

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de:

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

EVALUACIÓN ANTIMICÓTICA DE EXTRACTO Y ACEITE ESENCIAL DE PUMAMAQUI (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) FRENTE A: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299, *Candida albicans* ATCC 10231, PATÓGENOS DE DERMATOMICOSIS.

AUTOR:

CARLOS ALBERTO CARRILLO MURILLO

DOCENTE TUTOR:

TATIANA DE LOS ÁNGELES MOSQUERA TAYUPANTA

Quito, Diciembre del 2016

CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR

Yo Carlos Alberto Carrillo Murillo, con documento de identificación N° 1723122824, manifiesto mi voluntad y cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy el autor del trabajo de grado “EVALUACIÓN ANTIMICÓTICA DE EXTRACTO Y ACEITE ESENCIAL DE PUMAMAQUI (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) FRENTE A: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299, *Candida albicans* ATCC 10231, PATÓGENOS DE DERMATOMICOSIS”, mismo que ha sido desarrollado para optar por el título de: INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En aplicación a lo determinado en la Ley de Propiedad Intelectual, en mi condición de autor me reservo los derechos morales de la obra antes citada. En concordancia, suscribo este documento en el momento que hago entrega del trabajo final en formato impreso y digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.



Carlos Alberto Carrillo Murillo

Cédula: 1723122824

Fecha: Diciembre 1 del 2016

DECLARATORIA DE COAUTORÍA TUTOR

Yo, declaro que bajo mi dirección y asesoría fue desarrollado el trabajo de investigación “EVALUACIÓN ANTIMICÓTICA DE EXTRACTO Y ACEITE ESENCIAL DE PUMAMAQUI (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) FRENTE A: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299, *Candida albicans* ATCC 10231, PATÓGENOS DE DERMATOMICOSIS” realizado por Carlos Alberto Carrillo Murillo, obteniendo un producto que cumple con todos los requisitos estipulados por la Universidad Politécnica Salesiana para ser considerados como trabajo final de titulación.

Quito, Diciembre del 2016



Ing. Tatiana De Los Ángeles Mosquera Tayupanta

C.I: 1711668010

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	MARCO TEÓRICO	4
2.1.	Plantas en el Ecuador	4
2.2.	Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.)	4
2.2.1.	Descripción botánica.....	5
2.2.2.	Taxonomía	5
2.2.3.	Usos de la planta	6
2.3.	Obtención de extractos vegetales.....	6
2.4.	Extractos vegetales	6
2.4.1.	Tipos de extractos	7
2.4.1.1.	Extractos blandos.....	7
2.4.1.2.	Extractos fluidos	7
2.4.1.3.	Aceite esencial	7
2.5.	Análisis cualitativo de extractos vegetales	8
2.6.	Análisis cuantitativos de extractos vegetales.....	10
2.7.	Dermatomicosis	10
2.7.1.	Hongos patógenos dermatofitos.....	11
2.7.1.1.	<i>Candida albicans</i>	12
2.7.1.2.	<i>Microsporum canis</i>	12
2.7.1.3.	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	13
2.7.1.4.	<i>Trichophyton rubrum</i>	13
2.8.	Métodos de sensibilidad.....	13
2.8.1.	Método de Kirby-Bauer	14
2.8.2.	Método de Barry	15
2.8.3.	Método modificado de Kirby-Bauer	15
3.	MARCO METODOLÓGICO.....	16
3.1.	Protocolo de limpieza y secado del material vegetal.....	16
3.2.	Molienda del material vegetal.....	16
3.3.	Humectación del material vegetal.....	17
3.4.	Percolación y filtrado del material vegetal	17
3.5.	Obtención de los extractos vegetales	18
3.5.1.	Obtención del extracto blando de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.)	18

3.5.1.1.	Diluciones del extracto blando	18
3.5.2.	Obtención del extracto fluido de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.)	19
3.5.2.1.	Control de calidad del extracto fluido.....	20
3.6.	Análisis cualitativo de los extractos vegetales.....	20
3.6.1.	Ensayo para Catequinas	20
3.6.2.	Ensayo para Resinas	21
3.6.3.	Ensayo de azúcares reductores	21
3.6.4.	Ensayo para saponinas	22
3.6.5.	Ensayo para fenoles	22
3.6.6.	Ensayo para quinonas	22
3.6.7.	Ensayo para flavonoides	23
3.6.8.	Ensayo para lactonas.....	24
3.6.9.	Ensayo para aminoácidos.....	24
3.6.10.	Ensayo para cardenólidos	25
3.6.11.	Ensayo para Antocianidinas.....	25
3.6.12.	Ensayos para alcaloides	26
3.6.13.	Ensayo para triterpenos.....	27
3.7.	Análisis cuantitativos de los extractos vegetales	28
3.7.1.	Determinación del índice de refracción y concentración de azúcar	28
3.7.2.	Determinación de la densidad relativa.....	28
3.7.3.	Determinación del pH.....	29
3.7.4.	Determinación de los sólidos totales	29
3.8.	Obtención del aceite esencial de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.)	30
3.8.1.	Destilación por arrastre de vapor de agua.....	30
3.8.2.	Rendimiento del aceite esencial.....	31
3.8.3.	Diluciones del aceite esencial	31
3.9.	Determinación de la actividad antifúngica	32
3.9.1.	Activación de las cepas ATCC	32
3.10.	Elaboración del inóculo	33
3.10.1.	Preparación del inóculo de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	33
3.10.1.1.	“Overnight”	34
3.10.1.2.	Conteo de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 por espectrofotómetro.....	34

3.10.2.	Preparación del inóculo de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533, <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188 y <i>Microsporum canis</i> ATCC 36299 .	34
3.10.2.1.	Conteo con cámara de Neubauer	35
3.11.	Técnicas de siembra.....	35
3.11.1.	Método de Kirby-Bauer	35
3.11.2.	Método de Barry o de inundación.....	36
3.11.3.	Método de Kirby-Bauer modificado o por pocillos.....	36
3.12.	Análisis estadístico	37
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
4.1.	Lugar de investigación.....	38
4.2.	Recolección del material vegetal	38
4.3.	Control de calidad del extracto blando, extracto fluido y aceite esencial de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.).....	39
4.3.1.	Análisis organoléptico del extracto blando de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.)	39
4.3.2.	Análisis organoléptico del extracto fluido de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.)	39
4.3.3.	Análisis organoléptico del aceite esencial de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.)	40
4.4.	Rendimiento del extracto blando y aceite esencial.....	40
4.5.	Análisis cualitativo de extractos vegetales	41
4.6.	Análisis cuantitativos para extractos vegetales.....	43
4.6.1.	Análisis cuantitativos para extracto fluido de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.)	43
4.6.1.1.	Sólidos totales	43
4.6.1.2.	Densidad relativa	44
4.6.1.3.	Índice de refracción y concentración de azúcar.....	45
4.6.1.4.	Determinación del pH.....	45
4.6.2.	Análisis cuantitativos para aceite esencial de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.)	46
4.6.2.1.	Densidad relativa	46
4.6.2.2.	Índice de refracción y concentración de azúcares	47
4.6.2.3.	Determinación de pH.....	47
4.7.	Evaluación de la actividad antifúngica	48
4.8.	Análisis de varianza de una vía.....	52

4.8.1.	Aceite esencial de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.) frente hongos dermatofitos.....	52
4.8.2.	Extracto fluido de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.) frente hongos dermatofitos.....	55
4.8.3.	Extracto blando de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.) frente hongos dermatofitos.....	58
4.8.4.	Comparación de los extractos vegetales	61
5.	CONCLUSIONES	63
6.	REFERENCIAS.....	65
7.	ANEXOS	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de la planta Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.)	5
Tabla 2. Ensayos del tamizaje fitoquímicos y sus metabolitos secundarios para el extracto fluido	9
Tabla 3. Clasificación de los hongos dermatofitos causantes de la dermatomicosis	11
Tabla 4. Parámetros para de control de calidad del extracto blando de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.)	39
Tabla 5. Parámetros para de control de calidad del extracto fluido de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.)	39
Tabla 6. Parámetros para de control de calidad del aceite esencial de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.)	40
Tabla 7. Rendimiento de Extracto blando y Aceite esencial	40
Tabla 8. Ensayos realizados en Tamizaje Fitoquímico del extracto blando de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.)	41
Tabla 9. Sólidos totales del extracto fluido en concentraciones de 25% y 50%	43
Tabla 10. Densidad relativa del extracto fluido con la concentración 25%	44
Tabla 11. Densidad relativa del extracto fluido con la concentración 50%	44
Tabla 12. Índice de refracción y concentración de azúcar del extracto fluido en concentración de 25 y 50%	45
Tabla 13. Determinación de pH del extracto fluido en concentraciones de 25 y 50%	45
Tabla 14. Densidad relativa del aceite esencial	46
Tabla 15. Índice de refracción y concentración de azúcar del aceite esencial	47
Tabla 16. Determinación de pH del aceite esencial	47
Tabla 17. Medición de los halos inhibición frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 ...	48

Tabla 18. Medición de los halos inhibición frente a <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533	49
Tabla 19. Medición de los halos inhibición frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188	50
Tabla 20. Medición de los halos inhibición frente a <i>Microsporum canis</i> ATCC 36299	51
Tabla 21. Medición de los halos inhibición aceite esencial de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.) frente a hongos dermatofitos.....	52
Tabla 22. Análisis de varianza del aceite esencial al 5%, 2.5% y 1.25% de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.) frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	53
Tabla 23. Análisis de varianza del aceite esencial al 5%, 2.5% y 1.25% de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.) frente a <i>Microsporum canis</i> ATCC 36299	53
Tabla 24. Análisis de varianza del aceite esencial al 5%, 2.5% y 1.25% de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.) frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188	54
Tabla 25. Análisis de varianza del aceite esencial al 5%, 2.5% y 1.25% de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.) frente a <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533	54
Tabla 26. Medición de los halos inhibición extracto fluido de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.) frente a hongos dermatofitos.....	55
Tabla 27. Análisis de varianza del extracto fluido al 25% y 50% de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.) frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	56
Tabla 28. Análisis de varianza del extracto fluido al 25% y 50% de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.) frente a <i>Microsporum canis</i> ATCC 36299	56
Tabla 29. Análisis de varianza del extracto fluido al 25% y 50% de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.) frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188	57

