⁵⁶⁾ mencionó que cerca del '80%' de la población mundial usan extractos vegetales u otros compuestos activos, como los aceites naturales y extractos vegetales para cuidados primarios de salud, que aquejan a la población.

Cerón ⁽³²⁾ nos mencionó en su estudio que es común que en el Ecuador se destine una gran cantidad de plantas a ser usadas y preparadas como bebidas con la finalidad de desintoxicar los riñones y el hígado, incluso se encuentran formando parte de la cultura de algunos pueblos que se encuentran al sur del Ecuador, específicamente Azogues, Cuenca y Loja, donde es muy común la bebida llamada horchata, que es un líquido de color rosado preparado con pétalos, raíces, tallos y hojas de más de 20 especies vegetales diferentes. ⁽³²⁾

De acuerdo a Castillo ⁽³³⁾ se ha establecido información etnobotánica en cuanto a los usos de las plantas medicinales para tratar ciertas enfermedades muy conocidas y padecidas por nuestra población, por ejemplo el dolor de estómago, siendo una dolencia tratada con plantas como el Tomillo, Orégano, Hinojo, Hierba Luisa, Flores de geranio, entre otras; problemas respiratorios, donde se usa salvia, borraja. Para los estados febriles se recomendó el uso de hojas de Ortiga, Borraja como infusión.

2.1.1.2. Plantas medicinales de la costa y sierra ecuatoriana

Las plantas medicinales, según nos mencionó Mazón ⁽³⁴⁾ constituyen la riqueza vegetal de nuestro entorno, ya sea en los huertos encontrados en las zonas rurales, así como de los bosques secos de la costa, bosques andinos en nuestra sierra ecuatoriana, también los bosques húmedos y tropicales de la Costa y Amazonía. El uso de las plantas medicinales, han ido evolucionando a través del tiempo, ya que han sido empleadas de forma empírica, pero al ir desarrollando nuevas investigaciones, se ha podido estudiar sus propiedades terapéuticas.

El conocimiento en cuanto al uso de la plantas medicinales de los Andes ecuatorianos se remonta, desde la conquista española y su influencia en nuestras culturas, parte de la influencia de esta cultura colonizadora ha incluido también el uso de especies vegetales ampliamente cultivadas en Europa y en el resto del continente americano como por

ejemplo el romero, la manzanilla, el toronjil, entre otras plantas muy conocidas en nuestro medio; por lo que podemos mencionar que las plantas encontrados en el territorio ecuatoriano, en su gran mayoría serían especies introducidas. ⁽³²⁾

2.1.1.3. Tipos de plantas medicinales de la costa y sierra ecuatoriana.

Entre las especies de nuestra sierra y costa ecuatoriana, se encontró una gran biodiversidad, por lo que mencionamos solo los más representativos, que dentro de las familias más comunes encontramos a la familia Labiatae que corresponde a 15 especies, donde encontramos a la menta, yerba buena, toronjil, orégano, tomillo, romero, entre otros. Otro grupo importante mencionó a la familia Asteraceae con 18 especies, en las que se cita a la manzanilla, matico, taraxaco, llantén, borraja, sábila, entre otros ⁽³³⁾.

Cerón ⁽³²⁾ en su investigación incluye un cuadro con una gran variedad de tipos de plantas medicinales de Ecuador, entre los más destacados tenemos:

Nombre Científico	Nombre Común	Afección que trata
Aloe vera (L.) Burm. f.	Sábila	Inflamación, caída cabello
Aloysia triphylla (L' Hér.) Britton	Cedrón	Aromática, dolor estomacal, presión.
Cymbopogon citratus (DC.) Stapf	Hierba Luisa	Aromática, presión, nervios,
Eucalyptus citriodora Hook. f.	Eucalipto	Tos, gripe, bronquitis, baño
Matricaria recutita L.	Manzanilla	Dolor estomacal, aromática, lavado vaginal, ojos irritados, inflamación
Origanum vulgare L.	Orégano	Ictericia, estomacal, cólico menstrual
Origanum x majoricum Camb.	Mejorana	Dolor Estomacal, dolor de parto
Peperomia peltigera C. DC.	Pataconyuyo	Inflamación, antifebril, problemas cardíacos

2.1.1.4. OREGANO

Arcila et al (9) expresaron que el orégano presenta diferentes especies de plantas, las mismas que presentan características típicas en cuanto a sus hojas, flores y olor característico. En general, esta planta de orégano ha sido utilizada en el ámbito culinario, cosmético, farmacológico e industrial

El género *Origanum* pertenece a la familia *Lamiaceae*, mientras que el *Lippia graveolens*, a la familia *Verbenaceae*. (9)

2.1.1.4.1. Tipos de Orégano

Nombre Científico	Nombre Común	Hojas	Altura	Suelo	Luz solar	Color de las flores
Origanum syriacum Origanum maru	Orégano Sirio	Perennial	12"-24"	Bien drenado	Sol	Blanco
Origanum onites	Orégano de Creta	Perennial	2'		Sol	Blanco
Origanum dictamnus	Dittany de Creta	Tender perenial	12"-15"	Bien drenado	Sol	Rosado
Origanum saso	Orégano enano rosado	Perennial				
Origanum vulgare aureum	Mejorama dorada trepadora	Perennial	3"-8"	Bien drenado	Sol	Blanco
Origanum vulgare hirtum	Orégano Griego	Perennial	12"-18"	Bien drenado	Sol	Blanco

Origanum vulgare humilen cv	Orégano Griego enano		4"		Sol	
Origanum laevigatum "Herrensausen"	Orégano Herrenhausen	Perennial	2'	Bien drenado	Sol	Purpura
Origanum laevigatum "Hopleys'"	Orégano Púrpura	Perennial	12" – 15"	Bien drenado	Sol	Purpura
Origanum sipyleum	Orégano rosados					
Origanum majoricum	Orégano Italiano	Perennial	12"-15"	Húmedo, bien drenado	Sol y sombra	Blanco
Origanum kaliteri	Orégano Kaliteri	Tender perennial	12"-24"	Bien drenado	Sol	Blanco
Origanum rotundifolium x dictamnus	Orégano algodónoso					
Origanum rotundifolium cv	Orégano hermoso		15"	Seco a húmedo	Sol	Rosado
Lippia graveolens	Orégano Mexicano	Tender perennial	2' - 3'	Bien drenado	Sol	Blanco
Origanum majorana	Orégano Siciliano o mejorama dulce	Tender perennial	8"-10"	Húmedo, bien drenado	Sol	Blanco

Fuente: Arcila, Loarca, González. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. ALAN.2004 Enero

Muñoz (7) mencionó en su aporte que la planta de orégano puede crecer en todo tipo de suelo, ya sea en lugares de clima seco y húmedos, siempre que estén presentes los suficientes nutrientes, que sirvan para que la planta se desarrolle y realice su proceso metabólico con normalidad. Sin embargo Arcila et al (9) nos mencionan que la diferencia en cuanto al clima, altitud, suelo, época de recolección de la planta van a influir en los componentes químicos de la planta y hacen que estos varíen en cuanto a su volumen y calidad.

2.1.1.4.2. ORÉGANO – TOMILLO (THYMUS VULGARIS L. LABIACEA) PROVENIENTE DE LA SIERRA ECUATORIANA

a) Definición y origen

López Luengo (35) ^(p-1) describió a la planta como un ‘fármaco de acción antiespasmódica expectorante y antiséptica’. Mientras que Gimeno añadió que el Tomillo correspondía a un arbusto aromático, cuyo nombre proviene del griego ‘Thym’ en mención a su intenso y agradable aroma.

Señalaron en su investigación De la torre et al (1) que el tomillo que encontramos en territorio ecuatoriano ha sido introducido; Gimeno (36) acotó que esta planta es oriunda de países mediterráneos occidentales, entre ellos España y Portugal.

b) Descripción botánica

Lizcano (37) explicó que la planta de Orégano corresponde a la familia Lamiaceae; mencionó características que presentaba dicha planta, entre las que se destacan la altura, esta oscila entre “10 a 40cm”; acotó también que el tamaño de sus hojas que van desde ‘3 a 8mm’, de forma lineal y ovaladas; planta muy aromática, con tallos leñosos y numerosos.

Añade (36) ^(p-173) que esta planta corresponde a la denominada clase ‘corolifloras’; ‘género Thymus. Arbusto aromático, de tallos leñosos, muy poblado de hojas ovaladas y lanceoladas, de 1cm aproximadamente. Sus flores son bilabiadas, pequeñas de color rosado’.

c) Sinonimia

Gimeno (36) menciona los distintos nombres comunes, con que es conocido esta planta: en Portugal es conocido como ‘Tomilho’

Mientras que De la torre et al (1) alega que en nuestro país se conoce al tomillo, como: ‘orégano chico, orégano de casilla, orégano de tierra, orégano dulce’.



Realizado por: Autor

d) Composición Química.

En su estudio López (35) enfatizó en cuanto a la composición química que contenía *Thymus vulgaris*, donde destacó el '1,2%' de aceite esencial y '0,5%' de flavonoides; estos últimos explicó Martínez (38) que los correspondían a los pigmentos naturales de la planta. A más de los mencionados componentes de *Thymus vulgaris*, López luengo (35) menciona que se ha destacado la presencia de ácido 'caféico' y 'rosmarínico', del grupo de ácidos fenólicos.

Agregó Gimeno (36) que los distintos componentes que presenta *Thymus vulgaris*, pueden variar, dependiendo de los factores como la altitud, clase de suelo en el que haya sido sembrada la planta, así como también los cuidados con el riego y la época de cosecha.

e) Propiedades

El denominado tomillo, según López (35) en su estudio explica, que esta planta medicinal, presenta propiedades antitusígenas y expectorantes, ya que actúa directamente sobre las células musculares lisas de los bronquios pulmonares; siendo esto un indicativo del uso de esta planta para problemas respiratorios aducidos por los denominados resfriados comunes.

Enfatiza Gimeno (36) que el tomillo actúa como un antimicrobiano, previniendo infecciones a nivel de los tractos: oral, laríngeo, faríngeo, pulmonar, intestinal y génito - urinario, siendo en este último muy apto para infecciones dadas por *Trichomonas vaginalis*. Adujo que este fue utilizado como antifúngico contra ciertos tipos de candidas; así como también usado como antivírico y antihelmíntico ante la presencia de herpes y de *Ancylostoma duodenale*, respectivamente.

2.1.1.5. ORÉGANO (PLECTRANTHUS AMBOINICUS LOUR SPRENG) PROVENIENTE DE SANTA ELENA

a) Definición y Origen

Acosta et al (5) y Chiriboga et al (39) definen a esta planta como una herbácea perenne, robusta, de hojas carnosas de forma ovalada y cuyos bordes se presentan dentados, con pecíolos gruesos y flores de tonalidad violáceas en espigas terminales; muy olorosas, cuyo aroma se asemeja mucho al del orégano común.

La planta de orégano (*Plectranthus amboinicus* lour spreng) según acotaron Araujo di Oliveira et al (40) se encuentra introducida en toda América que presente un clima cálido o tropical. Acosta et al (5) y Chiriboga et al (39) aseveraron que dicha especie de orégano es oriunda de las regiones tropicales de Asia Oriental y el Sureste de África.

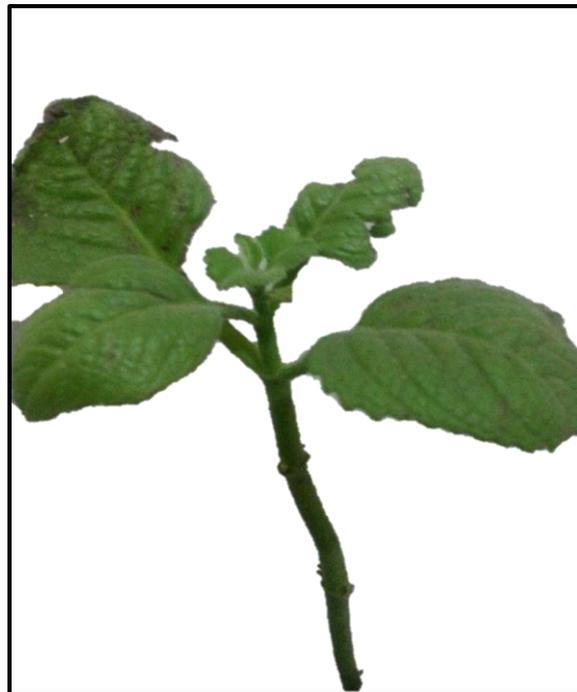
b) Descripción Botánica

Nos detalla Chiriboga (39) al orégano (*Plectranthus amboinicus* Lour. Spreng) como una planta herbácea, de ramas abundantes, fragante, con tallos angulosos y frágiles, pertenecientes al orden Lamiales, de la familia Lamiaceae, sus hojas anchas y ovaladas y forma acorazonada, de '4 a 12 cm' de longitud.

Mientras que Acosta et al (5) añadieron que es una planta leñosa en la base, rojiza y aromática. De tallos erguidos y ramosos, de '20 a 85 cm', con hojas pecioladas, ovales o elípticas cuyas flores de color rosado, aglomeradas.

Ávila et al (41) nos mencionaron la Clasificación Botánica del Oreganón:

- ✓ Familia: Lamiaceae
- ✓ Género: *Plectranthus*
- ✓ Especie: *amboinicus*



Realizado por: Autor

c) Sinonimia:

Chiriboga et al (39) y Acosta et al (5) mencionaron que esta especie posee varios nombres, donde comúnmente adquieren nombres del sitio en el que se encuentran plantados; así por ejemplo se lo conoce como: orégano francés, menta mexicana, orégano indio, orégano brujo, orégano, orégano de tierra. En nuestro país se lo conoce como orégano de la costa, así como también David (42) es comúnmente denominado Oreganón.

d) Composición Química

Dentro de la composición química del Oreganón, *Plecthranthus amboinicus*, Ávila et al (41) manifestaron en su estudio la presencia de un índice alto de compuestos aromáticos y oxigenados, con un total de 26 compuestos. Entre estos, mencionaba a los principales compuestos químicos fueron el carvacrol '28,65 %', timol '21,66 %'.

El componente que encontramos en mayor cantidad es el carvacrol, siendo este considerado como uno de los componentes responsables de la actividad antibacteriana de dicha especie de orégano, este se encuentra en un valor del 70%, formando parte del aceite esencial

e) Propiedades y usos terapéuticos

Como planta medicinal dijo Arias (43) que dicha planta fue reconocida en afecciones respiratorias, artritis reumatoide, epilepsia, convulsiones, hipo, dolor de estómago, de oídos, cólicos, fiebre, flatulencia, cálculos renales y biliares, contra diversas infecciones causadas por hongos y bacterias, diarrea, parásitos intestinales; protege el hígado y riñones, es antiinflamatoria y sedante.

Es ampliamente utilizado según añadieron Araujo et al (40), en la medicina popular para tratar patologías dermatológicas, sus hojas se usan de manera tópica para el tratamiento de infecciones e inflamación del folículo piloso y micosis superficiales que afectan a la piel; utilizada popularmente para tratar la denominada gripe o resfrío común, el

estreñimiento, la cefalea, la tos, la ronquera, la fiebre y las enfermedades del aparato digestivo.

Manjamalai (44), mencionó en sus estudios etnobotánicos que posee actividades antitumorales y citotóxicas. Mencionó también que es utilizado sobre quemaduras, así como también se ha demostrado su uso y efectividad para expulsar cálculos renales.

2.1.1.5.1. ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO

a. Composición química del aceite esencial de orégano.

Tanacov (45) explica en su estudio acerca de aceites esenciales (A.E) vegetales (siendo productos en estado líquido de las plantas aromáticas); estos productos son encontrados en mayor cantidad en las familias de la planta de orégano: ‘Pinaceae, Zingiberaceae, Umbellifereae, Apiaceae, Myrtaceae, Asteraceae, Rutaceae Laureace y Lamiaceae’, esta última la destacamos por ser la familia a la cual pertenecen nuestras plantas utilizadas en este estudio. El aceite esencial se produce en el protoplasma de las células secretoras denominadas glándulas exógenas o endógenas, encontradas en forma de gotas en túbulos glandulares u órganos secretores internos de la planta.

Mientras que Arcila et al (46) indicaron que los aceites esenciales han sido identificados como metabolitos secundarios de las plantas, así se ha relacionado al metabolismo activo de la planta con la cantidad de aceite, es decir mientras sea mayor el metabolismo, mayor será la producción de aceite esencial. Generalmente se han encontrado en los aceites esenciales hidrocarburos alicíclicos y aromáticos; así como también derivados oxigenados como son aldehídos, alcoholes, ésteres y cetonas; sustancias nitrogenadas y azufradas.

Arcila et al (46) mencionaron que existen diversos estudios sobre la composición química del orégano, obtenidos usando extractos acuosos y sus aceites esenciales donde se han identificado o flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano.

En cuanto Acevedo et al (8) mostraron los resultados de su investigación acerca de los componentes químicos del orégano, donde se ha destacado la presencia de Timol '67.51%' como mayoritario, seguido por p-Cimeno '11,66%', γ -Terpineno '5,51%', cariofileno '5,38%', oxido de cariofileno '2,22%', trans- α -Bergamoteno con '1,65%', Eugeno '11,49%' y α -Bergamoteno '1,32%', que representan más del 80% del total de componentes químicos presentes en el Aceite esencial de la planta de orégano.

Arcila et al (46) enfatizaron en la presencia de los monoterpenoides, siendo estos compuestos volátiles con olores intensamente punzantes, son los responsables de las fragancias y las sensaciones de olor-sabor que caracteriza a la planta en mención. Se destaca también el rendimiento del aceite esencial en la hoja seca que varía entre '2%' y '6%'; este porcentaje se ve afectado por la altitud del lugar de cultivo, y por la época de recolección o de cosecha.

a. Actividad biológica.