Tabla 30. Análisis de varianza del extracto fluido al 25% y 50% de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.) frente a <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533	57
Tabla 31. Medición de los halos inhibición extracto blando de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.) frente a hongos dermatofitos.....	58
Tabla 32. Análisis de varianza del extracto blando al 15%, 7.5%, 3.75%, 1.87%, 0.93% y 0.46% de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.) frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	59
Tabla 33. Análisis de varianza del extracto blando al 15%, 7.5%, 3.75%, 1.87%, 0.93% y 0.46% de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.) frente a <i>Microsporum canis</i> ATCC 36299	59
Tabla 34. Análisis de varianza del extracto blando al 15%, 7.5%, 3.75%, 1.87%, 0.93% y 0.46% de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.) frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188	60
Tabla 35. Análisis de varianza del extracto blando al 15%, 7.5%, 3.75%, 1.87%, 0.93% y 0.46% de Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.) frente a <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533	60
Tabla 36. Test de comparaciones múltiples con el mejor (Hsu)	62

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Secado del material vegetal.....	72
Anexo 2. Percolación del material vegetal.....	72
Anexo 3. Diluciones del extracto blando.....	73
Anexo 4. Tamizaje fitoquímico.....	73
Anexo 5. Destilación de aceite esencial Pumamqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman).	77
Anexo 6. Recolección del material vegetal.....	79
Anexo 7. Certificado de identificación Pumamaqui (<i>Oreopanax ecuadorensis</i> Seeman.).	80
Anexo 8. Halos de inhibición frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	81
Anexo 9. Halos de inhibición frente a <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533.....	82
Anexo 10. Halos de inhibición frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188	84
Anexo 11. Halos de inhibición frente a <i>Microsporium canis</i> ATCC36299.....	84

RESUMEN

Ecuador está considerado como uno de los países megadiversos a nivel mundial, esta abundancia de riqueza natural, desafortunadamente es poco conocida, inclusive por los mismos ecuatorianos, un gran porcentaje de estas plantas no han sido estudiadas hasta la actualidad, dejando un campo casi intacto para diversas investigaciones. En el presente proyecto se trabajó con la especie Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) endémica de la región andina del Ecuador, conocida por su efecto desinfectante para limpiar heridas en dermatitis. El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antifúngica de la especie Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.), sobre hongos patógenos, responsables de la dermatomicosis. Se trabajó con dos tipos de extractos: fluido y blando, los cuales se obtuvieron a partir de percolación con alcohol al 96% de pureza, así como de aceite esencial extraído mediante la destilación por arrastre de vapor, a diferentes concentraciones. Para la determinación de la actividad antifúngica se empleó los métodos de Kirby-Bauer y el método de Barry. El tratamiento estadístico que se dio a los resultados fue el análisis de varianza de una vía ANOVA, con un nivel de confianza del 95% con el cual se puede concluir que la efectividad tanto del aceite esencial como del extracto blando es el 75% y para el extracto fluido es solamente del 25% frente a los hongos patógenos causantes de la dermatomicosis.

Palabras claves: Patógenos, dermatomicosis, (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.), Kirby-Bauer, megadiverso.

ABSTRACT

Ecuador is considered to be one of the mega diverse countries on a global scale, this plenty of natural wealth, unfortunately it is slightly well-known, inclusive for the same Ecuadorians, a big percentage of these plants has not been studied up to the actuality, leaving an almost intact field for diverse investigations. In this project we worked with the species Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) Endemic to the Andean region of Ecuador and is known for its disinfectant to clean wounds dermatitis. The target of this investigation was to evaluate the antifungal activity of the species Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.), on pathogenic fungi, responsible for the dermatomycosis. One worked with two types of extracts: fluid and soft, which were extracted from the humectation and percolation with alcohol to 96 % of purity, as well as of essential oil extracted by means of the distillation for steam dragging, to different concentrations. For the determination of the antifungal activity there were used the methods of Kirby-Bauer and Barry's method. The statistical treatment given to the results was the analysis of variance ANOVA one-way, with a confidence level of 95% with which it can be concluded that the effectiveness of both the essential oil and the soft extract is 75% and for the fluid extract is only 25% against pathogenic fungi that cause the dermatomycosis.

Keywords: Pathogens, dermatomycosis, (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.), Kirby-Bauer, mega diverse

1. INTRODUCCIÓN

Desde hace mucho tiempo atrás las plantas con actividades curativas fueron el único sustento que se disponía para poder combatir las dolencias. Las plantas medicinales cuentan con cualidades medicinales las cuales pueden ser debido a sustancias intrínsecas del material vegetal que muchas veces no son identificadas como metabolitos. A lo largo de la historia, un sin número de culturas han aplicado técnicas para modificar estos principios activos y hacerlos más efectivos terapéuticamente (López Muñoz & Álamo González, 2006, págs. 577-580). La gran cantidad de plantas medicinales en el Ecuador representan para las comunidades indígenas toda una farmacia que se encuentra al alcance de sus manos. Se presume que dentro de la población ecuatoriana al menos el 80% tiene una relación con la medicina tradicional; y, al hablar de esta dependencia nos referimos a la que existe con las plantas o productos derivados naturales enfocados a la atención de la salud y bienestar de sus consumidores (Ansaloni, Wilches, León, Orellana, & Peñaherrera, 2010, pág. 90). El Ecuador, es un país multicultural y posee una elevada biodiversidad, esto le convierte en un paraíso a los ojos de las empresas farmacéuticas, ya que el conocimiento que se ha almacenado en el saber ancestral sobre el universo de las plantas es inmenso, esta realidad está presente en un país que con un territorio del 0.2% del planeta alberga un 10% de especies vegetales existentes en el mundo (Rios, De La Cruz, & Mora, 2008, pág. 10). Dentro de este gran número de especies con las que cuenta el país se seleccionó para la investigación a la planta Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.), endémica de la serranía ecuatoriana en peligro de desaparecer, la cual se encuentra de forma silvestre y dispersa, se la puede encontrar creciendo a lo largo del callejón interandino, sus hojas tienen propiedades medicinales como: anti- séptico, desinfectante y cicatrizante (Yáñez Gonzales, 2011,

pág. 10). Otro valor aprovechable es su utilización como barreras vivas como un sistema de protección de cuencas hidrográficas; aunque es una planta tan representativa su investigación ha sido muy limitada (Ledesma Guachiza , 2010, págs. 1-3). El objetivo de esta investigación está basada en su uso etnobotánico al evaluar la actividad antifúngica de la especie Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.), sobre hongos patógenos responsables de la dermatomicosis; para esto se realizó la extracción de aceite esencial, extractos fluido y blando del material vegetal de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.), se realizó un screening de los grupos fitoquímicos presentes en la planta un tamizaje fitoquímico y la determinación de la actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) sobre los hongos dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299, *Candida albicans* ATCC 10231, así como comprobar la actividad antifúngica *in vitro* del extracto blando y fluido de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) sobre los hongos dermatofitos *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299, *Candida albicans* ATCC 10231. Se plantea analizar si el extracto blando de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) no presentan actividad antifúngica sobre ninguno de los cuatro hongos patógenos causantes de la dermatomicosis; así como, si el extracto fluido de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) no presentan actividad antifúngica sobre ninguno de los cuatro hongos patógenos causantes de la dermatomicosis y si el aceite esencial de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) no presenta actividad antifúngica sobre ninguno de los cuatro hongos patógenos causantes de la dermatomicosis; así mismo determinar si que el extracto blando de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) presentan actividad

antifúngica sobre al menos uno de los cuatro hongos patógenos causantes de la dermatomicosis; sí el extracto fluido de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) presentan actividad antifúngica sobre al menos uno de los cuatro hongos patógenos causantes de la dermatomicosis y si el aceite esencial de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) presenta actividad antifúngica sobre al menos uno de los cuatro hongos patógenos causantes de la dermatomicosis. El estudio del Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) permitirá corroborar el uso etnobotánico con referencias científicas que delimiten un potencial uso farmacéutico.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Plantas en el Ecuador

Ecuador es un país megadiverso que se encuentra asentado sobre una vasta diversidad ecológica, del total de plantas que se puede encontrar en el mundo que son alrededor de 300.000 especies, de las cuales de un 7% están en el país (Palacios, 2011, pág. 14). Esta abundancia de riqueza natural desgraciadamente es poco conocida por los mismos ecuatorianos, y por ende su valor real es subestimado. Los estudios referentes a las plantas endémicas del país en relación con la velocidad de la deforestación avanzan muy lentamente y se teme que muchas especies se puedan extinguir antes de ser estudiadas y darles un uso apropiado (Cuamacás & Tipaz, 1995, págs. 5-34). Desde 1995 hasta la actualidad se tiene un universo de 432 especies de plantas medicinales en lo que es la zona del callejón interandino ecuatoriano, de estas 273 se las puede encontrar en expendios de hierbas medicinales y 159 aún se las puede hallar en estado silvestre, tanto las plantas que se venden en los mercados como las silvestres alivian alrededor de 151 dolencias del cuerpo como en casos de inflamaciones, para tratar resfriados, dolores estomacales, así como un cicatrizante, etc. (Cerón Martínez , 2006, págs. 285-287).

2.2. Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.)

Es una especie endémica del Ecuador, comúnmente encontrada en los remanentes de vegetación de los Andes, desde los 2000 a 3000 msnm, se la puede visualizar en gran parte de la Sierra, especialmente en la región norte. Esta especie se halla en las siguientes reservas ecológicas: Cayambe-Coca, Cotacachi-Cayapas, El Ángel y zonas próximas al Parque Nacional Sangay (León-Yáñez, Valencia, Pitman, Endara, Ulloa Ulloa, & Navarrete, 2011, pág. 192).

2.2.1. Descripción botánica

Es un árbol mediano de 10 – 15 m de altura, con un diámetro a la altura del pecho (DAP) de entre 25 – 35 cm, su tronco es cilíndrico, de copa amplia e irregular, la corteza externa es levemente agrietada, de color gris verdosa y la corteza interna verde cremosa (Minga Ochoa, 2000, pág. 77).

Tiene hojas simples alternadas de 25 – 35cm, helicoidalmente arregladas, estipuladas; pecíolo de 5 – 18 cm de color pardo grisáceo; láminas generalmente lobadas de 20 – 25 cm x 12 – 19 cm, de consistencia coriácea, con una base redondeada, palmatinervia, tiene un haz glabro y un envés, unas veces glabro, pero otras ocasiones densamente tomentoso; sus flores se encuentran en racimos terminales de 15 – 25 cm; pedúnculo de 1 -2,5 cm (Cuamacás & Tipaz, 1995, págs. 5-34).

2.2.2. Taxonomía

Tabla 1.

Taxonomía de la planta Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.)

Clase	Equisetopsida C. Agardh
Subclase	Magnoliidae Novák ex Takht.
Superorden	Asteranae Takht.
Orden	Apiales Nakai
Familia	Araliaceae Juss.
Género	<i>Oreopanax</i> Decne. & Planch.
Especie	<i>Ecuadorensis</i> Seem.
Nombre común	puma maqui

Nota: Elaborado por (Herbario de la pontificia universidad católica, 2015).

2.2.3. Usos de la planta

A este tipo de árbol se le da los siguientes usos: como combustible (leña), en el área de la construcción, el tallo es utilizado para la fabricación de viviendas, cercas, así como para la elaboración de vigas, duelas y postes de alumbrado; como utensilios de cocina se confeccionan bateas y cucharas, además de monturas de caballo; en la rama de la medicina, las mujeres luego del parto utilizan las hojas para tomar un baño y de esa forma mitigar las dolencias del parto, así también la infusión de las hojas para aliviar cualquier recaída; en la parte ambiental es utilizado como cercas vivas (De la Torre, 2008, pág. 192). Además es utilizada para limpiar heridas producidas por dermatitis, salpullidos, granos y otros, por medio de la decocción de sus hojas en estado maduro y empleándola en la zona afectada como un desinfectante natural (Ojeda Ojeda, 2010, pág. 22).

2.3. Obtención de extractos vegetales

Los procesos que se realizaron a la planta Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) previa a la extracción de los extractos blando, fluido así como del aceite esencial son: molienda, humectación, percolación y destilación por arrastre de vapor.

2.4. Extractos vegetales

Los extractos vegetales son preparaciones concentradas que resultan de la acción disolvente y/o extractiva de un solvente sobre la droga vegetal que permita la liberación de las sustancias químicas responsables de la actividad farmacológica, estos extractos pueden tener varias consistencias, como son: sólida, líquida o intermedia, se obtienen a partir de material vegetal y con la adición de un disolvente (CECMED, 2001, pág. 5).

2.4.1. Tipos de extractos

Se puede clasificar a los diferentes tipos de extractos de acuerdo a la concentración del principio activo en relación a la droga original y de acuerdo a su consistencia, así también como, en la concentración del solvente que se puede encontrar de forma parcial o total (Kuklinski, 2000, pág. 37).

2.4.1.1.Extractos blandos

El extracto blando es una preparación que tiene una consistencia semisólida, es decir, se encuentra entre el extracto fluido y el extracto seco, presenta un restante seco no inferior al 70 % en masa y un 30% del solvente. Para su obtención es necesaria la evaporación parcial del disolvente empelado (CECMED, 2001, pág. 5). Este tipo de extracto es inestable y resulta complicado su manejo debido a su consistencia, por esta razón es poco utilizado (Kuklinski, 2000, pág. 37).

2.4.1.2.Extractos fluidos

El extracto fluido tiene una consistencia líquida y se obtiene por medio de los procesos de la humectación o percolación. Los solventes utilizados suelen ser mezclas hidroalcohólicas (Kuklinski, 2000, pág. 37). Estos tipos de extractos son preparaciones que han sido evaporadas mediante el rotavapor hasta obtener una concentración que sea equivalente a una parte por masa de la droga original desecada. En inmovilidad el extracto puede generar un ligero sedimento en el fondo (CECMED, 2001, pág. 5).

2.4.1.3.Aceite esencial

El aceite esencial es un compuesto volátil obtenido de las plantas aromáticas, el cual generalmente se encuentra en estado líquido y contiene un sin número de moléculas orgánicas y con una apariencia oleosa. Los aceites esenciales se encuentran en las

glándulas o espacios intercelulares de las plantas que, generalmente, se ubican en las hojas, frutos, semillas, o flores; son empleados en diversas actividades, como en la perfumería y han sido valorados desde tiempos inmemoriales por sus olores tan particulares y característicos, en la industria alimenticia como agente saborizantes y en el área de la salud alternativa, son valorados por su actividad antibacterial y antifúngica (Anderson Guarnizo & Martínez Yepez, 2009, pág. 89).

El método más conocido y sencillo para obtener aceite esencial es la extracción por arrastre de vapor de agua, para el cual es muy importante contar con material vegetal se encuentre libre de material extraño Los aceites esenciales son composiciones de sustancias que se encuentran en ciertas plantas y sus principales características son: su intenso aroma además de ser muy volátiles y esto permite que puedan ser conducidas por corrientes generadas por el vapor de agua (Lamarque, Zygadlo, Labuckas, López, Torres, & Maestri, 2008, pág. 50).

2.5. Análisis cualitativo de extractos vegetales

El tamizaje fitoquímico nos permite conocer cualitativamente los principales grupos químicos presentes en el material vegetal, los metabolitos secundarios en nuestra planta de estudio. (Payo, Oquendo, & Oviedo, 1996, pág. 120).

Tabla 2.

Ensayos del tamizaje fitoquímicos y sus metabolitos secundarios para el extracto fluido

Ensayo	Metabolito secundario
Catequinas	Catequinas
Resinas	Resinas
Fehling	Azúcares reductores
Baljet	Lactonas
Espuma	Saponinas
Cloruro férrico	Fenoles y taninos
Ninhidrina	Aminoácidos
Borntrager	Quinonas
Shinoda	Flavonoides
Kedde	Cardenolidos
Antocianidina	Antocianidinas
Dragendorff	Alcaloides
Mayer	Alcaloides
Wagner	Alcaloides
Lieberman-Buchard	Triterpenos / esteroides

Nota: Elaborado por (Migdalia, 2002, págs. 42-63). (Dehesa, 2002, págs. 139-143).

2.6. Análisis cuantitativos de extractos vegetales

Para los análisis físico-químicos de los extractos fluidos se realizaron diferentes ensayos como son: la determinación de sólidos totales, pH, densidad relativa y el índice de refracción (Naranjo, 2009, pág. 447), (Dehesa, 2002, págs. 139-143).

Los sólidos totales están determinados a la suma de los sólidos disueltos así como de los sólidos no disueltos que quedan luego de que la fracción líquida se halla evaporado y tener una variación de masa (Delgadillo, Camacho, Pérez, & Andrade, 2010, pág. 56).

El índice de refracción consiste en el cambio de dirección que percibe la luz al saltar de una sustancia a otra debido a un cambio en su velocidad de difusión, el índice de refracción de una solución puede variar con la longitud de onda de la radiación que se genera, así como, por la temperatura (Mauri, Llobat, & Herráez, 2010, pág. 136).

La densidad relativa de una sustancia es la relación entre la masa de un volumen dado de una solución a ensayar a una temperatura y la masa de volumen de otra sustancia que se toma como patrón, agua a la misma temperatura, (Martínez & Gragera, 2008, pág. 71).

El pH es la concentración molar de H^+ de una solución acuosa, nos permite determinar la acidez o la alcalinidad, en función a la cantidad de los iones de hidrógeno presentes en dichas soluciones (Brown, Lemay, Bursten, & Burdge, 2001, pág. 621).

2.7. Dermatomicosis

Dermatomicosis se refiere de modo general a las infecciones con erupciones de progresión lenta producidas en la piel y sus apéndices, no causan dolor alguno ni amenazan la vida (Prats, 2005, pág. 87), las micosis empiezan cuando lesiones cutáneas de pequeño tamaño entran en relación con los dermatofitos preexistentes de otra

infección (Ryan & Ray, 2008, págs. 715-718). Dentro de los agentes etiológicos productores de dermatomicosis más frecuentes podemos encontrar: a *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Microsporum canis*, estos géneros son ampliamente encontrados a nivel mundial así como la candidiasis que es una infección generada al hongo de la *Candida albicans*, dichas afecciones se ven limitadas, por lo general, a zonas como la piel, uñas, mucosas y tracto gastrointestinal (Vilata Corell, 2005, págs. 54-74).

Tabla 3.

Clasificación de los hongos dermatofitos causantes de la dermatomicosis

Clasificación	Micosis	Hongos patógenos	Sitio de infección	Enfermedad
Micosis cutáneomucosas	Dermatofitosis	<i>Trichophyton rubrum</i>	Pelo, piel, uñas	Tiña
		<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Pelo, piel	Tiña
		<i>Microsporum canis</i>	Pelo, piel	Tiña
	Candidosis cutánea	<i>Candida albicans</i>	Piel	Candiadiasis

Nota: Elaborado por (Ryan & Ray, 2008, pág. 716), (Prats, 2005, pág. 86).