Fernández (17)^(p-86) explicó en su estudio que la actividad biológica del aceite esencial de Orégano, donde se observó la presencia de una composición que presenta variaciones de acuerdo a la especie de Orégano; se indicó que es rico en timol y carvacrol, que le confiere acción 'estimulante, estomáquica y antiespasmódica. Se han identificado ácidos fenólicos 'cafeico y rosmarínico', así como también flavonoides y ácido ursólico, por lo que le da características antiespasmódicas y cicatrizantes.

b. Potencial antimicrobiano

En su publicación Manjamalai (44), constató mediante un estudio in vitro, donde observó mediante halos de inhibición que el aceite de orégano presentó un efecto antimicrobiano frente a, 'Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus pneumonia y Escherichia coli'.

Arcila et al (46)^(p-13) y Tanackov (45)^(p-842), indicaron que el aceite esencial de orégano tiene capacidad antimicótica contra varios microorganismos, entre los que se destacan a los siguiente: '*Cándida albicans*, *C tropicalis*, *Torulopsis*, *Glabrata*, *Aspergillus*, *Níger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*'; mencionaron también que los fenoles carvacrol y

timol poseen altos niveles de actividad contra microorganismos gram negativos, excepto para *P. aeruginosa*, siendo el timol el que presenta mayor actividad. Existen otros compuestos, como el terpineno y cimeno que no indicaron actividad contra las bacterias estudiadas ya mencionadas.

c. Capacidad Antioxidante.

Destacaron Arcila et al (9) en su estudio que una de las principales acciones biológicas de la planta de orégano es su capacidad antioxidante, esta capacidad oxidativa es importante tanto, para la prevención de enfermedades, ya que protege a la célula contra el daño oxidativo, hecho que se ha comprobado que causa patologías degenerativas como cáncer, diabetes y enfermedades cardiovasculares así como también de envejecimiento celular.

Los compuestos encontrados en el aceite esencial de orégano se han encontrado ciertos antioxidantes como los tocofenoles, carotenoides, los compuestos fenólicos y el ácido ascórbico, destacando también a los compuestos fenólicos. El poder antioxidante del orégano se ha dado por la presencia de ácido cafeico y rosmarínico; también se pudo encontrar a sustancias como los glicósidos, considerados como precursores de las sustancias antioxidantes en la planta.

d. Mecanismo de acción.

García et al (47), realizaron una investigación bibliográfica para determinar cuál es el mecanismo de acción del aceite esencial de orégano frente a los microorganismos. Entre las sustancias presentes en el aceite esencial de orégano se encuentran diversos compuestos fenólicos como es el timol y carvacrol, que poseen actividad antimicótica y antibacteriana. Aunque no es factible decir que su actividad antimicrobiana puede ser atribuida a solo un mecanismo específico, existen puntos claves donde estos compuestos hagan efecto, entre estos puntos tenemos daño a la membrana citoplasmática, daño a la pared celular, daño a las proteínas, coagulación del citoplasma, filtración del contenido celular.

Los sitios de acción del timol y de carvacrol dentro de la célula y dependiendo de la concentración, pueden causar inactivación o inhibición de los microorganismos.

En cuanto al carvacrol, este se halla entre '60 - 70%' en el orégano y en un 45% en el tomillo, en cuanto a su mecanismo de acción, este es el responsable de desintegrar la membrana externa de las paredes de los microorganismos, en este caso de la levadura, incrementando así la permeabilidad de la membrana citoplasmática, provocando la salida de proteínas, entre ellas ATP. (47)

En cambio el timol, se encuentra en un '50%' en el aceite esencial de tomillo y en de orégano vulgaris. En cuanto a su mecanismo de acción el timol es capaz de desintegrar la membrana externa de las levaduras, permitiendo la salida de los constituyentes químicos esenciales para su metabolismo, es importante mencionar que la acción del timol es dependiente de factores como el tipo de microorganismo, el pH del medio y la temperatura de incubación. (47)

e. Método de extracción.

Destaca Tanackov (45) que los aceites esenciales se aíslan de la planta entera o de algunas partes específicas, como son las flores, semillas, brotes, ramas, hojas, corteza, raíces, y frutos por varios métodos; así tenemos: destilación de componentes por vapor, fermentación, extracción supercrítica, compresión a presión, extracción por disolventes orgánicos fácilmente volátiles o fitosoles.

Por lo que Gaviña (48) explicó en su trabajo, que el mejor procedimiento para la recolección del aceite esencial de orégano, preservando sus propiedades y pureza, tenemos al método por arrastre de vapor.

e.1 Método por destilación por arrastre de vapor

Martínez (49) nos explica sobre el método de la destilación por arrastre de vapor de agua, donde se colocó la muestra vegetal, que generalmente en un dispositivo inerte para ser sometida a una corriente de vapor de agua; en este medio el aceite esencial de la planta es arrastrada, condensada, recolectada y apartada de la fracción acuosa. Dicha técnica se

ha utilizado en el campo industrial, especialmente en la perfumería, ya que el material obtenido se lo ha considerado puro y la tecnología usada no requiere de un gran equipo con tecnología avanzada o sofisticada.

Enfatizan Gaviña et al (48) y De la Torre (1) que este método tiene por objetivo la obtención del aceite y su rendimiento en relación a la especie de que procede, su relación con el tiempo, así como las condiciones de presión y temperatura a la que es sometida la planta. Cerpa (50) denominó en su aporte al método de destilación con el nombre de hidrodestilación, el cual fue definido como un proceso para la obtención de aceite esencial de una determinada planta aromática, producto obtenido mediante el uso del vapor saturado a presión atmosférica, dicha presión es generada por una fuente externa de calor.

Peredo (51) y Cerpa (50) mencionaron que en este proceso de destilación, el vapor se ha generado por calor interno en el mismo recipiente que contiene el material vegetal, el cual se calienta y va liberando el aceite esencial, este último por presentar alta volatilidad, se va evaporando hacia el hidrodestilador o también llamado refrigerante; donde es condensado y enfriado a temperatura ambiente, luego es transformado en una emulsión líquida inestable en densidades, por lo que se van separando dichos componentes, tanto el agua residual y el aceite esencial a nivel de un extremo lateral del refrigerante donde este se va acumulando.

Se describió también al equipo denominado según Cerpa (50) como 'Clevenger', de uso exclusivo para el laboratorio, considerado en varios estándares internacionales, como el más adecuado para la obtención del aceite esencial de un vegetal. Este equipo está compuesto por un balón de destilación, para depositar la materia prima seca, triturada y agua destilada en las cantidades adecuadas, este proceso se llevó a cabo en calor constante, para evaporar continuamente al agua con el aceite; a este balón se ha acoplado un condensador y una conexión en forma de letra D, que permite acumular y a la vez separar el aceite esencial.

2.2. MICOSIS OPORTUNISTAS

Ceccoti (52) explica que las infecciones provocadas por hongos han incrementado su frecuencia y su importancia clínica, en épocas anteriores las micosis bucales estaban asociadas con condiciones tales que tienen relación con un sistema inmunológico deteriorado, por ejemplo cánceres destructivos, quemaduras, diabetes, mal nutrición, tratamientos prolongados con corticoides, entre otros. Por otra parte (13) mencionó que la ‘candidiasis oral’ en la población normal estuvo presente entre un ‘40’ y ‘60%’ considerándose más frecuente en el paciente geriátrico debido a factores generales y locales.

Señalaron Ortega et al (20) los factores que predisponen para sufrir este tipo de micosis, denominadas oportunistas, porque aparecen en cuanto el sistema inmunológico se halla deteriorado por factores predisponentes generales y locales que favorecen la aparición de esta alteración patológica como son: los tratamientos prolongados con fármacos entre los que se destacan los antibióticos; tratamientos agresivos como la radioterapia y quimioterapia antineoplásicas, las drogas inmunosupresoras y enfermedades complicadas como el SIDA, entre otros.

Así Carranza (15) mencionó la existencia de enfermedades gingivales de origen micótico, escasas en pacientes inmunocompetentes, pero muy frecuentes en aquellas personas inmunocomprometidas, así como también personas que hayan sido sometidas a un tiempo prolongado de antibioticoterapia, la infección más frecuente es la candidiasis oral, producida por *Cándida albicans*, que según Shafer (53) explicó que los síntomas además de afectar a la cavidad bucal, lesiona la piel, el aparato digestivo, conducto vaginal, aparato urinario y pulmones.

2.2.1 GÉNERO CÁNDIDA

Negroni ⁽⁵⁴⁾ manifiesta que los hongos del género *Cándida* son levaduras, es decir que son de talo unicelular, abarcando este género más de '200' especies sumamente ubicuas y con características muy diversas.

El género *Candida* incluye ocho especies de hongo, donde enfatizaron Sapp et al ⁽¹³⁾ en su estudio; de los cuales *Candida albicans*, se la ha considerado como el microorganismo que se ha encontrado con más frecuencia. Comúnmente aisladas ante la presencia de una infección

2.2.1.1. Descripción de la cepa

Sapp et al ⁽¹³⁾ indicaron que estos microorganismos se muestran como levaduras en gemación o también como pseudohifas; se observan en cadenas de células alargadas enlazadas entre las células. Liébana ⁽⁵⁵⁾ establece que la *Cándida* se puede presentar como células redondas u ovaladas, con presencia de un metabolismo aerobio siendo Gram positivas.

Ortega et al ⁽²⁰⁾ han descrito a la levadura del género *Candida* como un hongo común y habitual de la mucosa bucal, del sistema gastrointestinal, vagina e incluso ha sido aislada en la piel; por lo que también fue considerado como un agente infeccioso endógeno específico. De escasa virulencia, no transmisibles, pero producen infección de la mucosa cuando existe predisposición local o general, por lo que recibieron el nombre de levaduras oportunistas.

Añadieron Ortega et al ⁽²⁰⁾ en cuanto al crecimiento de *Candida albicans*, donde esta levadura crece en mejores condiciones en superficies húmedas y a temperatura corporal, es así como se ha mencionado que es causante de patologías génito-urinarias; a nivel de la piel, es común encontrar infecciones epiteliales como dermatitis de pañal; y a nivel bucal, es común encontrar muguet bucal, especialmente en niños. *Candida albicans* se ha

encontrado en la cavidad bucal en un '40%' de la población, siendo escaso en pacientes sanos en un número 'menos de 200 células/ mL de saliva' de la muestra poblacional que ha sido estudiada.

2.2.1.2. Taxonomía

Describió Aguilera ⁽⁵⁶⁾ la clasificación taxonómica de *Candida albicans*:

- **Género:** Candida
- **Reino:** Fungi
- **Phylum:** Ascomycota
- **Clase:** Ascomycetes
- **Orden:** Saccharomycetales
- **Familia:** Saccharomycetaceae

2.2.1.3. Factores de Virulencia

Negroni ⁽⁵⁴⁾ afirmó que este microorganismo posee gran facilidad para crecer y multiplicarse, siendo el mayor factor de virulencia de este hongo ha sido la capacidad para adherirse tanto a células del hospedador como a otros microorganismos además de su capacidad de adherencia a materiales inertes y colonizarlos.

Por lo que Otero ⁽¹⁴⁾ afirmó que la presencia de especies de género *Candida*, en la mucosa bucal se halla en forma habitual, en un porcentaje de '7 al 65%', por lo que dicho número no es un factor para predisponer a sufrir infecciones dadas por esta levadura, es decir que, si una persona que posea un número indeterminado de *Candida*, y se encuentre inmunodeprimido, será apto para sufrir de candidiasis, es así que se ha considerado como un patógeno oportunista, por lo que suele denominarse la 'enfermedad de enfermos'.

La Candidiasis oral o Candidosis son las infecciones micóticas orales más frecuentes producidas por la levadura *Candida*, que se encuentra según Sapp et al (13) presente en la flora normal de la cavidad bucal y de los intestinos. Mencionaron Otero et al (14) que la candidiasis es una infección oportunista, que ataca cuando el sistema inmunológico del paciente se ve disminuida.

Carranza et al (15), manifestaron que entre los factores que inducen a presentar Candidiasis, están: la reducción de las defensas del hospedador, donde encontramos a personas portadoras del VIH, pacientes con diabetes mellitus, personas que han recibido tratamientos con radiación y quimioterapia, así como también pacientes geriátricos portadores de prótesis dentales, quienes son susceptibles al padecimiento de Candidiasis atrófica o candidiasis protética.

Por lo que Aguirre (16) menciona que la incidencia de Candidiasis protética en la actualidad está en aumento en los países desarrollados debido a diferentes factores facilitadores como la generalización del uso de prótesis dentales, la xerostomía, las múltiples terapias con antibióticos, inmunosupresores, antineoplásicos y por supuesto el sistema inmunológico disminuido.

Existen diversos factores potenciales de virulencia, como la morfología celular, la actividad enzimática extracelular, el cambio fenotípico y los factores de adhesión, que favorecen la formación de biopelículas⁽²²⁾.

MORFOGÈNESIS

Catrillon et al⁽²²⁾ manifiestan que *Candida albicans* crece como levaduras o como hifas. La hifa es la forma de adaptación para la adherencia y penetración de los epitelios y células endoteliales. Se refiere a la transición entre las levaduras (unicelulares) y la forma de crecimiento filamentosa del microorganismo, que puede convertirse de forma reversible a células de levadura, con crecimiento de hifa o pseudohifa.

ENZIMAS

‘Las enzimas pueden proponerse como determinantes de virulencia en *Candida*, ya que tienen la capacidad de romper polímeros que proporcionan nutrientes accesibles para el crecimiento de los hongos, así como de inactivar las moléculas útiles en la defensa del

organismo. Las principales enzimas extracelulares relacionadas con la patogénesis de *Candida* son las proteasas, fosfolipasas y lipasas` Castro et al (30)^(p-4).

FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS

Castro et al (30)^(p-4) mencionaron que ‘las especies de *Candida* se reconocen como los principales agentes de infecciones adquiridas en el hospital. Son el tercer o cuarto patógeno aislado de sangre que sobrepasa la frecuencia de los bacilos gramnegativos.’

2.2.1.4. Antifúngicos convencionales para tratar patologías por *Candida albicans*

En cuanto al tratamiento aplicado contra *Candida albicans*, Castellanos et al ⁽⁵⁷⁾mencionaron que es necesario la evaluación clínica, distributiva y que estudie la gravedad de la enfermedad. Una vez hecho el diagnóstico minucioso se evalúa el procedimiento a usar, si se opta por un método de acción tópica, como el clotrimazol, el paciente debe mantener el medicamento en boca por ‘30 minutos’ aproximadamente, pero cabe mencionar que su uso prolongado puede ocasionar caries dental, para ello es indispensable que se alterne el uso de colutorios a base de flúor, Clorhexidina al ‘2%’o también se opta por usar Nistatina en suspensión tres veces al día. El tratamiento sistémico para *Candidiasis* incluye imidazoles y triazoles, cuando se presenten casos de resistencia a estos, se opta por el uso de anfoterisina B, que es de manejo intrahospitalario.

Prieto ⁽⁵⁷⁾ en su investigación indicó la existencia de varios agentes antifúngicos, que los definió como compuestos químicos que presentaron un grado de toxicidad. Se mencionará y se hará énfasis en el antimicótico Nistatina.

Nistatina

Golan ⁽⁵⁸⁾ indicó que Nistatina es un antifúngico del grupo poliénico el cual posee cierto mecanismo de acción similar al de la anfotericina B, este fármaco no tiene suficiente absorción a través de las mucosas del cuerpo o la piel, por lo que su uso se limita a infecciones micóticas exclusivos del aparato digestivo. Prieto ⁽⁵⁷⁾ menciona que la

concentración mínima inhibitoria de nistatina contra *Candida albicans* es de '2µg/mL'; así mismo presenta acción fungicida en concentraciones elevadas en el sitio de acción, mientras que Srivatstava et ⁽¹⁹⁾ al mencionaron que su concentración no es suficiente en el sitio de acción, ya que la saliva ayuda a su dispersión, por lo que podría ser administrada en forma sistémica, en dosis altas y por un tiempo prolongado, que según Golan ⁽⁵⁸⁾ probablemente causaría efectos secundarios, tales como alteraciones gastrointestinales.

CAPITULO III

3. METODOLOGÍA

3.1. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Experimental.- ya que para esta investigación utilizaremos medios de cultivo para la siembra de la cepa *Cándida Albicans*, con lo que podremos obtener posteriormente el recuento de dicho microorganismo, después de ser sometido a la acción del aceite esencial de orégano al 100%. Acciones que se llevarán a cabo en el Laboratorio del Centro de Biología de la Universidad Central del Ecuador.

Cualitativo, ya que presentará paulatinamente resultados a medida que se recopile la información.

Bibliográfico porque es necesario determinar datos o evidencia en libros y artículos científicos que respalden la elaboración del marco teórico, análisis y discusión de la investigación.

Comparativo, ya que se analizarán dos tipos aceite esencial de orégano, el primero proveniente de la provincia de Chimborazo; el segundo de la provincia de Santa Elena. Se tomarán los datos para determinar, cual de los dos extractos tiene mayor poder inhibitorio contra la cepa *Cándida albicans* ATCC 10231.

Finalmente aplicaré el método **Estadístico** siendo de vital importancia en este estudio, ya que permitirá reunir, organizar, tabular y analizar en datos numéricos la información, cuya interpretación servirá para registrar los resultados donde observaremos y compararemos según estos resultados la efectividad antimicótica del aceite esencial de orégano al 100%, oriundo de las provincias de Chimborazo y de Santa Elena, frente a *C. albicans*.