2.7.1. Hongos patógenos dermatofitos

Los dermatofitos son los hongos menos invasivos los cuales ocasionan infecciones superficiales de la piel frecuentemente reconocidas como: pie de atleta o tiña. Se encuentran formando hifas tabicadas, macronidios y microconidios, solo necesitan

unos pocos días, a lo mucho una semana, para iniciar su crecimiento, en general crecen en medio semisólido de Agar Sabouraud con una temperatura de 25°C. Dichos hongos se encuentran bien adaptados a los tejidos queratinizados muertos del estrato córneo de la piel, así como en las uñas y el pelo (Ryan & Ray, 2008, págs. 715-718).

El género *Microsporum* se define por la generación de muchos macroconidios y en menor o escasa proporción de micronidios; el género *Trichophyton* se caracteriza por la elaboración de muchos microconidios y en poca cantidad macroconidos (Winn, y otros, 2006, págs. 1138-1168). El género *Candida* son levaduras, las cuales tienen una amplia distribución en la naturaleza, esta representa una de las infecciones micóticas más frecuentes en pacientes hospitalizados inmunodeprimidos (Ormeño & Candela , 2012, pág. 59).

2.7.1.1. *Candida albicans*

La *Candida albicans* crece en colonias blandas de un color cremoso y un olor característico a las levaduras, su crecimiento es acelerado se tiene formación de colonias en un tiempo de 24 horas a una temperatura de 37°C. Es una especie difórmica que es característica de los hongos patógenos (Brooks, Carroll, Butel, & Morse, 2008, pág. 674).

2.7.1.2. *Microsporum canis*

Este hongo cuenta con un crecimiento rápido de alrededor 3 a 5 días. Al inicio las colonias son sedosas y con un color blanco; con el tiempo tienden a desarrollar una pigmentación amarilla en la periferia y al madurar en su reverso la colonia se torna amarillo trigueño; observados al microscopio, se pueden notar un predominio de macroconidios ante microconidios (Winn, y otros, 2006, págs. 1138-1168). Observar

2.7.1.3. *Trichophyton mentagrophytes*

Tiene un crecimiento relativamente acelerado llegando a su madurez en un tiempo de alrededor de 3 a 5 días. Al inicio las colonias son algodonosas de color blanco y con el tiempo pueden cambiar su color a crema al llegar a su madurez. La escasa presencia o ausencia de macroconidios es muy normal, los microconidios pueden formar grupos similares al de un racimo de uvas (Winn, y otros, 2006, págs. 1138-1168).

2.7.1.4. *Trichophyton rubrum*

De los hongos empleados en la investigación *Trichophyton rubrum* es el que más se demora en llegar a su madurez, se tarda alrededor de 4 a 7 días. Inicialmente la superficie de la colonia tiene un color blanco y una consistencia aterciopelada algodonosa, visto desde la parte inferior tiene una tonalidad rojo vino. Los microconidios tienden a presentar formas de gotas o lágrimas y es muy raro encontrar macroconidios multicelulares (Winn, y otros, 2006, págs. 1138-1168).

2.8. Métodos de sensibilidad

Para la realización de antibiogramas se cuenta numerosos métodos para evaluar la actividad antimicrobiana. Nos permite determinar mediante estos ensayos cual es la cantidad mínima de una sustancia capaz para inhibir el crecimiento de un microorganismo en dosis controladas (García-Rodríguez & Picazo, 1999, pág. 63). Para aplicar cualquiera de los métodos de sensibilidad el primer paso es contar con número determinado de microorganismos, lo que se puede realizar por los siguientes métodos:

Técnica de espectrofotometría

La técnica de espectrofotometría es la más apropiada para poder medir con exactitud la masa celular de los microorganismos, es un método que mide cuanta cantidad de luz está difractada en una suspensión de células. Al pasar un haz luminoso por una suspensión bacteriana, existe una disminución de la luz transmitida por la presencia de las células en la suspensión analizada, y esta reducción de luz es la medida de la masa bacteriana que se encuentra presente (Stanier, Ingraham, Wheelis, & Painter, 1996, pág. 199).

Recuento microbiano por Cámara de Neubauer

Para poder determinar el número de células de un microorganismo por volumen contenidas en una suspensión ocupamos la cámara de Neubauer, la cual permite cuantificar la densidad de células por volumen encontradas, este número de células se emplea como base para establecer una dosificación o concentración de células en un cultivo determinado (Toro, 2005, pág. 24). Esta es una plancha de vidrio la cual tiene dos divisiones destinadas para el conteo celular con una profundidad de 0.1 mm. Cada división del hematocitómetro se encuentra dividida por 9 cuadros de 1mm^2 y el cuadro central contiene 25 cuadros. Los cuadrados de la mitad están divididos por 16 cuadros terciarios de 0.0025mm^2 (Cañedo & Ames, 2004, pág. 40).

2.8.1. Método de Kirby-Bauer

Uno de los más métodos de evaluación antibacterial más utilizados es el método de difusión de discos Kirby- Bauer (Rojas, García, & López, 2005, págs. 28-29). Este método usa discos de papel que pueden o no tener actividad antimicrobiana, hay discos que vienen impregnados de sustancias con activada antimicrobiana y discos en blanco a los que se les añadirá la sustancia a investigar con posible actividad, ambos son

producidos por casas comerciales. Los discos se ubican en la superficie del agar gelificado, dejando distancia entre uno y otro, generalmente en los cuatro lados cardinales, los discos tienen un tamaño estándar de 6mm. La efectividad de la actividad antimicrobiana de la sustancia tratada estará dada por el diámetro del halo de inhibición que se genere, este dependerá de la resistencia o sensibilidad del microorganismo a la sustancia que se está investigando, existiendo algunos factores que afecten este halo como: la solubilidad de la droga en el medio y su expansión a través del agar (Rodríguez Cavallini, Gamboa Coronado, & Hernández , 2005, pág. 339).

2.8.2. Método de Barry

Este método consiste en agregar al medio de cultivo fundido a una temperatura controlada, el inóculo de concentración conocida. Esta mezcla se colocará en cajas petri, para luego ser homogenizada, se deja solidificar y se lleva a incubar (García Martos, Fernández del Barrio, & Paredes Salido, 1994, págs. 136-137).

2.8.3. Método modificado de Kirby-Bauer

Este método reemplaza al disco de papel que se utiliza generalmente por pocillos o pozos en el medio de cultivo agar, esta modificación permite colocar en cada pozo los extractos. Los pozos se realizan con la ayuda de un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro (Toribio, Oriani, Fernández, Toso, & Tortone, 2007, pág. 46). Esta modificación en la técnica permite que: los pozos albergan mayor cantidad de muestra, o realizar la prueba con sustancias que generalmente no son absorbidas por los discos de papel.

3. MARCO METODOLÓGICO

3.1. Protocolo de limpieza y secado del material vegetal

El procedimiento de limpieza del material vegetal es necesario para eliminar contaminación externa o microorganismo ajenos a la planta, los cuales podrían afectar a la droga al momento de extracción de los extractos (Abdelnour-Esquivel, 1994, pág. 18). Siguiendo el protocolo de desinfección las hojas de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) fueron tratadas con dosis de hipoclorito de sodio o cloro comercial en concentración del 1%, con una exposición de 10 a 12 minutos, inmediatamente se realizaron dos lavados con agua potable para eliminar excesos del cloro (Rodolfo López, 2010, pág. 121). Después de la limpieza las hojas debieron ser llevadas inmediatamente a secar para de esta manera poder estabilizar el tejido eliminando el riesgo de que las hojas se dañen con el exceso de agua (Sadzawka R., 2007, págs. 8-10).(Anexo1); el secado se realizó colocando las hojas en una estufa de secado mediante aire caliente forzado a temperatura de 50°C durante 3 días (Larrasoña, 2010, pág. 8).

3.2. Molienda del material vegetal

El proceso de molienda tiene como fin la disminución del tamaño de las partículas de la planta, de esta manera es más fácil su extracción, ya que el solvente puede penetrar fácilmente en el tejido vegetal. Es necesario realizar un tamizaje para eliminar material que pueda complicar la extracción, tales como: raíces, ramas, nervaduras; y, así tener partículas de tamaño homogéneo (Sharapin, 2000, págs. 28-46).

Para el proceso de la molienda o trituración de las hojas tenían fue necesario utilizar un molino convencional o manual, la molienda se realizó hasta que el material vegetal

pueda pasar por un tamiz No. 18, en el que se considera un diámetro de abertura para la partícula de 1mm. (NTE INEN 0154, 1987, pág. 3). Este proceso fue previo a la humectación.

3.3.Humectación del material vegetal

La droga triturada (1 Kg.) se llevó al proceso de humectación que es el primer paso básico en el procedimiento de extracción con el solvente alcohol al 96% de pureza, tratando de que el mensturo permanezca en contacto con la totalidad de la droga permitiendo así su esponjamiento con el propósito de facilitar la entrada del solvente en las membranas celulares (Carrión Jara & García Gómez, 2010, pág. 27). El proceso se realiza por el lapso de una hora a temperatura ambiente de entre 15 a 25 °. Hay que guardar relación entre la masa del material vegetal y el volumen del solvente, se colocó un volumen de alcohol 96% no menor del peso de la droga.