3.2. CLASIFICACION DE LAS VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO	CLASIFICACION	INDICADOR CATEGÓRICO	ESCALA DE MEDICIÓN
Efecto antimicótico	Disminución o detención del número de células de levadura oportunista/ saprófito, propio de las mucosas o membranas corporales	Dependiente Interviniente	Cualitativa Nominal	Curva de crecimiento a través conteo de células en cámara de Neubauer. Conteo de colonias en Agar	Neubauer: número de células/ml Agar: Ufc/ml.
Aceite esencial de orégano de la provincia de Chimborazo al 100% de concentración	Sustancia química proveniente de las hojas de planta de orégano oriundo de la provincia de Chimborazo, que se va a obtener por el método de arrastre de vapor.	Independiente	Cuantitativa Intervalo	Volumen a utilizar De Aceite esencial de orégano perteneciente a la provincia de Chimborazo en concentración de 100%	0.3 - 0.5ml de aceite esencial.
Aceite esencial de orégano de la provincia de Santa Elena al 100% de concentración.	Sustancia química proveniente de las hojas de planta de orégano oriundo de la provincia de Santa Elena, que se va a obtener por el método de arrastre de vapor.	Independiente.	Cuantitativa Intervalo	Volumen a utilizar De Aceite esencial de orégano perteneciente a la provincia de Chimborazo en concentración de 100%	0.3 - 0.5ml de aceite esencial.

3.3. POBLACION Y MUESTRA

POBLACIÓN. – La población utilizada para el presente estudio es la cepa de la levadura *Cándida Albicans* ATCC 10231, adquirida al Laboratorio Microbiológico - Clínico MEDIBAC, estas serán cultivadas en las instalaciones del Centro de Biología de la Universidad Central del Ecuador, donde se llevará a cabo la ejecución de esta investigación.

TAMAÑO DE LA MUESTRA. -

SELECCIÓN. -

MUESTRA NO PROBABILÍSTICA. – es una técnica de muestreo que permite seleccionar los elementos, sujetos a estudio, según el criterio de la persona que se encuentra realizando la investigación, en este estudio tanto la selección y el tamaño de la muestra se realizaron en base al estudio de Ucar et al (12), el mismo que se explica más adelante.

MUESTREO POR CONVENIENCIA.

Para obtener la muestra, primero se realizó la activación de la cepa ATCC 10231, para lo cual se efectuó la siembra en agar dextrosa Sabouraud contenida en una caja mono Petri; incubamos esta siembra por tres días.

Se inoculará la cepa de *C. Albicans* en láminas de acrílico, que a su vez estarán sumergidas en 100ml de caldo de cultivo de Dextrosa Sabouraud, se incubará a 37⁰C por dos días. Serán 14 láminas de acrílico de termocurado, donde se pretende obtener la muestra a una concentración de 0,5 en la escala de Mac-Farlan (10⁸) de colonias de la levadura en mención.

Se aplicó el método usado por Ucar et al (12), donde se realiza el mismo procedimiento de inoculación cepas de *Candida albicans* sobre láminas de acrílico; para comprobar la acción de cuatro agentes químicos para eliminar la levadura; los autores presentaron una

muestra de 50 láminas de acrílico, que fueron divididas en cinco grupos, cada uno con 10 muestras de láminas de acrílico. ‘Grupo 1: control, grupo 2: hipoclorito de sodio al 2%, grupo 3: ácido acético al 5%, grupo 4: peróxidos alcalinos, grupo 5: gluconato de clorhexidina al 0.2%’.

Para la realización de este trabajo, se redujo el número a 14 láminas de acrílico, ya que se evaluó el efecto antimicótico de dos aceites esenciales de orégano proveniente de las provincias de Chimborazo y Santa Elena; el tamaño de las láminas de acrílico de este estudio fueron hechas bajo los mismos parámetros que utilizó Ucaro et al (12) (25mm de ancho, 25mm de largo y 3mm de espesor).

Conjunto con el Químico Andrés Granda, profesional que forma parte del Laboratorio de Biología de la Universidad Central del Ecuador se procedió a establecer la muestra que se va a utilizar, por conveniencia de tiempo y economía de la estudiante; ya que se presenta costoso, el proceso de extracción del aceite esencial de orégano.

3.4. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Plantas que han cumplido con los requisitos mencionados en la selección de la muestra.
- Hongo *Candida albicans* ATCC 10231 cultivadas en agar Sabouraud Dextrosa a 36°C, en un ambiente aerobio por 24 horas.
- Aceite esencial de orégano de Chimborazo y Santa Elena al 100%, extraído bajo técnica de arrastre de vapor, realizado en la Unidad de Química de la Universidad Central del Ecuador
- Nistatina (2 µg/mL)
- Agua hervida.
- Láminas de Acrílico de termocurado estériles, con las dimensiones de 25 mm x 25 mm x 3 mm.

3.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Láminas de acrílico que no se hayan inoculado o contaminado en una medida de (10)⁸ en la escala Mc-Farlan.
- Hongo *Candida Albicans* ATCC que no han sido cultivadas bajo las condiciones adecuadas para su crecimiento.
- Colonias de la levadura *Candida Albicans* ATCC cultivadas en Agar, que no tengan las características en cuanto forma, color, espesor y crecimiento inadecuado.
- Aceite esencial de orégano con porcentaje inferior al 100%
- Láminas de acrílico de termocurado contaminadas o no estériles.

3.5. INSTRUMENTOS:

CAMARA DE NEUBAUER.-

La cámara de conteo es una placa de vidrio óptico especial, de base rectangular y gruesa de precisión, del tamaño de un porta-objetos, en el tercio medio. Se utiliza para contar células u otras partículas en suspensiones bajo el microscopio; presenta también un puente central y los dos puentes exteriores están rectificadas planos y pulidos. La superficie del puente central es más profunda que los dos puentes exteriores. En el puente central (fondo de la cámara) están grabadas las redes de conteo. Las cámaras de conteo se utilizan principalmente para el análisis de sangre (conteo de leucocitos, eritrocitos, trombocitos). Pero las cámaras de conteo sirven también para el conteo de bacterias, esporas del moho y para cualquier tipo de recuento citológico. (59)

METODO DE ARRASTRE DE VAPOR.-

La destilación por arrastre con vapor ha sido descrita como una técnica usada para separar sustancias orgánicas insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras no volátiles que se encuentran en la mezcla, como resinas o sales inorgánicas, u otros

compuestos orgánicos. Esta técnica es empleada con mucha frecuencia para separar aceites esenciales de tejidos vegetales. (60)

3.6. PROCEDIMIENTO

El presente estudio está dividido en las siguientes fases:

a) Fase de recolección de datos y descriptiva

En esta se recopiló toda la información pertinente sobre el efecto antifúngico del aceite esencial de orégano para inhibir a el microorganismo *Candida albicans*, su uso en el ámbito odontológico; dicha información abarcará conceptos, teorías estudios e investigaciones previas, todo con el fin de validar el presente trabajo.

b) Fase experimental:

- En esta se procedió a determinar los criterios para la obtención de las muestras de las plantas provenientes de las provincias de Chimborazo (Riobamba) y de Santa Elena (Santa Elena) y obtener muestras que cumplan con los requisitos necesarios para el estudio.
- Se realizó los informes taxonómicos de las plantas de orégano procedente de las provincias de Chimborazo y Santa Elena, dicho informe fue realizado por el Botánico Richard Cabezas, profesional que forma parte del Centro de Biología de la Universidad Central del Ecuador (ANEXO1)
- Se ha obtenido por importación bajo pedido a Laboratorio Microbiológico - Clínico MEDIBAC la cepa del hongo *Cándida albicans* ATCC 10231.

Una vez obtenido las muestras correctas de las plantas de Orégano, se procedió a extraer su aceite esencial. Se obtuvo dicha sustancia a través del método por arrastre de vapor, este procedimiento se lo realizará bajo la tutela del Químico Max Bonilla, catedrático del área de La Unidad de Química de la Universidad Central del Ecuador.

i. Proceso para la extracción de aceite esencial de orégano

- Se procedió a la recolección de las hojas de las plantas de orégano de las provincias de Chimborazo y Santa Elena.
- Para lavar a las hojas de la planta de orégano, que son la materia prima para extraer el aceite esencial; se las sumergió en una combinación de ácido acético al 10% más agua por 5 minutos.
- El secado de las hojas se realizó en una estufa a 40°C, éstas fueron empaquetados en papel.
- Una vez que las hojas de la planta estén secas, se procedió a pesar 200g de planta, para su posterior trituración.
- Ya trituradas las hojas, fueron colocadas en un balón de destilación, donde se añadió 30ml de agua destilada.
- Una vez armado el equipo de destilación, se extrajo el aceite esencial de orégano; por método de arrastre de vapor. Proceso que dura varias horas. El tiempo que se empleó para extraer la cantidad requerida fue de dos meses aproximadamente.
- El aceite esencial, fue colocado en frascos color ámbar, debidamente rotulados, tapados y se mantuvo almacenados en refrigeración a una temperatura de 4 – 8°C.
- Se logró obtener 10ml de aceite esencial de orégano tanto de Chimborazo como de Santa Elena.
- Se adjunta un certificado por parte del Centro de Química para validar el proceso. (ANEXO 4).

ii. Elaboración de láminas de acrílico de termocurado.

Se elaboró una solicitud previa, para que se me permita trabajar en el Laboratorio de Prótesis de la Facultad de Odontología de la Universidad Central del Ecuador. En estas instalaciones se va a realizo 14 láminas de acrílico de termocurado, éstas tendrán las siguientes dimensiones: 2.5mm de ancho, 2.5 mm de largo y 3mm de espesor, dimensiones que semejan a una Prótesis removible, por lo que las láminas serán elaboradas con los mismos protocolos con las que son fabricadas dichas prótesis.

iii. Activación y Cultivo de la cepa *Cándida albicans* ATCC 10231

- Una vez que la exportadora MEDIBAC, entregó la cepa, esta fue tratada bajo las instrucciones de su empaque; esta viene en estuche KWIK – Stik™. (ANEXO 5)
- Se adjuntan la respectiva factura y licencia de la cepa *Cándida albicans* ATCC 10231. (ANEXO 6-7).
- Se procedió a realizar la siembra mediante estriaciones con un asa estéril de la cepa *Cándida albicans* ATCC 10231, en 5 cajas petri, que contienen agar Dextrosa Sabouraud, medio específico para el crecimiento y mantenimiento de la espora.
- Se conservaron las cajas petri con la siembra de cepas de esta espora, dentro de la incubadora en un ambiente aeróbico y estéril por 24 horas a 36°C

iv. Ejecución del proyecto de investigación.

Estandarización de la Cepa *Cándida Albicans* ATCC 10231

- Se inoculó a la cepas de *Candida albicans*, donde formaron colonias aisladas en cajas petri con agar Dextrosa Sabouraud, que realizamos en el proceso anterior.
- Se preparó 50 ml de caldo de cultivo con dextrosa Sabouraud en el que se inocularon cepas de *Candida albicans* mediante un asa estéril de las cajas petri, donde ya se presentan colonias formadas.
- Una vez inoculado el caldo de cultivo con la cepa, se procedió a incubarlo por 48 horas en una temperatura de 36°C.

- Mediante la Escala de Mc- Farland se procedió a medir la densidad del frasco que contiene cepas de *C. albicans* inoculadas, donde obtendremos 0.5 o 10^8 de número de células de dicha espora.
- Pasadas las 48 horas de incubación del caldo de cultivo, se tomaron 10ml del mismo y se colocó en un tubo de ensayo.
- Se realizó una comparación visual con la escala Mc-Farlan, donde se determinó que el tubo de ensayo tenía una concentración de 5 en la escala mencionada.
- Posteriormente se realizó una dilución, colocando en un tubo de ensayo estéril 4.5 ml de suero fisiológico + 0.5ml del inóculo con 5 Mc-Farlan para obtener una concentración de 0.5 en la escala Mc-Farlan. Proceso que se realizó con la finalidad de poder realizar el conteo de unidades formadoras de colonias en cámara de Neubauer y en agar.
- En un recipiente grande de vidrio y de boca ancha, se preparó 100ml de caldo de cultivo dextrosa Sabouraud donde se incorporó 3ml del inóculo de 0.5 Mc-Farlan para contaminar el caldo con la levadura de *Candida albicans*.
- A continuación en el frasco con la preparación anterior se colocó 14 láminas de acrílico de termocurado, previamente autoclavadas a 121°C por 15 minutos para que sean inoculadas con *C. albicans* ATCC 10231 en un tiempo de 24 horas a 36°C ; por lo que cada lámina tendrá inoculado 10^8 número de células, medidas según la escala de Mc- Farland. Ya que fueron contaminadas con 0.5 Mc-Farlan.

Análisis del efecto inhibitorio del aceite esencial de orégano frente a *Cándida Albicans* ATCC10231

Se necesitaron 14 frascos estériles con tapa para colocar las 14 láminas de acrílico que fueron inoculadas con la cepa mencionada con el proceso anterior.

- Frasco #1 control cero.- se colocaron 50ml de agua.
- Frasco #2 control positivo.- 50ml de agua + 2 µg/ml de Nistatina.

Frascos parte experimental:

- Frascos #3 – 4 -5: lámina inoculada (en cada frasco) con la muestra de *Candida albicans* ATCC 10231 sumergida en 50 ml de agua + 0,3ml de aceite esencial de orégano de la provincia de Chimborazo.
- Frascos #6-7-8 (en cada frasco) con lámina inoculada con la muestra de *Candida albicans* ATCC 10231 sumergida en 50 ml de agua hervida + 0,5 ml de aceite esencial de orégano de la provincia de Chimborazo.
- Frascos #9-10-11 (en cada frasco) con lámina inoculada con la muestra de *Candida albicans* ATCC 10231 sumergida en 50 ml de agua + 0,3ml de aceite esencial de orégano de la provincia de Santa Elena.
- Frascos #12-13-14 (en cada frasco) con lámina inoculada con la muestra de *Candida albicans* ATCC 10231 sumergida en 50 ml de agua + 0,5ml de aceite esencial de orégano de la provincia de Santa Elena.

Contaje celular

En el presente trabajo de investigación, se obtuvo los resultados a través del uso de la cámara de Neubauer, para ello se tomó 0,10 µl de cada uno de los frascos que contenían las láminas contaminadas con la cepa en mención más los aceites esenciales de orégano; para que exista unión entre estas sustancias (agua y aceite) fue necesario la colocación de TWIN 80 en un tubo de ensayo, en una proporción uno a uno (3ml del inóculo + 3ml de TWIN), cada tubo fue sometido a vibración por 3 minutos antes de extraer la muestra de 0.10µl con la micropipeta para ser colocada en la cámara de Neubauer, donde posteriormente se procedió a realizar este contaje celular a través del microscopio; se efectuó un intervalo de tiempos para realizar el contaje celular

desde el tiempo inicial (primer conteo), a las 12 horas (segundo conteo), 24 horas (tercer conteo) y 48 horas (cuarto conteo).

Siembra en agar.

Para el respaldo de resultados se decidió realizar el sembrado de cada frasco que contiene: los controles cero y control positivo; así como también los frascos con la levadura *Candida albicans*, agua más los aceites de Chimborazo y Santa Elena.

Previo a la realización de las respectivas siembras, se volvió a realizar la disolución a 10^{-1} de cada uno de los frascos.

- Se prepararon dos cajas petri con agar Dextrosa Sabouraud por cada frasco de experimentación, en total fueron 24 cajas petri.
- En tubos de ensayo previamente esterilizados se realizó una disolución de 10^{-1} de cada uno de los 14 frascos que contienen las láminas de acrílico + aceite esencial de orégano.
- Se realizó la técnica de Digrafsky para la siembra, donde se tomó con una jeringa 0.10ml de la solución de cada uno de los tubos de ensayo, a través del asa de Digrafsky, se distribuyó la mezcla en el agar.
- Posteriormente estas cajas petri fueron almacenadas en la incubadora a 36°C.
- Este proceso de siembra en agar por duplicado, fue realizado en dos tiempos: en el tiempo inicial (momento en el cual se colocó la lámina de acrílico inoculada con la levadura en mención, el aceite esencial de orégano, agua más TWIN) y en el tiempo final (48 horas)
- El conteo de colonias que crecieron en el agar Dextrosa Sabouraud, se lo realizó mediante un lente de aumento, que cuenta con cuadros de agrupación de colonias para facilitar la observación y el conteo.

Es importante mencionar que estos procesos fueron realizados siguiendo todas las normas de bioseguridad, impartidas desde el inicio por nuestro tutor encargado en el laboratorio, Químico Andrés Granda.

Por parte del Centro de Biología de la Universidad Central del Ecuador, se ha emitido un certificado de resultados, que respaldan la validación de esta investigación. (ANEXO 3).

3.7. Análisis de Datos.

Se realizó un análisis cuantitativo, ya que lo que se busca es obtener datos medibles, estos se los colocara en una escala nominal, así podremos ubicarlos en diferentes categorías con valores numéricos, posteriormente se recopiló los datos en tablas dinámicas y tablas de frecuencia que ayuden a determinar la proporción de eficacia de los datos recopilados. Todo esto se realizara mediante la utilización de los paquetes de Microsoft Word y Excel.

Para el análisis de resultados se utilizara el software estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, o Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales. También se aplicarán pruebas paramétricas con ANOVA

3.8. Aspectos Jurídicos.

- i. Esta investigación, por ser un estudio in vitro no incluye estudios que comprometan prácticas que involucren la vulnerabilidad de seres humanos, por lo que no incumple ninguna ley o normativa vigente tanto nacional como internacional.
- ii. En este estudio no se aplicarán estudios multicéntricos.

- iii. Para la presente investigación no se cuenta con un promotor del estudio, por ello, no existe relación con este y con el sitio clínico en donde se ejecute la misma.
- iv. En este estudio no se solicitará póliza de seguro

Por ende es importante citar la **NORMATIVA DE SALUD VIGENTE** desde el año 2016, citado el 22 de diciembre del mismo, en nuestro país ^{Fuente especificada no válida. (p 31-32)}, publicada mediante Registro Oficial número 423. Artículos:

‘Art. 189.- Los integrantes del Sistema Nacional de Salud respetarán y promoverán el desarrollo de las medicinas tradicionales, incorporarán el enfoque intercultural en las políticas, planes, programas, proyectos y modelos de atención de salud, e integrarán los conocimientos de las medicinas tradicionales y alternativas en los procesos de enseñanza - aprendizaje.’

‘Art. 190.- La autoridad sanitaria nacional promoverá e impulsará el intercambio de conocimientos entre los distintos agentes de las medicinas tradicionales, fomentará procesos de investigación de sus recursos diagnósticos y terapéuticos en el marco de los principios establecidos en esta Ley, protegiendo los derechos colectivos de los pueblos indígenas y negros o afroecuatorianos.’

‘Art. 192.- Los integrantes del Sistema Nacional de Salud respetarán y promoverán el desarrollo de las medicinas alternativas en el marco de la atención integral de salud. Las medicinas alternativas deben ser ejercidas por profesionales de la salud con títulos reconocidos y certificados por el CONESUP y registradas ante la autoridad sanitaria nacional. Las terapias alternativas requieren para su ejercicio, el permiso emitido por la autoridad sanitaria nacional.’

La ley de salud, fomentan las investigaciones que involucran el uso de recursos naturales, para la creación y promoción de medicina alternativa; es por eso, que en este estudio, se ha implementado la planta de orégano, para aprovechar sus

beneficios, que son múltiples, pero que en nuestro caso, será para contrarrestar patologías orales causadas por la levadura *Candida albicans*, por lo que buscamos saber su potencial antimicóticos a través del uso de su aceite al 100% de concentración.

Se realizó un certificado para el Consejo de Bioética de la Universidad Central del Ecuador, donde los miembros participantes de esta investigación, han firmado para mantener los resultados de la misma bajo los parámetros éticos, dados por la Universidad. (ANEXO 2).

CAPITULO IV

4. ANALISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. Análisis Estadístico de los Resultados

Los resultados obtenidos a través del Contaje celular en Cámara de Neubauer y del Conteo en Agar fueron registrados en una hoja de cálculo de Microsoft Excel, para poder organizarlos en tablas, los mismos datos serán analizados también en el paquete estadístico SPSS.

Para el presente estudio se tomaron como muestras 14 láminas de acrílico de termocurado inoculadas con la cepa de *Candida albicans*, las mismas que fueron sometidos a dos sustancias: aceite esencial de las provincias de Chimborazo y Santa Elena.

Las muestras fueron divididas de la siguiente forma:

- 12 muestras de láminas de acrílico para la combinación de agua + Aceites esenciales de orégano(Grupo experimental)
- 1 muestra de lámina de acrílico para la combinación de agua + Nistatina (control positivo)
- 1 muestra de lámina de acrílico para agua. (control cero).

4.1.1 Análisis del Conteo de células en Cámara de Neubauer.

Prueba de Normalidad:

Primeramente se debe verificar que las muestras tomadas provienen de una población con distribución **Normal**, esto se realiza con las pruebas de Kolmogorov - Smirnov o con la prueba de Shapiro - Wilk (menor a 20 datos).

Si las muestras provienen de poblaciones con distribución normal entonces se realizan pruebas paramétricas (media, desviación estándar): T student, ANOVA.

Si las muestras No provienen de poblaciones con distribución normal entonces se realizan pruebas no paramétricas (orden, signos): Mann Whitney, Kruskal Wallis, Wilcoxon

Para cada prueba de Hipótesis, se compara el valor de significación con el 0,05 (95% de confiabilidad), si el nivel de significación es superior a 0,05 se acepta Ho (hipótesis inicial), si es inferior a 0,05 se acepta Ha (hipótesis alterna).

Hipótesis a demostrar

Ho: Las muestras provienen de poblaciones con distribución Normal

Ha: Las muestras NO provienen de poblaciones con distribución Normal

Tabla A. Pruebas de Normalidad.

Pruebas de normalidad

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadísti co	gl	Sig.	Estadísti co	gl	Sig.
Control cero H2O	0,133	4	.	1,000	4	1,000
Control positivo	0,295	4	.	0,857	4	0,250
CHIMBORAZO 0,3 ml	0,285	4	.	0,919	4	0,530
CHIMBORAZO 0,5 ml	0,162	4	.	0,989	4	0,952
SANTA ELENA 0,3 ml	0,263	4	.	0,891	4	0,389
SANTA ELENA 0,5 ml	0,212	4	.	0,933	4	0,614

Fuente: Cámara de Neubauer
Realizado por: Ing. Molina

De la prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk los valores de significación (Sig) son superiores a 0,05 (95% de confiabilidad), luego se acepta Ho, esto es las muestras provienen de poblaciones con distribución Normal, por tanto para realizar las comparaciones se lo hace con pruebas paramétricas: ANOVA.

ANOVA: COMPARACIÓN ENTRE SUSTANCIAS EN 0.3 ML.

Ho: Todas las medias son similares

Ha: Algunas de las medias No son similares

Tabla B. Comparación entre sustancias en volumen 0.3 ml. Descriptivos

Descriptivos								
MEDIDAS 0,3 ml								
	N	Me dia	Desvia ción estánda r	Error estánd ar	95% del intervalo de confianza para la media		Mín imo	Máxi mo
					Límite inferior	Límite superior		
Control cero H2O	4	5,1 89	0,0362	0,018 1	5,131446	5,246904	5,14 61	5,23 04
Control positivo NISTATINA	4	5,2 48	0,0371	0,018 5	5,188955	5,307095	5,20 41	5,27 88
CHIMBORAZO 0,3 ml	4	3,7 28	0,2569	0,128 4	3,319910	4,137640	3,36 79	3,97 00
SANTA ELENA 0,3 ml	4	3,5 88	0,3959	0,197 9	2,957980	4,218170	3,02 78	3,92 08
Total	1 6	4,4 38	0,8350	0,208 7	3,993545	4,883480	3,02 78	5,27 88

Fuente: Cámara de Neubauer
Realizado por: Ing. Molina

El nivel de significación (Sig = 0,000) es inferior a 0,05, luego se acepta Ha, esto es algunas medias no son similares, para verificar cuales son similares o no se realiza las pruebas de Tukey que compara las muestras dos a dos:

**Tabla C. Comparaciones múltiples entre Controles y aceites esenciales en 0.3ml.
PRUEBAS POST HOC**

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: MEDIDAS 03 ML						
HSD Tukey						
(I) SUSTANCIAS 0,3 ml	(J) SUSTANCIAS 0,3 ML	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Control cero H2O	Control positivo NISTATINA	- ,0588500	,1678 984	0,9 84	-,557324	,439624
	CHIMBORAZO 0,3 ml	1,460400 0*	,1678 984	0,0 00	,961926	1,958874
	SANTA ELENA 0,3 ml	1,601100 0*	,1678 984	0,0 00	1,102626	2,099574
Control positivo NISTATINA	Control cero H2O	,0588500	,1678 984	0,9 84	-,439624	,557324
	CHIMBORAZO 0,3 ml	1,519250 0*	,1678 984	0,0 00	1,020776	2,017724
	SANTA ELENA 0,3 ml	1,659950 0*	,1678 984	0,0 00	1,161476	2,158424
CHIMBORAZO 0,3 ml	Control cero H2O	- 1,460400 0*	,1678 984	0,0 00	- 1,958874	-,961926
	Control positivo NISTATINA	- 1,519250 0*	,1678 984	0,0 00	- 2,017724	-1,020776
	SANTA ELENA 0,3 ml	,1407000	,1678 984	0,8 36	-,357774	,639174
SANTA ELENA 0,3 ml	Control cero H2O	- 1,601100 0*	,1678 984	0,0 00	- 2,099574	-1,102626
	Control positivo NISTATINA	- 1,659950 0*	,1678 984	0,0 00	- 2,158424	-1,161476
	CHIMBORAZO 0,3 ml	- ,1407000	,1678 984	,83 6	-,639174	,357774

Fuente: Cámara de Neubauer
Realizado por: Ing. Molina

Se forman dos grupos totalmente diferentes, Son similares entre:

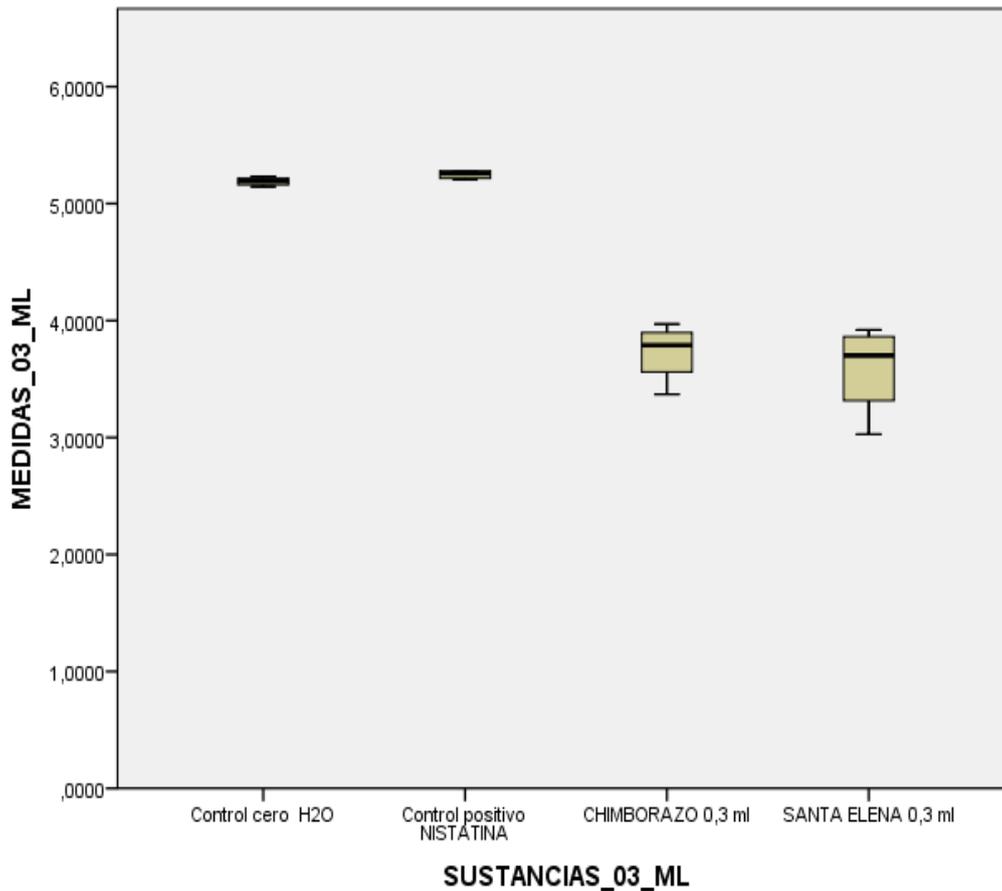
- SANTA ELENA 0,3 ml y CHIMBORAZO 0,3 ml
- Control positivo NISTATINA y Control cero H2O

Tabla D. Prueba Tukey para subconjuntos homogéneos entre aceite esenciales 0.3ml y controles.

MEDIDAS 03 ML			
HSD Tukey ^a			
SUSTANCIAS 03 ML	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
SANTA ELENA 0,3 ml	4	3,588075	
CHIMBORAZO 0,3 ml	4	3,728775	
Control cero H2O	4		5,189175
Control positivo NISTATINA	4		5,248025
Sig.		0,836	0,984

Fuente: Cámara de Neubauer
Realizado por: Ing. Molina

En la prueba paramétrica ANOVA, el método Tukey ha comparado dos grupos diferentes: como resultado del primer grupo, se observa que los volúmenes de 0.3ml de los aceites esenciales de Chimborazo y Santa Elena respectivamente son similares. Como segundo grupo se encuentran los denominados Controles, se obtuvo como resultado la similitud entre AGUA (Control cero) y AGUA + NISTATINA (control positivo).



Fuente: Cámara de Neubauer
 Realizado por: Ing. Molina

Grafico A. En la gráfica se observa que los dos grupos de control están muy por encima de las dos sustancias a probar, y no se tienen puntos atípicos (extremos)

Por ende, con estos resultados, se interpreta a los aceites esenciales de orégano de las provincias de Chimborazo y Santa Elena en el volumen de 0.3ml como EFECTIVO frente a la levadura *Candida albicans*, ya que el número de células observadas a través del microscopio en la cámara de Neubauer es menor al número del conteo celular del control positivo (agua + Nistatina) y del control cero (Agua), proceso que indicó también decrecimiento de la levadura, al paso de las horas citadas para el respectivo conteo.

ANOVA: COMPARACIÓN ENTRE SUSTANCIAS EN 0,5 ML.

Ho: Todas las medias son similares

Ha: Algunas de las medias No son similares

Tabla E. Descriptivos ANOVA: comparación entre sustancias en 0,5 ml.

Descriptivos								
MEDIDAS 0,5 ml								
	N	Me dia	Desvia ción estánd ar	Error están dar	95% del intervalo de confianza para la media		Mín imo	Máx imo
					Límite inferior	Límite superior		
Control cero H2O	4	5,1 89	0,0362	0,018 1	5,131446	5,246904	5,14 61	5,23 04
Control positivo NISTATINA	4	5,2 48	0,0371	0,018 5	5,188955	5,307095	5,20 41	5,27 88
CHIMBORAZO 0,5 ml	4	3,4 14	0,2680	0,134 0	2,987563	3,840537	3,12 48	3,75 33
SANTA ELENA 0,5 ml	4	3,7 51	0,2394	0,119 7	3,370786	4,132964	3,42 59	3,97 00
Total	16	4,4 00	0,8691	0,217 2	3,937628	4,863934	3,12 48	5,27 88

Fuente: Cámara de Neubauer

Realizado por: Ing. Molina

El nivel de significación (Sig = 0,000) es inferior a 0,05, luego se acepta Ha, esto es algunas medias no son similares, para verificar cuales son similares o no se realizan las pruebas de Tukey que compara las muestras dos a dos:

**Tabla F. Comparaciones múltiples entre aceites esenciales en volumen de 0.5 ml.
PRUEBAS POST HOC**

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: MEDIDAS 0,5 ML						
HSD Tukey						
(I) SUSTANCIAS 0,5 ml	(J) SUSTANCIAS 0,5 ml	Diferenci a de medias (I-J)	Error estánd ar	Sig .	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Control cero H2O	Control positivo NISTATINA	- ,0588500	,1283 984	0,9 67	-,440052	,322352
	CHIMBORAZO 0,5 ml	1,775125 0*	,1283 984	0,0 00	1,393923	2,156327
	SANTA ELENA 0,5 ml	1,437300 0*	,1283 984	0,0 00	1,056098	1,818502
Control positivo NISTATINA	Control cero H2O	,0588500	,1283 984	0,9 67	-,322352	,440052
	CHIMBORAZO 0,5 ml	1,833975 0*	,1283 984	0,0 00	1,452773	2,215177
	SANTA ELENA 0,5 ml	1,496150 0*	,1283 984	0,0 00	1,114948	1,877352
CHIMBORAZO 0,5 ml	Control cero H2O	- 1,775125 0*	,1283 984	0,0 00	- 2,156327	-1,393923
	Control positivo NISTATINA	- 1,833975 0*	,1283 984	0,0 00	- 2,215177	-1,452773
	SANTA ELENA 0,5 ml	- ,3378250	,1283 984	0,0 89	-,719027	,043377
SANTA ELENA 0,5 ml	Control cero H2O	- 1,437300 0*	,1283 984	0,0 00	- 1,818502	-1,056098
	Control positivo NISTATINA	- 1,496150 0*	,1283 984	0,0 00	- 1,877352	-1,114948
	CHIMBORAZO 0,5 ml	,3378250	,1283 984	0,0 89	-,043377	,719027

Fuente: Cámara de Neubauer
Realizado por: Ing. Molina

Tabla G. Prueba Tukey para subconjuntos homogéneos entre aceite esenciales 0.5ml y controles.