3.4.Percolación y filtrado del material vegetal

La percolación es un procedimiento que radica en hacer pasar el solvente permanentemente, recirculando y renovando a través del material vegetal, hasta el agotamiento del material vegetal. El solvente recorre la zona donde se almacena la droga, arrastrando los principios activos hasta la recolección conjunta del extracto con los metabolitos. Para iniciar con la percolación se llevó la droga humectada al percolador con la llave cerrada comprimiendo ligeramente para evitar la formación de burbujas, se continuó añadiendo el alcohol sobrepasando el material vegetal unos 3cm, se recirculó 1/3 del contenido líquido del percolador siendo esta la primera recolección del extracto, se repuso el solvente y se dejó en maceración por 24 horas, pasado este tiempo se abrió la llave de salida de manera que el percolado sea recolectado al mismo

tiempo se añadió más alcohol reponiendo lo perdido, creando un flujo de 3-5mL/min hasta que recolectó la cantidad de extracto necesaria que fue de 1000mL (Anexo2). Las recirculaciones recolectadas se almacenaron en un frasco ámbar para homogeneizar el extracto y se dejó en reposo a temperatura de 8 a 10°C por 24 horas. Fue necesario desechar los residuos que pudieran existir en la solución extraída, para esto se realizó el filtrado con una bomba al vacío utilizando papel filtro, embudo Büchner y un matraz kitasato, con la ayuda de un compresor generando la succión necesaria para que los residuos se queden en el papel filtro; y, así tener una solución libre de impurezas (Migdalia, 2002, págs. 42-63).

3.5. Obtención de los extractos vegetales

3.5.1. Obtención del extracto blando de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.)

Para la obtención del extracto blando fue necesario reducir el solvente de la muestra, previamente filtrada (alcohol al 96%) del proceso de percolación, esto se llevó a cabo mediante la evaporación del solvente a baño maría a una temperatura constante de 40 +/- 2 °C y 260 rpm en el rotavapor. El extracto blando debía tener una consistencia semisólida del 15 a 25% de humedad (Guerra Corado , 2005, pág. 24). Partiendo de 1kg de muestra vegetal se obtuvo 1L de extracto, que ingreso a un proceso de concentración hasta obtener 150g, que corresponde a un extracto blando, con un porcentaje de humedad del 15%.

3.5.1.1. Diluciones del extracto blando

Al tener preparado el extracto blando de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.), se procedió a pesar cuidadosamente 15g con la ayuda de una espátula en un

vaso de precipitación, se colocó agua destilada estéril como solvente para homogenizar; se llevó la mezcla al equipo de ultrasonido, el mismo que por medio de ondas vibratorias permitió que el extracto se disuelva completamente con el agua durante 25 a 30 minutos aproximadamente. Al observar que las dos sustancias se mezclaban se trasladó a un balón aforado de 10mL llenándolo hasta la línea de aforo con agua destilada estéril, de esta manera se obtuvo la muestra madre. Desde este punto se partió para hacer las siguientes diluciones. Se tomó 5mL de la solución madre y se pasó a otro balón de 10mL aforándolo nuevamente, de esta manera hasta tener 6 balones aforados con 6 concentraciones distintas: 15%, 7.5%, 3.75% 1.87% 0.93%, 0.46% peso/volumen. (Anexo3).

3.5.2. Obtención del extracto fluido de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.)

Para la obtención del extracto fluido se partió del material vegetal triturado con partículas de tamaño homogéneo, tomando 500g de la droga, tanto para el extracto de 50% y 25% se realizó la humectación y percolación previamente descrita. Para alcanzar el extracto fluido al 25% de concentración se realizó la extracción en relación 1:4 es decir que por cada gramo de droga vegetal deben existir 4mL de solvente, se comenzó con 500g de droga vegetal y se empleó como solvente alcohol 96% en los métodos de humectación y la recirculación del percolado hasta la recolección de 2000mL; para el proceso de obtención del extracto fluido a la concentración de 50% se realizaron los mismos procesos que el anterior extracto, la única diferencia fue la proporción del material vegetal en relación al solvente de 1:2 es decir que por cada gramo debe hallarse

el doble de solvente, de esta manera partiendo de 500g de droga se recolectó 1000mL de extracto (Migdalia, 2002, págs. 42-63).

3.5.2.1. Control de calidad del extracto fluido

El control de calidad del extracto fluido fue realizado mediante el análisis organoléptico (olor y color), así también se llevaron a cabo los análisis cualitativo mediante un screening fitoquímico y cuantitativos como son determinación de: índice de refracción, de sólidos totales, de la densidad relativa, del pH, descritos en el manual de Control de Calidad de los fitofármacos de (Dehesa, 2002, págs. 139-143).

3.6. Análisis cualitativo de los extractos vegetales

Se realiza el análisis en las dos diluciones del extracto fluido (Anexo4).

3.6.1. Ensayo para Catequinas

Las catequinas forman parte del grupo de los flavonoides, están conformadas por una estructura química con un esqueleto carbonado ($C_6-C_3-C_6$) con dos anillos aromáticos y múltiples grupos hidroxilos, la solubilidad de este grupo puede variar sin embargo en su gran mayoría son muy solubles en un medio acuoso y en solventes orgánicos polares (Bonilla Rios, Varón, & Garzón, 2014, pág. 36).

Con la ayuda de un capilar de vidrio se tomó una gota del extracto alcohólico y se colocó sobre un trozo de papel filtro, sobre la mancha formada por el extracto se añadió carbonato de sodio y se observó bajo la luz UV. El ensayo positivo es la presencia de una mancha verde carmelita bajo ésta luz.

3.6.2. Ensayo para Resinas

Las resinas son terpenos oxidados de los aceites volátiles que se presentan como exudaciones semisólidas producidas por las plantas, su principal característica es la insolubilidad en agua a diferencia del alcohol o éter y su cristalización no es muy común (Remington Gennaro, 2003, pág. 501).

Para la detección de la presencia o ausencia de resinas, se adicionó 2mL del extracto alcohólico en un tubo de ensayo e inmediatamente se colocó 10mL de agua destilada.

Para la ratificación de presencia de resinas debe existir un precipitado.

3.6.3. Ensayo de azúcares reductores

Los azúcares reductores son un tipo de carbohidratos monosacáridos o disacáridos que tienen la capacidad de ceder electrones a otras moléculas es decir actúa como un agente reductor lo cual se debe a la presencia de un grupo aldehído o cetona (Oxford University Press, 2003, págs. 38-66). Mediante una reacción de oxidación de los azúcares reductores el ion Cu^{++} se reduce a Cu^{+} pasando de color azul a rojo por la actividad de aldehídos alifáticos que son oxidados a ácidos carboxílicos (Griffin, 1981, pág. 334).

Para la determinación de azúcares reductores se realizó el ensayo de Fehling partiendo de un extracto alcohólico se eliminó el solvente de la alícuota (2mL) mediante baño María y el residuo se re diluyó en 1mL de agua destilada, posteriormente se añadió 2mL del reactivo de Fehling, Se evidenciaría que el ensayo es positivo, si al mezclar el reactivo con la droga, ésta se torna de color rojo; o, en su defecto se notaría la presencia de un precipitado rojo en el fondo

3.6.4. Ensayo para saponinas

Las saponinas son compuestos orgánicos que pueden ser de uno o varios azúcares. Están catalogados como esteroidales o triterpénicos tomando en cuenta la naturaleza de la aglicona. Por medio de la hidrólisis ácida o enzimática se puede dar el inicio a una sustancia libre de los azúcares conformando así la sapogenina lo cual es lo que genera la espuma (Romo, 2006, págs. 89-143).

Para el ensayo de espuma se tomó 1mL de extracto más 1mL de agua destilada (1:1) en un tubo de ensayo y se agitó vigorosamente por 1 minuto, se comprueba que el resultado es positivo si se observa la presencia de espuma al cabo de 5 minutos de reposo.

3.6.5. Ensayo para fenoles

Dentro de los fenoles podemos encontrar uno o muchos grupos OH unidos estrechamente al grupo aromático. La propiedad de mayor preponderancia que permite contrastar a los alcoholes de los fenoles está dado por la acidez puesto que los fenoles son débilmente ácidos además la interacción del FeCl_3 con el grupo funcional del enol dan la coloración de rojo violeta (Beyer & Walter, 1987, pág. 524).

Se tomó una fracción de 2ml de extracto alcohólico luego se agregó 3 gotas de tricloruro férrico (FeCl_3) a una concentración del 5% en solución salina fisiológica, para la validación del ensayo se debe constatar el cambio de color a rojo-vino.

3.6.6. Ensayo para quinonas

Las quinonas están constituidas como un núcleo principal que puede ser la estructura o también parte de moléculas complejas aromáticas alifáticas y en ocasiones diméricas, las mismas que componen un conjunto importante de pigmentos vegetales (Marcano &

Hasegawa, 2002, pág. 202). Las naftoquinonas y antraquinonas libres al ser tratadas con el reactivo de Borntrager hidróxido amónico crean complejos con coloración rojo cereza en la fase alcalina (Rivas-Morales, Oranday-Cárdenas, & Verde-Star, 2016, págs. 28-33),

Para la evaluación de quinonas se efectuó el ensayo de Borntrager para el cual se realizó en un extracto con presencia de cloroformo, al estar en un extracto en presencia de alcohol se eliminó dicho solvente mediante su evaporación y se rediluyó en 1mL de cloroformo; se añadió 1mL de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5% en agua, se removió y se lo mantuvo en reposo. En este proceso se determina si es positivo el ensayo al cambiar de coloración rojo a rosado.

3.6.7. Ensayo para flavonoides

Los flavonoides son compuestos que se encuentran en forma de glucósidos de varios azúcares cuyos aglicones son provenientes del núcleo fundamental de la fenilbenzopirona, generalmente son utilizados como colorantes naturales de color amarillo (Primo Yúfera, 1995, págs. 915-957). Se considera efectiva la reacción del metabolito con el núcleo de la γ -benzopirona (flavonoides) al tener una coloración de rojo magenta en presencia de ácido HCl concentrado y el fragmento de la cinta de Mg (Carvajal Rojas, Hata Uribe, Sierra Martínez, & Rueda Niño, 2009, págs. 164-165).

Mediante el ensayo de Shinoda se pudo determinar la presencia de flavonoides. Se colocó 1mL del extracto alcohólico en un tubo de ensayo, se añadió 1mL de ácido clorhídrico concentrado, se agregó un trozo de cinta de magnesio metálico, a los 5 minutos se agitó con 1mL de alcohol amílico y se dejó en reposo hasta observar una

separación de fases. Para considerar como positivo al ensayo se debe observar que el alcohol amfílico se coloree de amarillo, naranja, carmelita o rojo.