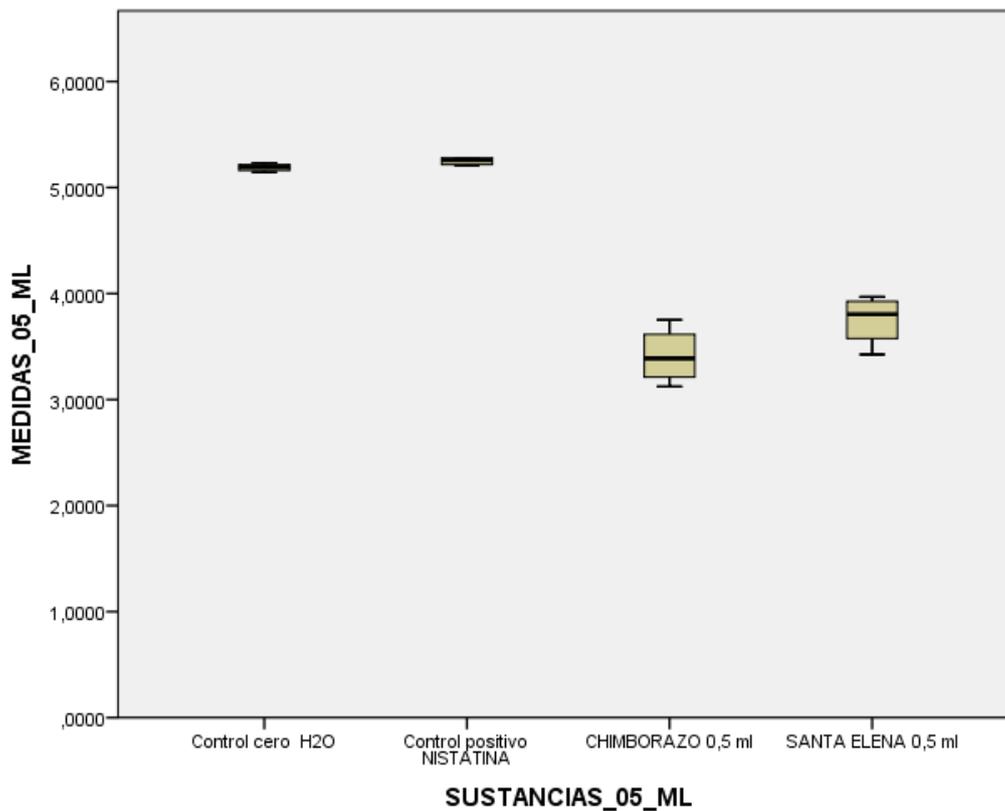
Se forman dos grupos totalmente diferentes, Son similares entre:

- SANTA ELENA 0,5 ml y CHIMBORAZO 0,5 ml
- Control positivo NISTATINA y Control cero H2O

MEDIDAS 05 ML			
HSD Tukey			
SUSTANCIAS 0,5 ml	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
CHIMBORAZO 0,5 ml	4	3,414050	
SANTA ELENA 0,5 ml	4	3,751875	
Control cero H2O	4		5,189175
Control positivo NISTATINA	4		5,248025
Sig.		0,089	0,967

Fuente: Cámara de Neubauer
Realizado por: Ing. Molina

En la prueba paramétrica ANOVA se ha utilizado el método Tukey para comparar dos grupos diferentes: como resultado del primer grupo, se observa que los volúmenes de 0.5ml de los aceites esenciales de Chimborazo y Santa Elena respectivamente son similares. Como segundo grupo se encuentran los denominados Controles, se obtuvo como resultado la similitud entre AGUA (Control cero) y AGUA + NISTATINA (control positivo).



Fuente: Cámara de Neubauer
Realizado por: Ing. Molina

Grafico B. En la gráfica se observa que los dos grupos de control están muy por encima de las dos sustancias a probar, y no se tienen puntos atípicos (extremos)

Por ende, con estos resultados, se interpreta a los aceites esenciales de orégano de las provincias de Chimborazo y Santa Elena en el volumen de 0.5ml como EFECTIVO frente a la levadura *Candida albicans*, ya que el número de células observadas a través del microscopio en la cámara de Neubauer es menor al número del conteo celular del control positivo (agua + Nistatina) y del control cero (Agua), proceso que indicó también decrecimiento de la levadura, al paso de las horas citadas para el respectivo conteo.

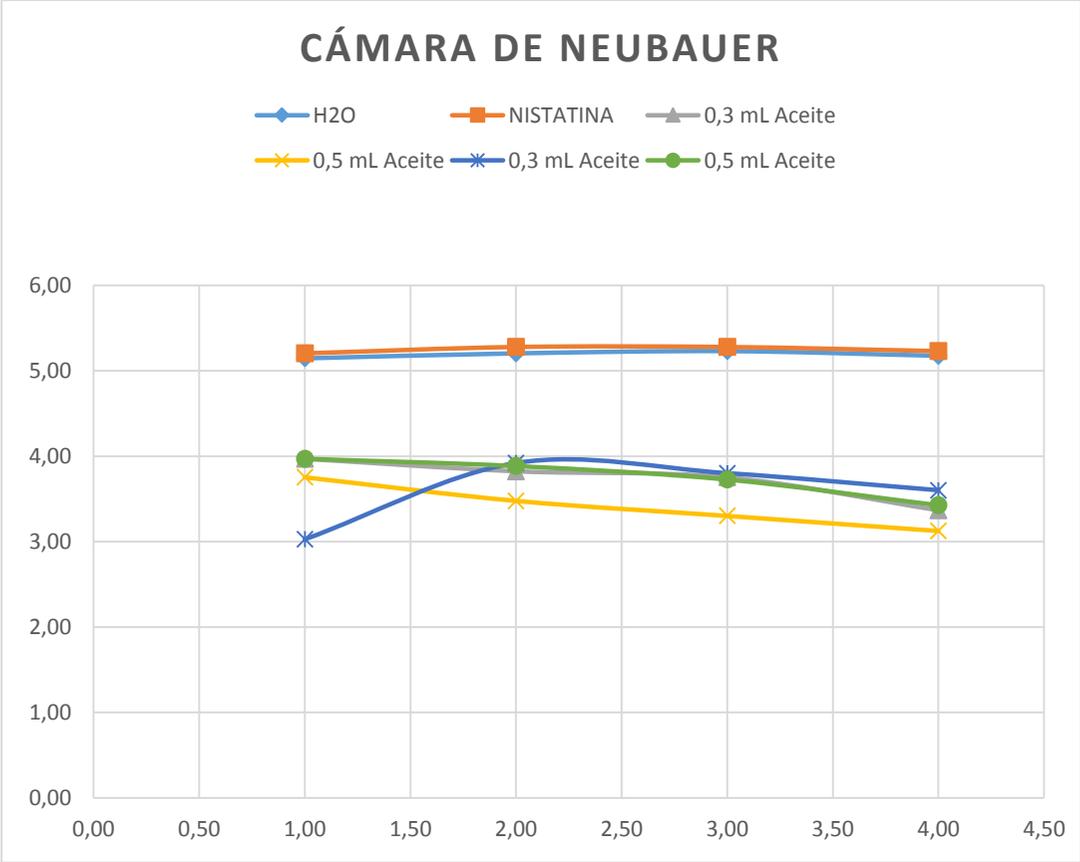
CONTEO DE CELULAS EN CÁMARA DE NEUBAUER

Tabla 1. Resultados - Promedios del Conteo celular en cámara de Neubauer de aceites esenciales de orégano 0.3 y 0.5 ml y controles.

CONTEO EN CÁMARA DE NEUBAUER							
		CONTROL CERO	CONTROL POSITIVO	ACEITE ESENCIAL DE OREGANO			
				CHIMBORAZO		SANTA ELENA	
		<i>Log₁₀</i> cél/mL					
		H2O	NISTATINA	0,3 mL Aceite	0,5 mL Aceite	0,3 mL Aceite	0,5 mL Aceite
1er conteo	7 a.m. (día 1)	5,15	5,20	3,97	3,75	3,03	3,97
2do conteo	6 p.m. (día 1)	5,20	5,28	3,82	3,48	3,92	3,88
3er conteo	7 a.m. (día 2)	5,23	5,28	3,75	3,30	3,80	3,73
4to conteo	7 a.m. (día 3)	5,18	5,23	3,37	3,12	3,60	3,43

Fuente: Cámara de Neubauer
Realizado por: Autora

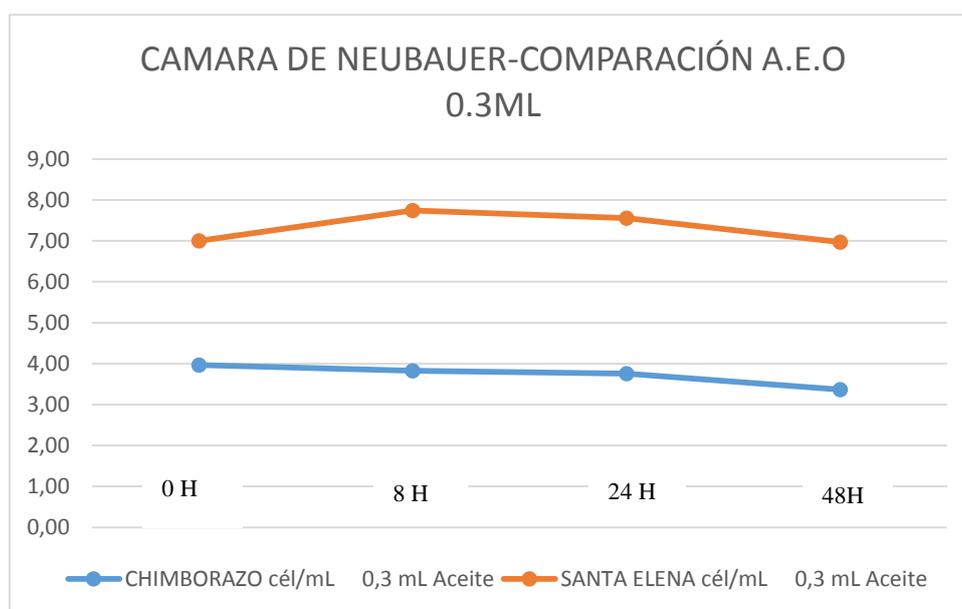
Grafico 1. Curvas de crecimiento de los promedios del conteo celular de 0.3 ml y 0.5 ml de aceite esencial de orégano y controles en Cámara de Neubauer.



Fuente: Cámara de Neubauer
Realizado por: Autora

En la presente gráfica se observa el comportamiento de las levaduras de *Candida albicans* con relación a los tiempos establecidos en los cuatro conteos realizados. El número de células por mililitro que se obtuvo a través de conteo celular en cámara de Neubauer, demostrando que al aplicar aceite esencial de orégano de las provincias de Chimborazo y Santa Elena la proliferación de levadura *Candida albicans* se ve reducida en comparación con los controles cero (agua) y positivo (agua + Nistatina); se evidencia que la curva de crecimiento celular al paso del tiempo, va decreciendo, siendo más evidente en los volúmenes de 0.5ml de aceite esencial de ambas provincias.

GRAFICO 1A. Curva de crecimiento en cámara de Neubauer. Aceite esencial 0.3ml de Chimborazo y Santa Elena.

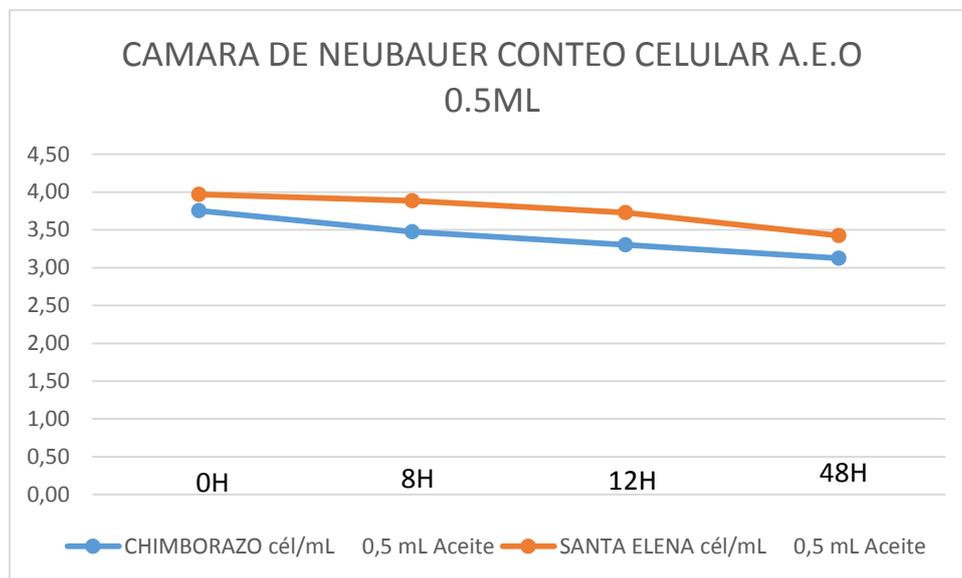


Fuente: Cámara de Neubauer

Realizado por: Autora

Se observa el decrecimiento del conteo de células de *Candida albicans* con la cámara de Neubauer, donde se aprecia que los tratamientos de 0.3 ml de los aceites esenciales de ambas regiones en las 48 horas presentan mayor efecto antimicótico, evidenciando que existe mayor efecto inhibitorio con el aceite proveniente de la provincia de Chimborazo por el notable decrecimiento de levaduras.

GRAFICO 1B. Curva de crecimiento en cámara de Neubauer. Aceite esencial 0.5ml de Chimborazo y Santa Elena.



Fuente: Cámara de Neubauer
Realizado por: Autora

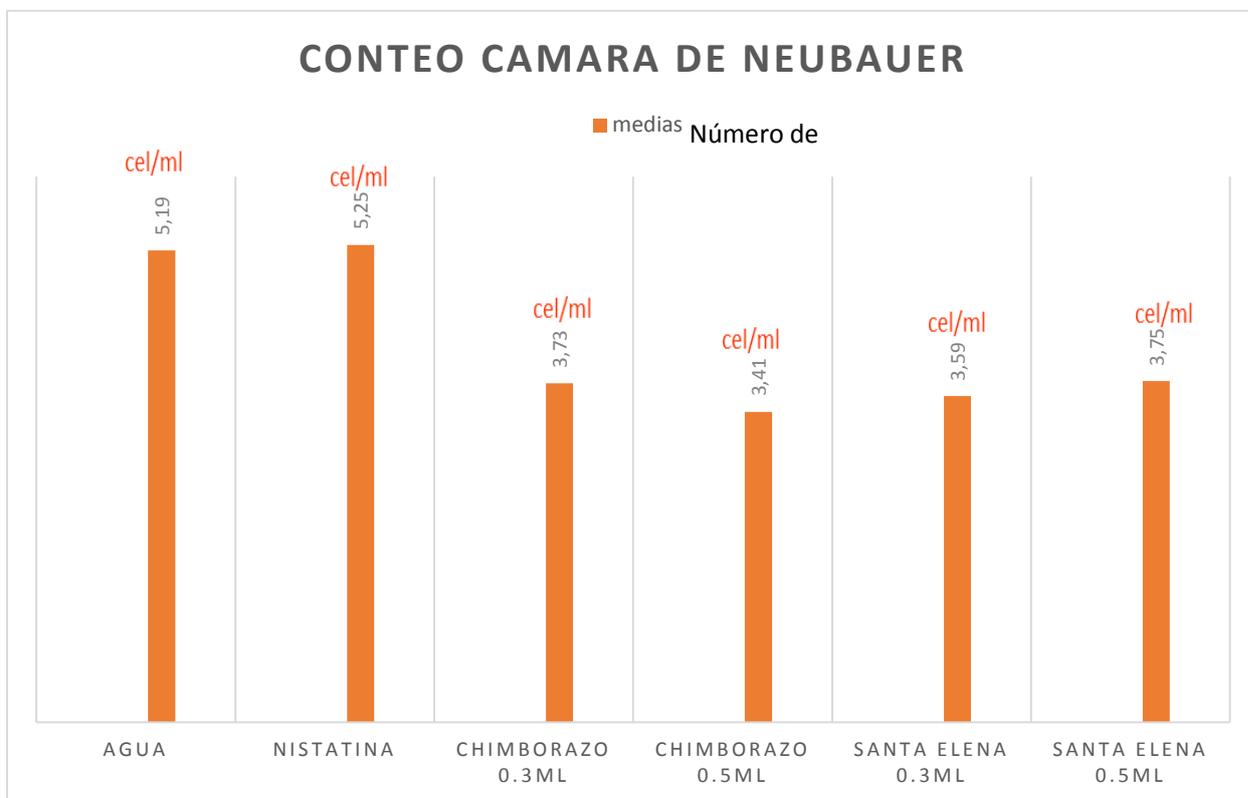
Se observa el decrecimiento del conteo de células de *Candida albicans* con la cámara de Neubauer, donde se aprecia que los tratamientos de 0.5 ml de los aceites esenciales de ambas regiones en las 48 horas presentan mayor efecto antimicótico, evidenciando que existe mayor efecto inhibitorio con el aceite proveniente de la provincia de Chimborazo por el notable declinación en cuanto al crecimiento celular.

TABLA 2. Conteo en cámara de Neubauer – Comparación entre resultados de controles y aceites

CONCENTRACIONES	AGUA	NISTATINA	Aceite de Chimborazo 0.3ml	Aceite de Chimborazo 0.5ml	Aceite de Santa Elena 0.3ml	Aceite de Santa Elena 0.5ml
MEDIAS	5,19 cel/ml	5,25 cel/ml	3,73 cel/ml	3,41 cel/ml	3,59 cel/ml	3,75 cel/ml

Fuente: Cámara de Neubauer
Realizado por: Autora

GRÁFICO 2. Conteo en cámara de Neubauer – Comparación entre resultados de controles y aceites



Fuente: Cámara de Neubauer
Realizado por: Autora

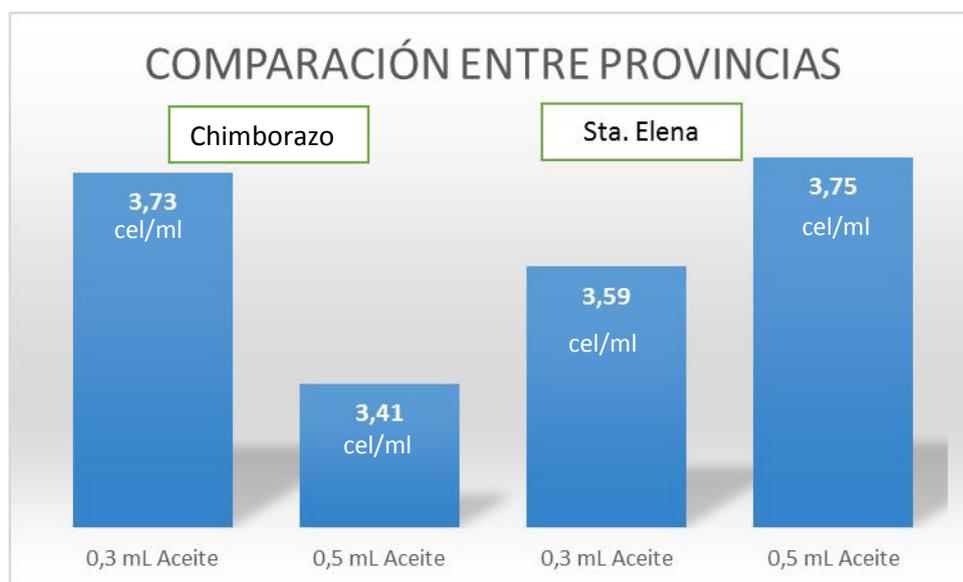
En la presente gráfica se observa el número de células por mililitro que se obtuvo a través de conteo celular en cámara de Neubauer, indicando que al aplicar aceite esencial de orégano de las provincias de Chimborazo y Santa Elena la proliferación de levadura *Candida albicans* se ve reducida en comparación con los controles cero (agua) y positivo (agua + Nistatina); lo que significaría que hay un mejor efecto antimicótico al utilizar aceite de orégano de ambas provincias, incluso superando al antifúngico más empleado en Odontología, como lo es la Nistatina.