3.6.8. Ensayo para lactonas

Una lactona está clasificada como un éster cíclico que se conforma por medio de la concentración intramolecular de un alcohol (OH) y un ácido carboxílico (COOH), el tamaño del anillo de este compuesto depende del lugar en que se encuentra el grupo hidro dentro de la cadena del ácido carboxílico (Albores Velasco, Caballero Aroyo, González Quezada, & Pozas Horcasitas, 2006, pág. 96). Las sesquiterpenlactonas originan tonalidades naranja o roja oscura cuando se ponen en contacto con picrato de sodio o potasio (Rivas-Morales, Oranday-Cárdenas, & Verde-Star, 2016, págs. 28-33).

El procedimiento para el ensayo de lactonas consistió en tomar una alícuota (2mL) del extracto fluido en un tubo de ensayo y se añadió 1mL del reactivo de Baljet, para determinar como positivo el ensayo se debió observar un cambio de coloración o precipitado rojo

3.6.9. Ensayo para aminoácidos

Los aminoácidos forman parte al grupo de compuestos orgánicos solubles en agua que cuentan en su estructura con un grupo carboxilo y un grupo amino adheridos al mismo átomo de carbono, al unirse forman cadenas llamadas péptidos. Las plantas cuentan con la capacidad de sintetizarlas a diferencia de los animales que precisan consumirlos (Oxford University Press, 2003, págs. 38-66). La Ninhidrina (agente oxidante) es la sustancia para la detección de los aminoácidos, es el hidrato de una tricetona cíclica que reacciona con un aminoácido dando la coloración púrpura, indicativo que en ensayo es positivo (Ocampo , Ríos, Betancur, & Ocampo, 2008, pág. 156).

Se tomó una alícuota del extracto alcohólico en un tubo de ensayo y a baño maría se eliminó el solvente, se añadió 2mL de la solución de Ninhidrina al 2%; se agitó homogenizando la muestra mediante calor de 5 a 10 minutos en baño maría. El ensayo será positivo al observar una coloración azul violeta.

3.6.10. Ensayo para cardenólidos

Los cardenólidos pertenecen a los esteroides cardiotónicos que vienen unidos al carbono 17 un anillo pentagonal de lactona α - β insaturada, además cuentan con 23 carbonos en su estructura, a dosis pequeñas estos compuestos son medicamentos cardiotónicos (Primo Yúfera, 1995, págs. 915-957). El reactivo de Kedde nos indica la presencia de cardenolidos, cuando la reacción es positiva se puede notar la presencia de anillos lactónicos pentagonales alfa-beta no saturados (cardenólidos) dando una coloración rojo violeta (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, 1968, pág. 354).

Para el ensayo de Kedde con el cual se determinó los cardenólidos se colocó una alícuota (2mL) del extracto fluido en un tubo de ensayo, con ayuda de una pipeta se añadió 1mL del reactivo de Kedde y se mantuvo en reposo por un tiempo de 5 a 10 minutos. Para que el ensayo de positivo debe existir un cambio en la coloración a una tonalidad violácea.

3.6.11. Ensayo para Antocianidinas

Son compuestos derivados oxhidrilados y metoxilados del ion flavilio (Primo Yúfera, 1995, págs. 915-957), tienen la propiedad de ser solubles en agua pero insolubles en soluciones de éter, benceno o cloroformo, por lo tanto en contacto de un medio ácido sobresale el ión flavilio que da la tonalidad roja; mientras el pH se eleva las antocianinas

se transforman en una base quinónica que da la coloración azul (SantaCruz Cifuentes, 2011, pág. 10).

Se calentó una alícuota (2mL) del extracto en presencia de alcohol por un tiempo de 10 minutos con 1mL de (HCl), se dejó en reposo hasta que baje la temperatura y se adicionó 1mL de agua destilada y 2mL de alcohol amílico, con una varilla de agitación se mezcló y se dejó reposar hasta ver que se produzca una separación de dos fases; para determinar positivo el ensayo se debe observar un cambio de color de rojo a marrón en la fase amílica.

3.6.12. Ensayos para alcaloides

Estos compuestos tienen una estructura heterocíclica con nitrógeno y oxígeno, en general los alcaloides forman cristales (Ege, 2000, pág. 1104). La gran parte de estos compuestos se hallan en forma de sales de ácidos orgánicos que al estar en contacto con metales pesados como el ioduro de potasio del reactivo de Dragendorff, el ioduro de potasio y mercurio del reactivo de Mayer y el mercurio tetrayoduro de potasio del reactivo de Wagner generan un precipitado dando positivo al ensayo para alcaloides (Carvajal Rojas, Hata Uribe, Sierra Martínez, & Rueda Niño, 2009, págs. 164-165).

Ensayo de Dragendorff

Se tomó una alícuota del extracto alcohólico y se evaporó el solvente mediante baño maría, al residuo generado se re disolvió en 1mL de ácido clorhídrico al 1% en agua; a esta solución acuosa ácida se añadió 3 gotas del reactivo de Dragendorff, para dictaminar como positivo el ensayo de debe observar: opalescencia, turbidez o un precipitado naranja rojizo.

Ensayo de Mayer

Se partió así como se describe anteriormente hasta la solución ácida, a esta se le añadió una pequeña cantidad de cloruro de sodio en polvo, y se procede a mezclar y filtrar. Se añadió 3 gotas del reactivo de Mayer al filtrado. Para determinar que el ensayo da positivo se debe observar: opalescencia, Turbidez o un precipitado coposo de color blanco crema.

Ensayo de Wagner

Se inició a partir de la solución acida, se añadió 3 gotas del reactivo de Wagner y se dejó en reposo; para determinar positivo el ensayo se debe observar turbidez o un precipitado abundante de color blanco crema

3.6.13. Ensayo para triterpenos

Los triterpenos están constituidos por 30 átomos de carbonos de los cuales 6 unidades son isoprenicas, se localizan largamente repartidas en la naturaleza y se las puede encontrar en su estado libre o unidos a glicósidos (Romo, 2006, págs. 89-143).

Con el ensayo de Lieberman-Buchard se determinó la presencia de triterpenos, a continuación se evaporó el disolvente de una alícuota (2mL) de extracto alcohólico a baño maría y el restante se re disolvió en 1mL de cloroformo, luego se adicionó 1mL de anhídrido acético y con una varilla de agitación se homogenizó la muestra, con mucho cuidado se agregó 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado evitando que la mezcla se agite, para que el ensayo de positivo tiene que existir un cambio de color: un rosado-azul muy rápido, un verde intenso-visible aunque breve o un verde oscuro-negro al término de la reacción.

3.7. Análisis cuantitativos de los extractos vegetales

Para la cuantificación del extracto fluido se realizaron los ensayos que encuentran puntualizados en el manual de Control de calidad de los fitofármacos de (Dehesa, 2002, pág. 142).

3.7.1. Determinación del índice de refracción y concentración de azúcar

El índice de refracción y la concentración de azúcar se midió en un refractómetro el cual debía estar conectado a un termostato de circulación con flujo de agua que garantizó una temperatura constante durante el proceso; con una piseta se colocó agua destilada en el prisma de refracción y se cerró la tapa, éste será el blanco necesario para calibrar el refractómetro, se colocó el extracto alcohólico y se realizó la lectura, observando los dos campos que nos ofrece el equipo tanto para índice de refracción como para la concentración de azúcar. El proceso se realizó por triplicado para tener resultados confiables (NTE INEN 42, 1973, pág. 2).

3.7.2. Determinación de la densidad relativa

En la determinación de la densidad relativa del extracto se necesitó un picnómetro, es importante realizar el proceso con guantes de látex para que los datos no varíen ya que se podrían quedar residuos de grasa de la piel en el picnómetro. Primero se pesó el picnómetro vacío, luego se pesó el picnómetro con agua destilada en su interior y por último se pesó el picnómetro con el extracto fluido, se realizó el proceso por triplicado (NTE INEN 2150, 1999, pág. 2).

Para la determinación de la densidad relativa se empleó la siguiente ecuación:

$$D = \frac{M_1 - M}{M_2 - M}$$

En donde:

M: Peso el picnómetro vacío en gramos.

M₁: Peso del picnómetro con la muestra en gramos.

M₂: Peso del picnómetro con el agua destilada en gramos.

3.7.3. Determinación del pH

Para la determinación del pH en el extracto fue necesario ajustar el equipo potenciómetro con un buffer adecuado al rango que necesitamos para posteriormente realizar la medición por triplicado (NTE INEN 973, 1984, pág. 2).

3.7.4. Determinación de los sólidos totales

Se colocó una cápsula de porcelana vacía debidamente limpia y seca dentro de una estufa a temperatura de 103 +/- 2 °C durante un tiempo de 30 min, enseguida se llevó la cápsula a un desecador teniendo en cuenta que se debía manipular con una pinza por una hora transcurrido el tiempo se procedió a pesar la cápsula y registrar los valores. En la misma cápsula se colocó 5mL de extracto fluido, se llevó a baño maría hasta que se evapore el solvente, el residuo se pasó a la estufa a temperatura de 103 +/- 2 durante 3 horas se retiró la capsula y se puso en el desecador por una hora hasta que alcance temperatura ambiente se pesó y se registró los valores (NTE INEN 14, 1984, pág. 2). Este proceso se efectuó por triplicado con el extracto al 50% y 25%.

Para calcular el porcentaje de sólidos totales se utilizó la siguiente fórmula

$$ST = \frac{Pr - P}{V} * 100$$

En donde:

Pr= Peso de la cápsula con el residuo de extracto

P= Peso de la cápsula vacía

V= Volumen del extracto fluido

100= Factor matemático

3.8.Obtención del aceite esencial de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.)

Los aceites esenciales forman parte de la fracción volátil de los principios activos que se encuentran en una planta por ello se utilizó la técnica de destilación por arrastre de vapor.

3.8.1. Destilación por arrastre de vapor de agua

Los aceites esenciales se tratan de mezclas volátiles de compuestos orgánicos que se encuentran generalmente de modo líquido, con aspecto oleoso (Guarnizo, 2008, pág. 90). Para la extracción por arrastre con vapor de agua, el material vegetal debe estar previamente limpio, para esto se tuvo que seleccionar las hojas frescas y se debió cortar en trozos pequeños. Cabe indicar que es importante pesar la muestra para después obtener el rendimiento del aceite esencial.

La destilación se la realizó por medio de un equipo de destilación por arrastre de vapor, de acero inoxidable con una capacidad de 100 litros, llenándolo con agua corriente en la base del caldero evitando que el líquido estuviera en contacto con la droga. Se procedió a colocar el material vegetal en el destilador sellándolo herméticamente, de esta manera se evitó la salida de vapor al ser encendida la hornilla, a medida que el material vegetal entra en contacto con el vapor liberando el aceite esencial contenido. (Anexo5). Se debe

dejar correr el agua para que exista una refrigeración permanente, así no se perderá el aceite liberado en el vapor. Pasadas 4 horas se apagó el fuego recolectando el agua con un embudo de decantación, dejándola en reposo hasta poder ver claramente la división de fases entre el agua y aceite, con la ayuda de una pipeta Pasteur se extrajo el aceite esencial presente y se almacenó en un frasco ámbar a temperatura refrigerada de 5–8°C.

3.8.2. Rendimiento del aceite esencial

Para la determinación del rendimiento del extracto blando se calculó con la siguiente fórmula:

$$\%R = \frac{M_{\varepsilon}}{M_{MV}} \times 100$$

En donde:

M_{ε} = Masa del aceite esencial obtenido, en gramos.

M_{MV} = Masa del material vegetal seco, en gramos.

3.8.3. Diluciones del aceite esencial

Se realizó un total de 3 diluciones de aceite esencial de Puamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) en porcentajes de 5%, 2.5% y 1.25% peso/volumen diluido en dimetilsulfóxido (DMSO) el cual no tiene actividad antifúngica (blanco negativo) (Monzote Fidalgo, Sariego Ramos, Montalvo Álvarez, & Garrido Lorente, 2004, pág. 231).

Se tomaron estos rangos para el caso de ser utilizado en formulaciones cosméticas, las cuales no admiten concentraciones elevadas de aceite esencial, por lo que se tomó como rango más alto al 5% (Miñana & Goncalvez, 2011, pág. 4).

3.9. Determinación de la actividad antifúngica

En el proyecto de investigación se emplearon las cepas ATCC: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299, *Candida albicans* ATCC 10231 las cuales fueron adquiridas en la casa comercial Medibac y se prosiguió con las indicaciones prescritas por Microbiologics - Kwik-Stik.

3.9.1. Activación de las cepas ATCC

Previo a la activación se prepararon dos medios de cultivo, el primero Sabouraud Dextrose Agar (SDA) que es un medio semisólido dispensado en cajas Petri y el segundo Tryptic Soy Broth (TSB) el cual es medio líquido dispensado en tubos de ensayo.

Se rompió la envoltura por la muesca en la parte superior y se sacó el kit Kwik-Stik de la bolsa, la misma que contenía la cepa liofilizada, se guardó la etiqueta con la información del microorganismo para su seguimiento, se presionó por la parte superior del liofilizado para romper la ampolla que contenía el fluido para hidratar la pastilla con la cepa, manteniendo en posición erguida para de esa manera permitir el paso del líquido a la parte inferior del pellet, con el hisopo embebido se procedió a la siembra en los medios de cultivos Sabouraud Dextrose Agar (SDA) con la técnica de diseminación por agotamiento. Cada unidad del kit Kwik-Stik contiene una pastilla liofilizada de una única cepa de microorganismo con cada hisopo se inoculó 4 cajas con medio de cultivo, las cuales fueron nuestras cepas madre; se etiquetó con el nombre, el ATCC del microorganismo y con la fecha en la que se sembró para tener un control preciso, con ayuda de una pinza estéril se sacó el hisopo de su estuche, puesto que aún podía contener

rezagos del microorganismo para proceder a colocar en un tubo de ensayo con medio líquido de Tryptic Soy Broth (TSB) para su conservación. Tanto las cajas como el tubo de ensayo inoculado fueron llevados a incubación a una temperatura de 25°C en presencia de oxígeno. La vigencia de las cepas del kit Kwik-Stik es de un tiempo aproximado de 10 a 24 meses bajo condiciones adecuadas de refrigeración de 8-10°C (MicroBioLogics, 2011, pág. 95).

Otro medio de conservación para las cepas es en Cryobank o banco de conservación el cual permite almacenar muestras de cepas a bajas temperaturas (-80°C) (Aguilera, González, Bello, & Mella, 2010, pág. 393), el sistema se basa en perlas que han sido tratadas químicamente suspendidas en una mezcla preservante criogénica especial.

3.10. Elaboración del inóculo

Es necesario tener en claro la clasificación de nuestros hongos para su correcta manipulación, en el proyecto se trabajó con hongos del género *Microsporium*, *Trichophyton*, los cuales tienen como característica ser filamentosos; y, el género *Candida* el cual es una levadura (Ballesté, Mousqués, & Gezuele, 2003, pág. 95). Partiendo de esta premisa la preparación del inóculo para cada uno de los géneros es diferente.

3.10.1. Preparación del inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231

Esta cepa ATCC garantiza un microorganismo idóneo destinado a la investigación en el laboratorio (ATCC® 10231™, 2016, págs. 1-2). Antes de realizar la siembra del inóculo se realizó dos procedimientos previos como es el “overnight” y medir la densidad del cultivo mediante turbidimetría en el espectrofotómetro.

3.10.1.1. “Overnight”

“Overnight” es un cultivo que ha crecido de la noche a la mañana en un medio líquido (Carrillo, 2011). Se tomó con un asa gruesa una fracción abundante del cultivo de *Candida albicans* ATCC 10231 y se cultivó a una temperatura de 30°C en medio líquido estéril de Tryptic Soy Broth (TSB) durante 18 horas (Passerini de Rossi, García, Alcaraz, & Franco, 2014, pág. 290).

3.10.1.2. Conteo de *Candida albicans* ATCC 10231 por espectrofotómetro

Luego del cultivo “durante la noche” se centrifugó a 3500 revoluciones por minuto (rpm) por un tiempo de 20 minutos, se eliminó el sobrenadante del medio Tryptic Soy Broth (TSB) manteniendo solo al inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231. Se resuspendió con suero fisiológico estéril en el mismo tubo con el inóculo y se agitó hasta su homogenización. Como blanco de referencia se llenó una celda con suero estéril y se midió en el espectrofotómetro. En otra celda se realizaron diluciones del inóculo con suero fisiológico estéril y se midió hasta llegar a obtener una absorbancia aproximada a 0,200 a una longitud de onda de 655nm; logrando un inóculo que se encuentre al 1×10^8 UFC/mL (Maldonado Rodríguez , 2006, pág. 80).

3.10.2. Preparación del inóculo de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533,

Trichophyton rubrum ATCC 28188 y *Microsporum canis* ATCC 36299

Estas cepas ATCC garantizan microorganismos idóneos destinados a la investigación en el laboratorio (ATCC® 9533™, 2016, págs. 1-2) (ATCC® 28188™, 2016, págs. 1-2) (ATCC® 36299™, 2016, págs. 1-2). Para lo que son las siembras de hongos filamentosos es necesario previamente efectuar el conteo de esporas, lo cual se realizó mediante la cámara de Neubauer.

3.10.2.1. Conteo con cámara de Neubauer

Se tomó con la ayuda de una jeringuilla estéril una porción abundante del cultivo del hongo y se llevó a un tubo de ensayo con 15mL de agua destilada estéril, en el vortex se agitó vigorosamente por un tiempo de 10 minutos para que el microorganismo se pueda homogenizar con el agua; se limpió la cámara de Neubauer o también conocida como hematocitómetro y el cubre objetos con alcohol al 70%; se colocó con una pipeta automática 10 μ L de la suspensión de las esporas en el hematocitómetro, cuidadosamente, evitando que se formen burbujas se sobrepuso el cubre objetos. Se colocó la cámara de Neubauer en la platina del microscopio, se inició la observación con el objetivo de 10x para poder enfocar hasta llegar al de 40x. Se contó el número de esporas presentes en cada una de las cámaras evitando contar dos veces las mismas esporas (Castillo Morales, 2004, pág. 90).

3.11. Técnicas de siembra

Para la determinación de la actividad antifúngica se realizaron las siguientes técnicas de siembra: para el género *Candida* se utilizó el método de Kirby-Bauer y para los géneros *Microsporum* y *Trichophyton* se utilizaron los métodos de Barry y Kirby-Bauer modificado.

3.11.1. Método de Kirby-Bauer

Con una micropipeta automática se colocó 1mL del inóculo de *Candida* sobre la superficie del medio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) estéril y con la ayuda de un hisopo estéril se realizó el frotis por toda la Caja petri procurando extender homogéneamente (García Martos, Fernández del Barrio, & Paredes Salido, 1994, págs. 136-137).

Se ubicó con pinzas 4 discos en forma de cruz, en 2 de ellos se dispensó 8µL. de las diluciones ya sea para el extracto fluido, blando o aceite esencial; en otro disco se dispensó el control negativo que será con aquella solución que se utilizó de solvente en los extractos o diluciones, en caso del extracto blando el blanco negativo fue agua destilada estéril, para el extracto fluido alcohol al 96% y para el aceite esencial fue dimetilsulfóxido (DMSO); para el disco restante como blanco positivo se empleó discos con antibióticos de Fluconazol listos para su uso los cuales son preparatos por casas comerciales. Se trasladó las cajas a la incubadora por 15 minutos boca arriba para que los discos no se muevan. Luego se dio la vuelta y se dejó incubar por un tiempo de 18 a 24 horas.