TABLA 3. Conteo en cámara de Neubauer – Comparación entre resultados de aceites

CONCENTRACIONES	Aceite de Chimborazo 0.3ml	Aceite de Chimborazo 0.5ml	Aceite de Santa Elena 0.3ml	Aceite de Santa Elena 0.5ml
MEDIAS	3,73 cel/ml	3,41 cel/ml	3,59 cel/ml	3,75 cel/ml

Fuente: Cámara de Neubauer
Realizado por: Autora

GRÁFICO 3. Conteo en cámara de Neubauer – Comparación entre resultados de aceites



Fuente: Cámara de Neubauer
Realizado por: Autora

Si se compara la efectividad antimicótica entre los aceites esenciales de orégano de las provincias de Chimborazo y Santa Elena, al realizar el conteo celular con cámara de Neubauer, se evidencia que la aplicación de 0.5ml de aceite de Chimborazo ofrece mejores resultados contra el crecimiento de la levadura *Candida albicans*, ya que se evidencia un menor número de células por mililitro.

CONTEO DE COLONIAS EN AGAR

TABLA 4. Conteo de colonias en Agar – Comparación entre resultados de controles y aceites.

CONTEO EN AGAR					
CONTROL CERO	CONTROL POSITIVO	ACEITE ESENCIAL DE OREGANO			
		CHIMBORAZO		SANTA ELENA	
ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL
H2O	NISTATINA	0,3 mL Aceite	0,5 mL Aceite	0,3 mL Aceite	0,5 mL Aceite
3,67	2,00	1,17	1,15	1,20	1,03

Fuente: Conteo Agar
Realizado por: Autora

GRÁFICO 4. Conteo de colonias en Agar – Comparación entre resultados de controles y aceites.



Fuente: Conteo Agar
Realizado por: Autora

El promedio de los resultados del conteo de colonias en agar representados en ésta gráfica, indican que, al comparar la efectividad antimicótica de los distintos tratamientos a los que fueron sometidas las láminas de acrílico inoculadas con *Candida albicans*, la proliferación de levaduras se ve reducida al utilizar aceites esenciales de orégano de las provincias de Chimborazo y Santa Elena tanto con 0.3ml que con 0.5ml de los mismos: en comparación con el control positivo (agua + Nistatina) donde el número de unidades

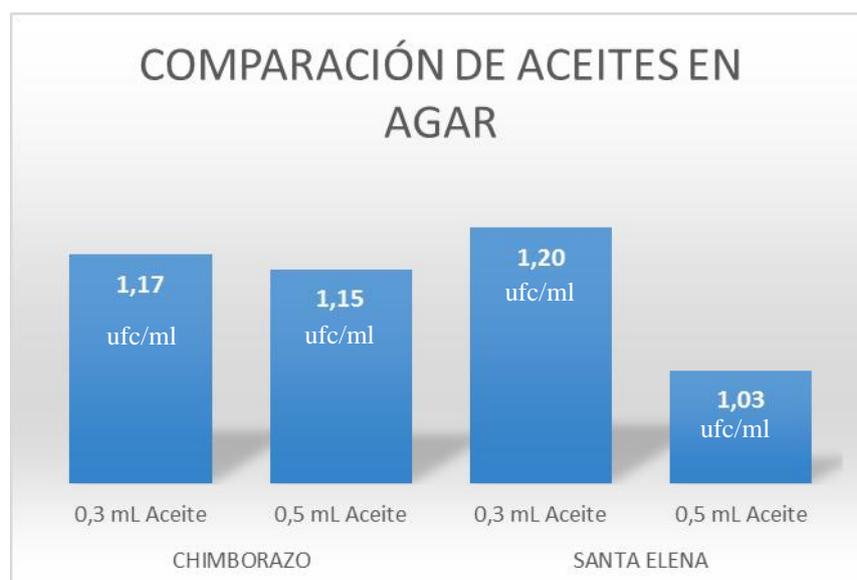
formadoras de colonias es evidentemente mayor; lo que indicaría que los aceites de orégano de las dos provincias, poseen un eficaz efecto antifúngico para eliminar a las levaduras, destacando por encima de la Nistatina.

TABLA 5. Conteo de colonias en Agar – Comparación entre resultados de aceites.

ACEITE ESENCIAL DE OREGANO			
CHIMBORAZO		SANTA ELENA	
ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL
0,3 mL Aceite	0,5 mL Aceite	0,3 mL Aceite	0,5 mL Aceite
1,17	1,15	1,20	1,03

Fuente: Conteo Agar
Realizado por: Autora

GRÁFICO 5. Conteo de colonias en Agar – Comparación entre resultados de aceites.



Fuente: Conteo Agar
Realizado por: Autora

En una comparación sobre la efectividad antimicótica que ofrecen los aceites esenciales de orégano de las provincias de Chimborazo y Santa Elena, aplicando distintos volúmenes de los mismos, se presenta una gráfica señalando que el número de unidades formadoras en colonias que se observaron en agar fue menor cuando se utilizó 0.5ml de aceite de orégano de Santa Elena, siendo el mismo quien ofrece un mejor efecto antifúngico frente a la levadura *Candida albicans*.

4.2. DISCUSIÓN

El interés por incluir a las plantas medicinales como método preventivo y como tratamiento de diversas patologías, apunta a implementar investigaciones acerca de medicamentos a base de extractos naturales, para que estos sean una alternativa a la farmacología tradicional que comúnmente es utilizada.

En el presente estudio se investigó a la planta de orégano y su aceite esencial, ya que sus beneficios no solo se encuentran en el ámbito de la gastronomía, sino también se ha dado a conocer en la industria de la cosmetología, farmacología y, como nos mencionaron Arcila et al ⁽¹⁾, esta planta posee características químicas antimicrobianas, antioxidantes, así como también presenta propiedades antifúngicas. Pahlow (61), mencionó que la planta de orégano ha sido utilizada también para aliviar trastornos gastrointestinales y afecciones de las vías respiratorias.

En la investigación de Ortega et al (20) utilizaron extractos de Tomillo y Romero al ‘10%’ de concentración para comprobar la efectividad de inhibición frente al *Streptococcus mutans*. Para ello se procedió a medir halos de inhibición formados por ambas soluciones acuosas, además de la clorhexidina al ‘2%’ y agua destilada como grupos de control, cultivados en el medio Mueller Hinton. Concluyendo que los extractos de Tomillo y Romero al ‘10%’ de concentración no evidenciaron actividad frente a *S. mutans*, por lo que el autor sugiere que esta concentración no podría ser empleada para prevenir o detener el crecimiento de la bacteria analizada.

Según nos menciona Cueto et al ⁽²⁸⁾, en su estudio acerca del aceite esencial de orégano, determinaron la actividad antifúngica del aceite esencial del orégano mexicano (*Lippia berlandieri*) contra *Fusarium oxysporum* evaluando sus efectos sobre el crecimiento micelial del hongo utilizando como método las fases de contacto y volátil para evaluar la capacidad del aceite esencial para desinfectar semillas de tomate infestadas con *F. oxysporum*. Dieron como resultado que la concentración al ‘0.5 %’ de aceite esencial de orégano inhibió completamente la colonización de las semillas sin afectar su capacidad de germinación.

Huamaní (21) realizó su investigación utilizando extractos de doce plantas oriundas de Perú, *Annona cherimolia* Mill, *Annona muricata* L, *Bidens pilosa* L, *Hypericum laricifolium* L, *Juglans neotropica* Diels, *Piper spp.*, *Plantago major* L, *Psidium guajava* L, *Schinus molle* L. y *Spartium junceum* L. La actividad antifúngica fue evaluada mediante los métodos de difusión en agar y dilución en agar. Los microorganismos a evaluar fueron las levaduras *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida albicans* cepa clínica y *Aspergillus niger* ATCC 16404. Como resultado se obtuvo que los extractos que presentaron actividad antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231, fue a un volumen de '250 µg/mL' para *Hypericum, laricifolium* L., *Juglans neotropica* Diels, *Psidium guajava* L. y *Schinus molle* L. y en volumen de '500µg/mL' para *Piper spp.* Mostrando presentaron actividad antifúngica consistente con un diámetro de halos de inhibición #18mm en Prueba de Difusión en agar frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

Así mismo, Chamba (62) basó su estudio en comparar diferentes concentraciones de aceite esencial de orégano y de hierba luisa a diferentes concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%). La autora obtuvo el aceite esencial, mediante el método de extracción por arrastre de vapor. Para demostrar el efecto antimicótico del aceite esencial de orégano a esas concentraciones, midió halos de inhibición al colocar discos embebidos con las sustancias mencionadas en cajas Petri con el medio de cultivo apto para la cepa que es agar Dextrosa Sabouraud, donde se obtuvo un mayor poder de inhibición cuando se utilizaba el aceite esencial de ambas plantas al 100 % de concentración.

Por lo que en esta investigación se realizó la extracción del aceite esencial de orégano al 100% de concentración de las provincias de Chimborazo y Santa Elena, mediante la misma técnica de extracción por arrastre de vapor, para así poder comparar su efectividad antimicótica contra *Candida albicans*.

Para demostrar el efecto antimicótico de los aceites esenciales de orégano aplicados en la presente investigación, se realizó contaje celular con cámara de Neubauer, procedimiento que permite contar el número de células vivas y muertas a través del lente del microscopio; se compararon los aceites esenciales de las provincias de Chimborazo y Santa Elena, utilizando diferentes volúmenes de los mismos (0.3ml y 0.5ml).

Dentro de los resultados, los aceites esenciales de orégano de Chimborazo y Santa Elena en una concentración al 100% con los volúmenes de 0.5ml y 0.3ml, demostraron mayor efecto antimicótico frente a *Candida albicans*, ya que en el análisis de los promedios, al paso de las horas (0 – 8-12 y 24 horas) proporcionaron los siguientes resultados: aceite esencial de orégano de la provincia de Chimborazo al 100% de concentración en un volumen de 0.3mL obtuvo una media de 3.73cel/mL, la misma sustancia en el volumen de 0.5mL resultó 3.41cel/MI; en tanto que el aceite esencial de orégano de la provincia de Santa Elena al 100% de concentración en un volumen de 0.3mL resultó 3.59cel/mL y el mismo aceite pero en concentración de 0.5% dio como resultado 3.75 cel/MI en cámara de Neubauer.

En comparación con el control positivo (agua + Nistatina) que obtuvo un valor de 5.25cel/mL; el control cero (H₂O) resultó 5.19cel/mL. Concluyendo según estos resultados al comparar la efectividad antimicótica entre los dos aceites y los respectivos controles, cabe resaltar que al aplicar 0.5ml de aceite de orégano de la provincia de Chimborazo, se obtienen mejores resultados; ya que el número de células por mililitro obtenido mediante conteo celular en cámara de Neubauer, es menor.

Dichos resultados se asemejan a los obtenidos en el estudio de Fernández et al (17) donde evaluaron el efecto fungicida frente a cepas de *Cándida albicans* ATCC de los aceites esenciales de eucalipto, orégano, limón y mandarina. La extracción del aceite esencial se hizo mediante destilación por arrastre con vapor de agua a la presión. Se colocaron 20 microlitros del aceite esencial sobre un disco de 6 mm de papel filtro, 20 microlitros de Clorhexidina y 20 microlitros de H₂O como controles. Los diámetros promedio de los halos de inhibición fueron: orégano 4.2 cm, eucalipto 1.3 cm, mandarina 0.9 cm, limón 2 cm, clorhexidina 1.4 cm y agua 0 cm. Ultimando que, el aceite esencial de orégano es el que presentó la mayor actividad antimicótica frente a la cepa *Cándida albicans* ATCC seguido de los aceites de eucalipto, mandarina y limón.

El aceite esencial de orégano demostró a través de un halo de inhibición de '18mm', ser efectivo para inhibir el crecimiento de *Cándida albicans*, dicho efecto antimicótico se le atribuye a la planta ya que dentro de sus componentes químicos se encuentra timol y carvacrol, los cuales según la investigación mencionada, son los responsables de la actividad antifúngica.

De igual manera (19) en su estudio demostró que al adicionar aceite de orégano al acondicionador de tejidos, se redujo la formación de hifas y la adhesión de *Candida albicans* a las prótesis, sin alterar las propiedades químicas del mismo; por lo tanto el aceite esencial de orégano fue considerado como un antimicótico eficaz contra esta levadura.

CAPITULO V

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES:

5.1.1 En el presente estudio se evidenció que los aceites esenciales de orégano tanto de Chimborazo como de Santa Elena ofrecen un efecto antimicótico frente a *Candida albicans* inoculadas en láminas de acrílico de termocurado.

5.1.3 Se identificó la efectividad inhibitoria del aceite esencial de orégano de la provincia de Chimborazo en una concentración al 100% utilizando volúmenes de 0.3 y 0.5ml sobre *Candida albicans* inoculadas en láminas de acrílico y sumergidas en agua, mediante contaje celular a través de la cámara de Neubauer; midiendo en cuatro tiempos diferentes: inicial, a las 12 horas, 24 horas y 48 horas.

5.1.4 Se demostró la efectividad inhibitoria de aceite esencial de orégano de la provincia de Santa Elena en una concentración del 100% utilizando volúmenes de 0.3 y 0.5ml sobre *Candida albicans* inoculadas en láminas de acrílico y sumergidas en agua, mediante contaje celular, a través de la cámara de Neubauer; midiendo en cuatro tiempos diferentes: inicial, a las 12 horas, 24 horas y 48 horas.

5.1.5 Mediante contaje celular a través de la cámara de Neubauer, se comparó la actividad antimicótica entre los dos aceites esenciales de orégano al 100% de concentración procedentes de las provincias de Chimborazo y Santa Elena, con los volúmenes ya mencionados (0.3 y 0.5ml), midiendo el número de células a diferentes tiempos de inmersión del acrílico de termopolimerización inoculado con *Candida albicans*; y se determinó que al utilizar 0.5ml de ambos aceites se obtiene un mejor efecto antimicótico, en relación a cuando se aplica 0.3ml, y a su vez los aceites esenciales de orégano de las dos provincias son más efectivos en comparación al control positivo (Nistatina).

5.1. RECOMENDACIONES:

5.2.1 Se recomienda la continuación de este estudio, ya que es importante la implementación de antimicóticos a base de plantas medicinales para tratar infecciones producidas por la levadura *Candida albicans*; ya que el aceite esencial de orégano podría ser usado como una alternativa al uso de medicamentos de la farmacología tradicional.

5.2.2 Es recomendable realizar comparaciones en cuanto al efecto antimicótico del aceite esencial de orégano frente a aceites esenciales provenientes de otras plantas medicinales.

5.2.3 Se recomienda realizar estudios del efecto antimicótico del aceite esencial de orégano frente a otras levaduras.

5.2.4 Es recomendable realizar estudios de la estructura química de la planta de orégano, para determinar la cantidad de timol existente en ambas especies.

BIBLIOGRAFIA

1. De la Torre L, Navarrete H, Muriel P, Macía M, Balslev H. Enciclopedia de las Plantas útiles del Ecuador. Primera ed. Quito: PUCE, AARTUS; 2008.
2. Chamorro A, Cabrera A, Balseca M. Efecto antibacteriano del extracto etanólico del botoncillo (*ACMELLA REPENS*) sobre. *Odontología*. 2016 Julio; 18(1).
3. OMS. Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. 2002..
4. Calixto M. Plantas Medicinales utilizadas en odontología. *Kirtu*. 2006; 3(2).
5. Acosta M, Gonzalez M, Velazco E, Khouri N, Rojas L, Usubillaga. Composición Química de los Aceites de Ocimum Basilicum L. var basilicum, O. basilicum L. var purpurens, O. gratissimum. y O. tenuiflorum y su efecto antimicrobiano sobre bacterias multirresistentes de origen nosocomial. *Revista de la Facultad de Farmacia*. 2003; 45(1).
6. Maraví G. EFECTO ANTIBACTERIANO Y ANTIFÚNGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE: Menta piperita (MENTA), Origanum vulgare (ORÉGANO) y Cymbopogon citratus (HIERBA LUISA) SOBRE Streptococcus mutans ATCC 25175, Lactobacillus acidophilus ATCC 10746 y Cándida albicans ATCC 90028. 2012.
7. Muñoz F. Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado. Primera ed. Madrid: Mundi- Prensa; 1987.
8. Acevedo Diofanor NMML. Composición Química del Aceite esencial de Hojas de Orégano (Origanum vulgare). *Scielo*. 2013 Marzo; 24(4).
9. Arcila C, Loarca G, Lecona , Mejía Gd. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus. *ALAN*. 2004; 54(1).
10. Arango O, Villota O, Hurtado A, Toro I. Optimización del rendimiento y contenido de timol de aceite esencial de orégano silvestre obtenido por arrastre con vapor. *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial*. 2012 Diciembre; 10(2).
11. Alvaro Plaus E, Saez G, Gabriel A. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del Origanum vulgare (orégano). *Medica Hered*. 2001; 12(1).
12. Ucar , Adriana , Me Rd. ACCIÓN DE AGENTES QUÍMICOS EN LA ELIMINACIÓN DE CÁNDIDA ALBICANS SOBRE. *Acta Odontológica Venezolana*. 2007; 45(2).

13. Sapp P, Eversole , Wysocki. Patología Oral y Mxilofacial contemporánea. Segunda ed. Madrid: Elsevier; 2005.
14. Otero R, Peñamaría M, Rodriguez , Martín , Blanco. Candidiasis oral en el paciente mayor. Avances en Odontoestomatología. 2015; 31(3).
15. Carranza F, Takei H, Newman M. Carranza Periodontología Clínica. Novena ed. Madrid: Mc Graw Hill; 2002.
16. Aguirre J. Candidiasis orales. Iberoamericana de Micología. 2002; 19.
17. Fernandes M, Nieto A. Plantas Medicinales. Segunda ed. Pamplona: EUNSA; 1982.
18. Jackson S, Coulthwaite L, Loewy Z, Scallan , Verran. Biofilm development by blastospores and. The Journal of Prosthetic Dentistry. 2014 Octubre.
19. Srivatstava A, Kishore G, Upadhya , Bhat , Ballal. Evaluation of the properties of a tissue conditioner containing origanum oil as. The jurnal of Prosthetic Dentistry. 2013; 110(4).
20. ORTEGA NRA. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO (*Lippia palmeri* S. WATS). Fitotee. 2011 Noviembre; 34(11).
21. Huamaní M, Ruiz J. Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus Niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú. Programa Cybert. Perú. 2005.
22. FERNANDEZ G, Mautera D, AGUILAR , Delgado. Evaluación de la actividad antifúngica del Aceite esencial de Eucalipto, Orégano, limón y mandarina frente a *C. albicans*. Estomatológica. 2011; 21(1).
23. ACOSTA M. Vademecum de plantas medicinales del Ecuador. Segunda ed. Quito: Abya Yala; 1992.
24. Cano C, Bonilla P, Roque , Ruiz. Actividad antimicótica in vitro y metabolitos del Aceite esencial de las Hojas de *Minthostachys mollis* (muña). Perú Med. Exp. Salud Pública. 2008; 23(3).
25. Gonzalez E, Quindós An. LA INCORPORACIÓN DE TERAPIAS NATURALES EN LOS SERVICIOS DE SALUD. 2010 Febrero.
26. Lindhe J, Lang N, Karring. Periodontología clínica e Implantología Odontológica. Quinta ed. Buenos Aires: Panamericana; 2009.

27. Ansaloni , Wilches , León , Orellana , Peñaherrera , Tobar , et al. Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay, Cañar y Loja, para Afecciones del Aparato Gastrointestinal. Tecnológica ESPO-RTE. 2010 Diciembre; 23(1).
28. Ardila M, Vargas A, Pérez J, Mejía L. ENSAYO PRELIMINAR DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE EXTRACTOS DE *Allium sativum*, *Coriandrum sativum*, *Eugenia Caryophyllata*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus Caryophyllata*, *Origanum Vulgare*, *Rosmarinus officinalis* y *Thymus vulgaris* Frente. Biosalud. 2009 Enero; 8.
29. Jiménez J. Medicina Naturista Fitoterapia. Biodrago. 2007 Julio.
30. Castro , Torres , Nuñez , Gonzalez. Phytochemicals: new weapons against new enemies. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. 2013.
31. Cañigueral S, Dellacassa E. Plantas Medicinales y Fitoterapia Indicadores de dependencia o Factores de Desarrollo? Acta Farm. Bonaerense. 2003 Marzo; 22(3).
32. CERON C. Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. Botánica Económica de los Andes Centrales. 2006; 4(2).
33. CASTILLO. Perspectivas sobre el uso de la biodiversidad de las plantas medicinales de la sierra ecuatoriana. INIAP. 1997; 9.
34. Mazón N. Las plantas medicinales de la Sierra Ecuatoriana: Biodiveridad y usos. 1997..
35. LOPEZ M. Tomillo Propiedades farmaologicas e indicaciones terapéuticas. Offarm. 2006 Enero; 25(1).
36. Gimeno JM. Tomillo (*Thymus vulgaris* L.). Medicina Naturista. 2001;(3).
37. Lizcano M. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de Tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. 2007..
38. Martinez J GC. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutricion hospitalaria. 2002 agosto; 17(6).

39. Chiriboga , Sánchez , Vargas , Hurtaso , Quvedo.. Uso de Infusión de oreganón *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng y del vinagre en la crianza de pollos “Acriollados” (*Gallus gallus domesticus*) mejorados. *Acta Agron.* 2016; 65(3).
40. Araujo G de Oliveira IdSWv. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil. *Revista Brasileira de Farmacognosia.* 2007 Abril; 17(2).
41. Avila J, Jiménez G, Gonzalez B, Morón F. Reacciones adversas a medicamentos herbarios y otras formas de medicina natural y tradicional de Cuba durante 2001-2004. Scielo. 2007 Agosto.
42. DAVID P. Aromaterapia de la A a la Z. Segunda ed. Madrid: EDAF S.A; 1988.
43. Arias H, Costas F. *Plantas Medicinales* Buenos Aires: CAYMI; 1976.
44. MANJAMALAI ATA. BIOACTIVE EVALUATION OF THE ESSENTIAL OIL OF *PLECTRANTHUS AMBOINICUS* BY GC-MS ANALYSIS AND ITS ROLE AS A DRUG FOR MICROBIAL INFECTIONS AND INFLAMMATION. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* 2012 febrero; 4(3).
45. TANACKOV KRD. Antifungal activity of essential oils in the control of food-borne fungi. *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education.* 2013 Abril.
46. Arcila C, Loarca G, Lecona , Gonzales E. Elorégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *ALAN.* 2004 Marzo; 54(1).
47. García G, Palou G. Mecanismo de acción antimicrobiana de timol y carvacrol sobre microorganismos de interés en alimentos. *Temas selectos de ingeniería de alimentos.* 2008; 41(51).
48. Gaviña M, Torner J. *Contribución al Estudio de los Aceites esenciales Españoles y Aceites esenciales de la provincia de Cuenca.* Tercera ed. Madrid: Ministerio de Agricultura; 1966.
49. Martínez A. *Aceites esenciales.* 2001..
50. Cerpa G. TILACION DE ACEITES ESENCIALES. Scielo. 2007 Abril; 6(2).
51. PAREDO I, E. Palou I. *Aceites esenciales: métodos de extracción. selectos de ingeniería de Alimentos.* 2009; 24(32).
52. Cecotti E, Sforza , Carzoglio , Luberti , Flichman. *El diagnóstico en Clínica Estomatológica.* Segunda ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2007.

53. Shafer W, Hine M, Levy. Tratado de Patología bucal. Segunda ed. México: Interamericana; 1986.
54. Negroni M. Microbiología Estomatológica. Segunda ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009.
55. Liébana J. Microbiología Oral Madrid: McGraw hill Interamericana; 1995.
56. AGUILERA LL. ESTUDIO DE PGA 26, UNA PROTEÍNA IMPLICADA EN LA. 2010..
57. Prieto LM, Días LA, Illnait MT, Perurena MR, Cantelar N, Fernández CM, et al. Susceptibilidad a la nistatina de aislamientos bucales de Candida y su correlación con la respuesta al tratamiento. REVISTA CUBANA DE MEDICINA TROPICAL. 2010 marzo; 62(3).
58. Golan D, Tashjian A, Armstrong E, Armstrong A. Principios de farmacología. Bases Fisiopatológicas del tratamiento farmacológico. Tercera ed. Philadelphia: Wolters Kluwer health; 2012.
59. Slideshare. Camara de Neubauer. 2012..
60. Avila Zea. Química Orgánica, Experimentación enfoque ecológico. 2009..
61. Pahlow M. El Gran libro de las Plantas Medicinales. Séptima ed. España: Everest S.A; 1994.
62. Chamba L. “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. 2015..
63. Mesa A, Montiel J, Matinez , Zapata , Pino , Bueno , et al. ACTIVIDAD IN VITRO ANTI-CANDIDA Y ANTI-ASPERGILLUS DE ACEITES. Scientia et Technica. 2007 Mayo; 33(XIII).
64. Cueto , Rivas , Alanís , Oranday , Amaya , Nuñez , et al. Antifungal properties of essential oil of mexican oregano (Lippia berlandieri). Revista Mexicana de Micología. 2010; 31.
65. Esquivel A, Vargas P. Uso de Aceites esenciales extraídos por medio de fluidos supercríticos para la elaboración de alimentos funcionales. Tecnología en Marcha. 20077 Diciembre; 20(4).

66. Mesa A, Bueno J, Betancourt G. Productos naturales con actividad antimicótica. Revista Española Quimioterapia. 2004 Diciembre; 17(4).
67. Ocampo G, Robles J. Microbiota oral presente en pacientes edéntulos. Odontostomat. 2015; 9(1).
68. Rodriguez J, Miranda J, Morejón H, Santana C. Candidiasis de la mucosa bucal. Revisión bibliográfica. Revista Cubana de Estomatología. 2002 Mayo- agosto; 39(2).
69. INIAP. Las plantas medicinales de la Sierra ecuatoriana: Biodiversidad y Usos. 1997..
70. Servia N, Guillinta G. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO DE ETANOL SCHINUS MOLLE Y EL. ISSN. 2012; 9(1).
71. En defensa de una medicina natural y tradicional avalada por la ciencia. Rojas, Francisco. 2013 Julio; 39(4).
72. Salud OMDl. Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. 2002..
73. Oramas J, Rodriguez I. La información científica y la medicina tradicional y natural. Medicina Alternativa. 2000; 12(1).
74. Chamorro A. EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE BOTONCILLO (*Acmella repens*) EN DIFERENTES CONCENTRACIONES SOBRE LA CEPA DE *Porphyromona gingivalis* ATCC® 33277™. 2016..
75. Alzamora , Morales , Armas , Fernandez. Medicina tradicional de Perú: Actividad antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas aromáticas. Anales de la Facultad de Medicina. 2001; 62(2).
76. mejorados UdIdoPa()Sydvelcdp“(gd. Chiriboga, Carlos;Sánchez; Vargas; Hurtado; Quevedo. Acta Agron. 2016; 65(3).
77. Serrano C. Estudio in vitro de la adherencia de *Cándida Albicans* a las resinas acrílicas. ProQuest. 2016 Mayo.
78. Inlango M. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA IN VITRO DEL EXtracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) en comparación con la Nistatina y el Gluconato de clorhexidina al 0,2 % sobre cepas de *Cándida Álbicans*. 2014..
79. REINOSO R. Síntesis Botánica Ap. del Ecuador Quito; 1995.

ANEXOS

ANEXO 1. INFORME DE IDENTIFICACION BIOLÓGICA



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
Dirección General de Investigación y Posgrado
Centro de Biología

LABORATORIO DE BOTÁNICA

TAXONOMÍA DE MUESTRA VEGETAL

Solicitado por: Patricia Valverde
Dirección: La Tola Teléfono: 0984003368
Fecha de Recepción: 18 de Julio de 2016
Fecha de Entrega: 05 de Agosto de 2016
Muestra: Orégano – Tomillo proveniente de Chimborazo (Riobamba)

Informe de Identificación Biológica

Muestra N°	004-05-018	
Nombre Vulgar	Orégano-Tomillo	
Familia	Lamiaceae	
Nombre Científico	<i>Thymus Vulgaris</i> L.	

Referencias:

Cerón, CE.2003 Manual de Botánica, Sistemática, Etnobotánica y Métodos de Estudio en el Ecuador. Herbario "Alfredo Paredes" QAP, Escuela de Biología de la Universidad Central.

Jørgensen, P.M.G.S. León (Eds.) 1999. Catalogue of the Vascular Plants of Ecuador Missouri Botanical Garden Press St. Louis Missouri. U.S.A.

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 2011. Base de datos en: www.tropicos.org

Richard Cabezas C. Biol.

RESPONSABLE LABORATORIO DE BOTANICA

Amamos la Vida

Ciudadela Universitaria: Leyton y Gatto Sobral S/N 4° Piso Oeste
Facultad Ciencias Agrícolas y Turismo Ecológico
www.uce.edu.ec/web/centro-de-biologia
cub@uce.edu.ec / rcrodriguez@uce.edu.ec Teléfonos: 2521477 / 2904460





UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
Dirección General de Investigación y Posgrado
Centro de Biología

LABORATORIO DE BOTÁNICA

TAXONOMÍA DE MUESTRA VEGETAL

Solicitado por: Patricia Valverde
Dirección: La Tola Teléfono: 0984003368
Fecha de Recepción: 18 de Julio de 2016
Fecha de Entrega: 05 de Agosto de 2016
Muestra: Orégano proveniente de Santa Elena (Santa Elena)

Informe de Identificación Biológica

Muestra N°	004-05-020	
Nombre Vulgar	Orégano	
Familia	Lamiaceae	
Nombre Científico	<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng	

Referencias:

Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 2011. Base de datos en: www.tropicos.org


Richard Cabezas C. Biol.

RESPONSABLE LABORATORIO DE BOTANICA

Amamos la Vida

Ciudadela Universitaria: Leyton y Gatto Sobral S/N 4° Piso Oeste
Facultad Ciencias Agrícolas y Turismo Ecológico
www.uce.edu.ec/web/centro-de-biologia
cub@uce.edu.ec / rcrodriguez@uce.edu.ec Teléfonos: 2521477 / 2904460



ANEXO 2. CONSEJO DE BIOETICA

Quito, 23 de agosto del 2016

CONSEJO DE BIOÉTICA.

De mis consideraciones:

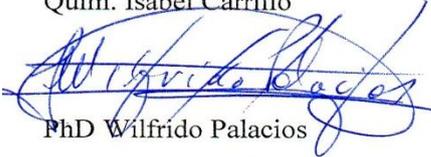
Yo, Patricia Yaquelin Valverde Quinaluisa, con cédula de identidad 1720540192, egresada de la Facultad de Odontología, conjunto con las siguientes autoridades: PhD. Wilfrido Palacios, docente titulado de la Universidad Central del Ecuador, tutor designado de mi proyecto de tesis; PhD. Franklin Gavilánez, Director del Centro de Biología; Químicos Andrés Granda e Isabel Carrillo; Botánico Richard Cabezas, responsables del Centro de Biología y el Químico Max Bonilla, catedrático del área de La Unidad de Química de la Universidad Central del Ecuador, nos comprometemos en todo el proceso de la ejecución del proyecto **"EFECTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO DE LAS PROVINCIAS DE CHIMBORAZO Y SANTA ELENA AL 100% DE CONCENTRACIÓN SOBRE CÁNDIDA ALBICANS."** a actuar bajo los más estrictos principios de ética profesional, para lo cual nos apegamos a las normas detalladas a continuación, resaltando que no existe ninguna situación de interés real, potencial o evidente, incluyendo interés financiero o de otro tipo, así como de:

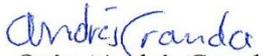
- Presentar interés comercial, atribuido al acceso a cualquier información de la investigación.
- Presentar interés personal con respecto a los resultados que se deriven de la investigación.
- No se aceptará agradecimientos, comisiones o consideraciones especiales por parte de clientes, organizaciones así como de entidades interesadas en información de la investigación que es de carácter confidencial.

Nos comprometemos a actuar en todo momento con total imparcialidad y objetividad en la emisión de juicios sobre los resultados obtenidos en la ejecución del trabajo de investigación.

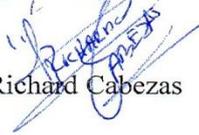

PhD. Franklin Gavilánez


Quím. Isabel Carrillo


PhD Wilfrido Palacios


Quím. Andrés Granda


Quím. Max Bonilla


Blgo. Richard Cabezas

Patricia Valverde Quinaluisa, Odont. ©

ANEXO3. CERTIFICADO DE REALIZACION DE LA FASE EXPERIMENTAL EN EL CENTRO DE BIOLOGIA. UCE. Y DE RESULTADOS.



UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
Dirección General de Investigación y Posgrado
Centro de Biología

CERTIFICADO

El Centro de Biología de la Universidad Central del Ecuador, certifica que la señorita **PATRICIA YAQUELIN VALVERDE QUINALUISA**, egresada de la Facultad de Odontología, con cédula de ciudadanía 1720540192, realizó la fase experimental del proyecto de Tesis "EFECTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO DE LAS PROVINCIAS DE CHIMBORAZO Y SANTA ELENA AL 100% DE CONCENTRACIÓN SOBRE *CANDIDA ALBICANS*" Efecto invitro, del 03 de enero al 03 de febrero del 2017 conforme la memoria de investigación que reposa en nuestros archivos. El proceso fue dirigido por el profesional Andrés Granda Imbago, Químico, obteniéndose los siguientes resultados:

CONTAJE CELULAR EN CÁMARA DE NEUBAUER						
Contaje celular	Control cero	Control positivo	Aceite esencial de orégano			
	Log ₁₀ cél/mL	Log ₁₀ cél/mL	Chimborazo		Santa Elena	
			Log ₁₀ cél/mL	Log ₁₀ cél/mL	Log ₁₀ cél/mL	Log ₁₀ cél/mL
			H ₂ O	Nistatina	0,3 mL Aceite	0,5 mL Aceite
7 a.m. (día 1)	5,15	5,20	3,97	3,75	3,03	3,97
6 p.m. (día 1)	5,20	5,28	3,82	3,48	3,92	3,88
7 a.m. (día 2)	5,23	5,28	3,75	3,30	3,80	3,73
7 a.m. (día 3)	5,18	5,23	3,37	3,12	3,60	3,43

CONTAJE CELULAR POR VERTIDO EN PLACA						
Contaje celular	Control cero	Control positivo	Aceite esencial de orégano			
	ufc/mL	ufc/mL	Chimborazo		Santa Elena	
			ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL	ufc/mL
			H ₂ O	Nistatina	0,3 mL Aceite	0,5 mL Aceite
7 a.m. (día 2)	3,81E+00	4,00E+00	2,33E+00	2,30E+00	2,40E+00	2,06E+00
7 a.m. (día 4)	3,53E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00

Es todo lo que podemos decir en honor a la verdad y para fines que convenga a la interesada.

Quito, 14 de marzo de 2017

Aida Álvarez, Ph.D.

DIRECTORA CENTRO DE BIOLOGÍA

Quim. Andrés Granda Imbago

INSTRUCTOR LABORATORIO DE ENSEÑANZA

Amamos la Vida

Ciudadela Universitaria: Leyton y Gatto Sobral S/N 4º Piso Oeste
Facultad Ciencias Agrícolas y Turismo Ecológico
www.uce.edu.ec/web/centro-de-biologia
jb@uce.edu.ec / rrodriguez@uce.edu.ec Teléfonos: 2521477 / 2904460



ANEXO 4. CERTIFICADO DE LA REALIZACION DE LA EXTRACCION DE ACEITES ESENCIALES DE ORÉGANO EN EL CENTRO DE QUIMICA DE LA UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR



**UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR
UNIDAD ACADÉMICA DE QUÍMICA
LABORATORIOS**

Quito, 2 de diciembre de 2016

Señor Doctor
Fernando A. Novillo Logroño MSc
**COORDINADOR DE LA UNIDAD ACADEMICA DE QUIMICA
UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR**
Presente

De mi consideración:

Dando cumplimiento a la disposición de 30 de Mayo de 2016 sumillada por la Coordinadora Química Verónica Taco, donde se autoriza la extracción de aceite esencial de orégano en las instalaciones de la Unidad, utilizando el Equipo de destilación, proceso para la realización de la tesis de la señorita **PATRICIA YAQUELIN VALVERDE QUINALUISA**, cuyo tema es "EFECTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DEL ORÉGANO DE LA SIERRA Y COSTA ECUATORIANA EN DIFERENTES CONCENTRACIONES COMBINADO CON AGUA NATURAL Y MINERAL SOBRE CANDIDA ALBICANS", debo informar a usted lo siguiente:

La señorita, **PATRICIA YAQUELIN VALVERDE QUINALUISA**, portadora de la cédula de ciudadanía N°1720540192, egresada de la Facultad de Odontología de la Universidad Central del Ecuador, ha venido elaborando a partir del 20 de octubre al 7 de noviembre del 2016, en nuestros laboratorios los extractos de aceite esencial de orégano de las provincias de Chimborazo y Santa Elena, mediante arrastre de vapor, bajo mi responsabilidad y asesoramiento técnico, de acuerdo al cronograma de trabajo que anexo, estos extractos serán utilizados en el proyecto de investigación.

Particular que comunico a usted, para los fines consiguientes.

Atentamente,

Quim. Max Bonilla Rea MSc.
INSTRUCTOR DE ENSEÑANZA II
Telf. 0996879643
EMAIL mabonilla@uce.edu.ec

INSTRUCTIONS FOR USE



- LYFO DISK™**
- KWIK-STIK™**
- KWIK-STIK™ Plus**

INTENDED USE _____

LYFO DISK™, KWIK-STIK™ and KWIK-STIK™ Plus microorganisms are intended to be used as controls to verify the performance of assays, reagents or media that are intended to be used in microbial testing for the detection and identification of a cultured microorganism isolate.

SUMMARY AND EXPLANATION _____

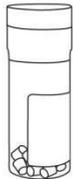
Microorganisms with known and predictable characteristics are used in quality control, education and proficiency programs.

PRINCIPLE _____

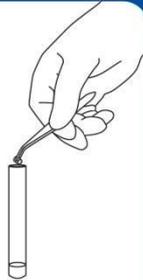
LYFO DISK™, KWIK-STIK™ and KWIK-STIK™ Plus microorganismos provide equivalent results to traditional methods used in preparing, storing and maintaining reference stock culture collections. The microorganism preparations are traceable to the American Type Culture Collection (ATCC®) or other authentic reference culture collections.

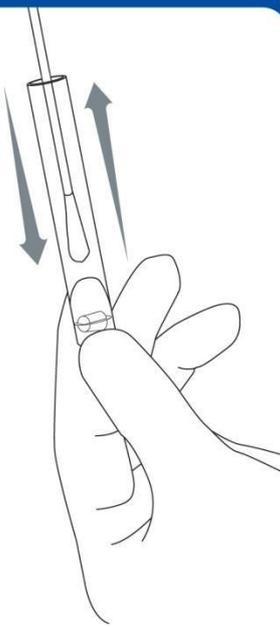
LYFO·DISK™

ILLUSTRATED INSTRUCTIONS

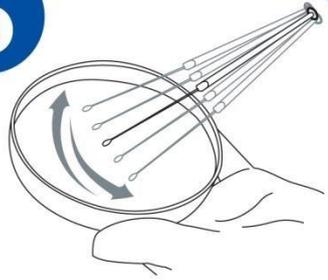
- 

Remove the unopened LYFO DISK™ vial from 2°C to 8°C storage and allow the unopened vial to equilibrate to room temperature.
- 

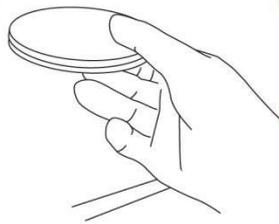
Aseptically remove 1 pellet with sterile forceps from the vial. Do not remove desiccant.
- 

Place the pellet in 0.5 mL of sterile fluid (water, saline, TSB, or BHIB).
Immediately stopper and recap vial and return the resealed vial to 2°C to 8°C storage.
- 

Crush the pellet with a sterile swab until the suspension is homogenous.
Immediately heavily saturate the same swab with the hydrated material and transfer to agar medium.
- 

Inoculate the primary culture plates(s) by gently rolling the swab over one -third of the plate.
- 

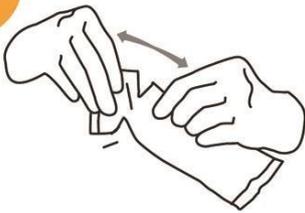
Using a sterile loop, streak to facilitate colony isolation.
- 

Using proper biohazard disposal discard the remaining hydrated material.
- 

Immediately incubate the inoculated media at temperature and conditions appropriate to the microorganism.

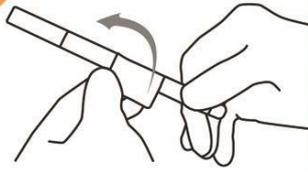
ILLUSTRATED INSTRUCTIONS

1



Allow the unopened KWIKSTIK™ pouch to equilibrate to room temperature. Tear open pouch at notch and remove the KWIKSTIK™ unit.

2



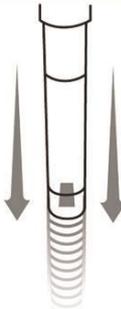
Tear off Pull-Tab portion on the label and attach it to the primary culture plate or QC record. Do not disassemble the device during hydration.

3



Pinch (once only) the ampoule at the top of the KWIKSTIK™ (just below the fluid meniscus of the ampoule) found in the cap to release the hydrating fluid.

4



Hold vertically and tap on a hard surface to facilitate flow of fluid through shaft into bottom of unit containing pellet. Allow the hydrating fluid to flow through the swab shaft and into the bottom portion of the unit containing the pellet.

5



Using a pinching action on the bottom portion of the unit, crush the pellet in the fluid until the pellet suspension is homogenous.

6



Immediately heavily saturate the swab with the hydrated material and transfer to agar medium, or use according to the laboratory's SOP.

7



Inoculate the primary culture plate(s) by gently rolling the swab over one -third of the plate.

8



Using a sterile loop, streak to facilitate colony isolation.

9

Using proper biohazard disposal, discard the KWIK-STIK™



10

Immediately incubate the inoculated primary culture plate(s) at temperature and conditions appropriate to the microorganism.

ANEXO 6. FACTURA DE COMPRA DE CEPA DE CANDIDA ALBICANS ATCC 10231



IMPORTADOR - DISTRIBUIDOR
Proveedor Integral para Laboratorio
 www.medibac.com medibac@medibac.com
ESTABLECIDOS EN 1991



MATRIZ
 Guayaquil : Enrique Ortega Moreira (Av. Las Aguas) 1111 y Laureles (Urdesa Central)
 Teléfonos: (04) 288 1414 - 238 8597 - 288 1887
 Celular: (09) 98574 829

SUCURSAL MULTIPLE GUAYAQUIL
 Victor Emilio Estrada # 916 e Ilares (Urdesa Central)
 Telfs: (04) 602 999 - 238 7418 - 288 3948 - 812 069 - 548 929 - 549 210

SUCURSAL QUITO
 Av. República de El Salvador N34-399 e Irlanda. (La Carolina)
 Edificio Rosania, Planta Baja, Oficinas 4 y B
 Teléfonos: (02) 226 1478 - 246 6318

SUCURSAL PORTOVIJEJO
 Cda. Los Mangos calle Elias Cedeño E/ Bolívar Avila y Manuel Andrade Piso 1.
 Telf.: (05) 256 5182 Celular: 0958935253

R.U.C. 0992401494001

FACTURA

002-001-000005387

Autorización S.R.I. 1119461840

FECHA DE AUTORIZACIÓN: 15 /Septiembre/2016

Documento Categorizado: NO

Cliente: MARIA EUGENIA PAREDES HERRERA
Dirección: MIRAFLORES
R.U.C. / C.C.: 2100050943
Teléfono: 023216337

Asesor Comercial: CARMITA PAZMIÑO
Fecha de Emisión: 09/12/2016
Fecha de Vencimiento: 09/01/2017
Orden de Pedido:

CANT.	CÓDIGO	MARCA	DESCRIPCIÓN	PRECIO UNITARIO	PRECIO TOTAL
1	DUOPACK		C. ALBICANS, ATCC 10231 (DUOPACK)	\$ 189,73	\$ 189,73
<p>PATRICIA YAQUELIN VALVERDE QUINALUISA MIGUEL ANGEL AGUAYO CAÑIZARES EDDA PRISCILA NAVAS ORTEGA SOFIA JACQUELINE AIZAGA ZURITA</p>  <p style="font-style: italic;">Innovación. Calidad y Servicio</p>					

FORMA DE PAGO

Son: **DOSCIENTOS DIEZ Y SEIS CON 29/100**

OTROS

216,29

SUMAN \$ \$ 189,73

DESCUENTO \$ -

BASE 0 \$ -

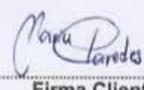
BASE \$ 189,73

I.V.A. 14 % \$ 26,56

TOTAL \$ \$ 216,29



Firma Autorizada



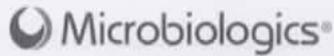
Firma Cliente

FAVOR EMITIR CHEQUE CRUZADO A NOMBRE DE MEDIBAC INC. S.A.
 Declaro recibir la mercadería de esta FACTURA a mi entera conformidad; por lo tanto, DEBO Y PAGARÉ a la orden de MEDIBAC INC S.A. Esta factura de encontrarse vencida, al siguiente día devengará el máximo de INTERES POR MORA autorizado por la LEY, más todos los gastos de cobranzas ocasionados. En caso de juicio me sujetaré a los jueces competentes de la ciudad de Guayaquil y a la acción ejecutiva para lo cual renuncio a fuero y domicilio. **PASADO LOS CINCO DIAS DE SALIDA LA MERCADERIA NO SE ACEPTAN DEVOLUCIONES.**
SOLICITE SU RECIBO DE COBRO AL CANCELAR ESTA FACTURA

ORIGINAL: ADQUIRENTE // COPIA 1: EMISOR COPIA 2: S.R.I.

SALAZAR ZAMORA PAUL SEGUNDO "RUC 0967587288001" "AUT. 13977" "28 B. 50 X 3" "DEL. 0025201 AL 0006200" "FECHA DE CADUCIDAD: 15 /SEPT/18/09/2017"

ANEXO 7. LICENCIA DE CEPA DE CANDIDA ALBICANS ATCC 10231



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

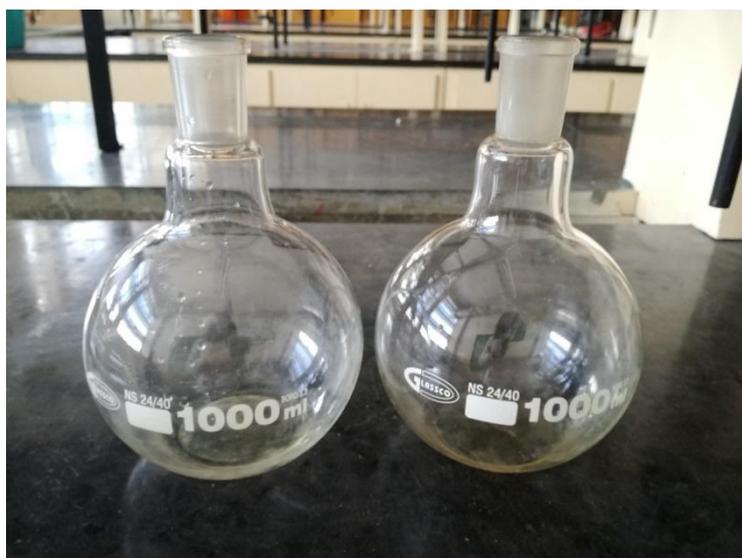
Specifications Microorganism Name: <i>Candida albicans</i> Catalog Number: 0443 Lot Number: 443-587 Reference Number: ATCC® 10231™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4	Expiration Date: 2018/2/28 Release Information: Quality Control Technologist: Marie M Howe Release Date: 2016/3/14
Performance	
Macroscopic Features: Small to medium, white, circular, convex, dull colonies. Microscopic Features: Gram positive, ovoidal, budding yeast cells.	Medium: Nutrient Method: Gram Stain (1)
ID System: Vitek YST (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Germ Tube Test: positive (1) Chlamyospore production: positive  Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE
<p><small>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="311 1220 438 1265"> </div> <div data-bbox="518 1209 1236 1243"> <small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div data-bbox="327 1288 470 1400"> TESTING CERT #2655.01 </div> <div data-bbox="518 1276 790 1299"> <small>(1) These tests are accredited to ISO16C 17025:2005.</small> </div> </div>	

ANEXO 8. FOTOGRAFIAS ANEXO

RECOLECCION DE LAS PLANTAS DE OREGANO



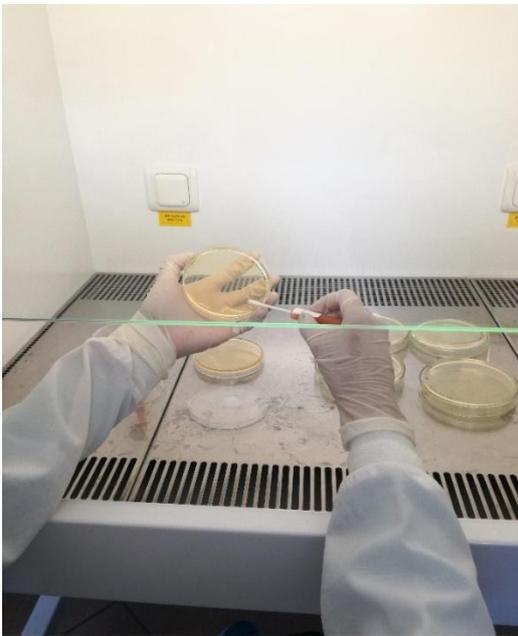
**EQUIPO PARA EXTRACCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO.
METODO POR ARRASTRE DE VAPOR.**



ACEITE ESENCIAL DE OREGANO



ACTIVACIÓN DE LA CEPA

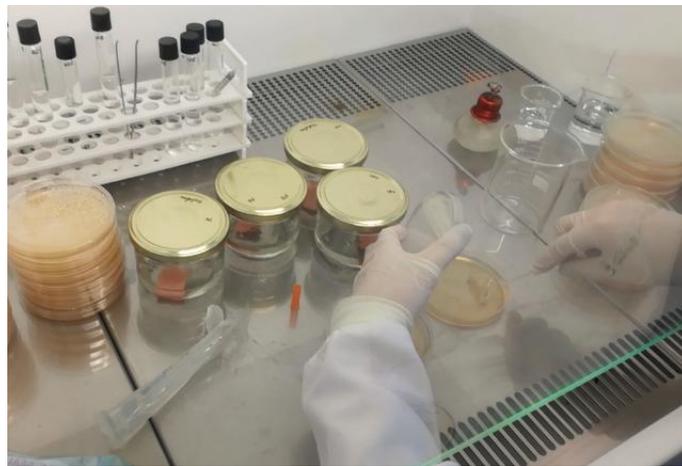




INOCULACIÓN DE LA CEPA

INOCULACION DE LAMINAS DE ACRILICO CON LAMINAS DE ACRILICO.
COLOCACIÓN DE 0.3 Y 0.5 ML DE ACEITE ESENCIAL DE OREGANO EN 50ML
DE AGUA.





CONTEO CAMARA DE NEUBAUER Y COLONIAS EN AGAR