3.11.2. Método de Barry o de inundación

Para la siembra de los hongos se empleó la técnica de Barry en el cual se incorporó el inóculo con un número de esporas en torno a 10^6 /mL (Bastidas, 2013, pág. 3), de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 y *Microsporum canis* ATCC 36299 al medio del cultivo Sabouraud Dextrose Agar (SDA) Antes de que se solidifique a una temperatura de 45°C o a su vez una temperatura que la piel pueda tolerar, de esta manera las esporas no morían, se homogenizó, se vertió sobre las cajas petri y se dejó solidificar (García Martos, Fernández del Barrio, & Paredes Salido, 1994, págs. 136-137). Morirán

3.11.3. Método de Kirby-Bauer modificado o por pocillos

Cuando el medio con el inóculo se gelificó, se realizaron 4 pozos en forma de cruz sobre el medio de cultivo con la ayuda de una pipeta Pasteur o sacabocados. En dos de estos pozos se dispensaron las diluciones de los extractos o aceite esencial; en otro pozo el

control negativo y en el pozo restante se aplicó el control positivo crema dérmica de Clotrimazol al 1% con una jeringuilla.

3.12. Análisis estadístico

Para el análisis de varianza o ANOVA se empleó el programa estadístico Statistix 8.0 el que nos permitió contrastar si dos o varios promedios son similares o a su vez existe alguna diferencia entre sí (Yáñez, 2010, pág. 58).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.Lugar de investigación

El proceso experimental de la investigación se realizó en los laboratorios de Proyectos, Química Analítica y Microbiología de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede el Girón, de la ciudad de Quito y en el laboratorio de Operaciones Unitarias del Departamento de Ingeniería Química DIQ de la Escuela Politécnica Nacional.

4.2.Recolección del material vegetal

Se recolectaron 120 kg de hojas Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) y empacadas en sacos de yute para su transporte.

La obtención del material vegetal se realizó de dos maneras: La primera fue adquirida en Mercado Santa Clara, recolectado en la zona de Mojanda provincia de Imbabura. La segunda fue a través de la recolección en la provincia de Pichincha, Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) a los alrededores del Barrio Divino Niño al Suroeste de la Ciudad de Quito S 0°20'21.3864" W 78°31'50.3436" a una altura de 3009.0 msnm (Anexo6). A través de estas dos formas de recolección se obtuvo la cantidad aproximada de 120Kg. de hojas de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.), que fueron empacados en saquillos de yute y finalmente etiquetados.

La certificación para la identificación de la especie utilizada en el proyecto se efectuó en el Herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (Anexo7).

4.3. Control de calidad del extracto blando, extracto fluido y aceite esencial de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.)

4.3.1. Análisis organoléptico del extracto blando de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.)

Tabla 4.

Parámetros para de control de calidad del extracto blando de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.)

Parámetro	Descripción
Olor	Intenso
Color	Verde oscuro
Aspecto	Semisólido

Nota. Elaborado por el autor, 2016.

4.3.2. Análisis organoléptico del extracto fluido de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.)

Tabla 5.

Parámetros para de control de calidad del extracto fluido de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.)

Parámetro	Descripción
Olor	Pungente
Color	Verde oscuro
Aspecto	Líquido

Nota. Elaborado por el autor, 2016.

4.3.3. Análisis organoléptico del aceite esencial de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.)

Tabla 6.

Parámetros para de control de calidad del aceite esencial de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.)

Parámetro	Descripción
Olor	Aromático, penetrante
Color	Amarillo claro
Aspecto	Fluido, líquido, adherente

Nota. Elaborado por el autor, 2016.

No existe una cita bibliografía que pueda corroborar los datos considerados en el análisis sensorial, así mismo hay que tener en cuenta que los datos descritos pueden variar dependiendo del evaluador.

4.4.Rendimiento del extracto blando y aceite esencial

Cálculos del rendimiento del extracto blando y aceite esencial de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.)

Tabla 7.

Rendimiento de Extracto blando y Aceite esencial

Extracto	Rendimiento
Extracto blando	15%
Aceite esencial	0.005%.

Nota. Elaborado por el autor, 2016.

El rendimiento se evaluó al observar el total de aceite extraído del material vegetal, dada la ecuación para determinar el rendimiento del extracto blando se obtuvo un resultado del 15%. Dada la ecuación para la determinación del rendimiento de aceite esencial se obtuvo un resultado de 0.005%, se puede decir que es un rendimiento bajo en referencia a (Romero Marquez, 2004, pág. 60), que dice que no es óptima una extracción de aceite si menor al 1% del total de material vegetal. Se ha demostrado la existencia de aceite esencial en las hojas de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.)

4.5. Análisis cualitativo de extractos vegetales

A continuación se detalla los ensayos realizados para el tamizaje fitoquímico en Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.)

Tabla 8.

Ensayos realizados en Tamizaje Fitoquímico del extracto blando de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.)

Ensayo	25%	50%
Catequinas	+	+
Resinas	-	-
Fehling	+	+
Baljet	+	+
Espuma	+	+
Cloruro férrico	-	-
Ninhidrina	-	-

Borntrager	+	+
Shinoda	-	-
Kedde	-	-
Antocianidina	-	-
Dragendorff	+	+
Wayer	-	-
Wagner	+	+
Lieberman-Buchard	+	+

Nota. Elaborado por el autor, 2016.

+: Resultado positivo

-: Resultado negativo

Durante el desarrollo del tamizaje fitoquímico se determinó que los principios activos presentes en Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) son: catequinas, azúcares reductores, saponinas, alcaloides (Dragendorff y Wagner), triterpenos /esteroides lactonas y quinonas coincidiendo en ambas concentraciones (25% y 50%), en un estudio realizado en plantas del género *Oreopanax* se efectuó una investigación de la composición fitoquímica en base a estos datos que se recopilaron, se han demostrado que los elemento activos presentes en mayor proporción en este género agrupan a: esteroides, flavonoides, compuestos fenólicos derivados del catecol, saponinas, cardenólidos, taninos, alcaloides y aceites esenciales, (Santos Guerreros & Reateguí Lozano, 2012, pág. 129), en concordancia con el estudios realizado y la presente investigación existe poca presencia de los elementos activos, dando positivo tan solo los ensayos de esteroides, alcaloides, aceite esencial, lactonas, quinonas y saponinas.

En el campo de la industria de la farmacología ciertos alcaloides puros son utilizados como repelentes de insectos o para formulaciones cosméticas por su alto grado de actividad antifúngica (Carrion Moreno, 2006, pág. 29). Algunos compuestos antifúngicos como es el caso de las saponinas, intervienen en distintas zonas de la membrana plasmática (sobre los esteroides) y en consecuencia su espectro de acción sobre hongos patógenos es válido (Montes-Belmont, Cruz-Cruz, Martínez-Martínez, & Sandoval-García, 2000, pág. 128). Las lactonas se han referenciado con diferentes actividades biológicas tales como son: antiinflamatoria, antibacteriana y antimicótica (Ruiz-Reyes & Suarez, 2015). En conjunto estos metabolitos presentes en el extracto fluido pueden generar la actividad antifúngica frente a los hongos dermatofitos observada en los halos de inhibición.

4.6. Análisis cuantitativos para extractos vegetales

4.6.1. Análisis cuantitativos para extracto fluido de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.)

4.6.1.1. Sólidos totales

Tabla 9.

Sólidos totales del extracto fluido en concentraciones de 25% y 50%

Repetición	25%		50%	
	Crisol vacío (g)	crisol con extracto (g)	Crisol vacío (g)	Crisol con extracto (g)
1era. repetición	21,036	21,1677	24,0359	24,1641
2da. repetición	21,036	21,1675	24,0358	24,1640
3era. repetición	21,036	21,1677	24,0359	24,1642
Promedio	21,036	21,1676	24,0359	24,1641

Nota. Elaborado por el autor, 2016.

g= gramos

La presencia de sólidos totales para el extracto fluido en concentración 25% fue de 2,6333% y en la presencia de sólidos totales para el extracto fluido en concentración 50% = 2,6547%. No existen citas bibliográficas que permita una comparación con otras investigaciones.

4.6.1.2.Densidad relativa

Tabla 10.

Densidad relativa del extracto fluido con la concentración 25%

Concentración 25%			
Repetición.	Picnómetro vacío (g).	Picnómetro con agua destilada (g).	Picnómetro con extracto vegetal (g).
1	12,807	23,241	21,979
2	12,81	23,234	21,971
3	12,817	23,232	21,972
Promedio.	12,811	23,236	21,974

Nota. Elaborado por el autor, 2016.

g= gramos

Tabla 11.

Densidad relativa del extracto fluido con la concentración 50%

Concentración 50%			
Repetición.	Picnómetro vacío (g).	Picnómetro con agua destilada (g).	Picnómetro con extracto vegetal (g).
1	26,676	36,386	34,899
2	26,68	36,387	34,9
3	26,68	36,388	34,9
Promedio.	26,678	36,387	34,899

Nota. Elaborado por el autor, 2016.

g= gramos

La densidad relativa para el extracto fluido en concentración del 50% fue de 0,847, así como para el extracto fluido en concentración del 25% fue de 0,878, siendo menor a la del agua que es de 1,000 kg/m³. La ausencia de investigaciones relacionadas impide que se pueda generar una comparación.

4.6.1.3. Índice de refracción y concentración de azúcar

Tabla 12.

Índice de refracción y concentración de azúcar del extracto fluido en concentración de 25 y 50%

	Índice de refracción		Concentración de azúcar		
	25%	50%	25%	50%	
Repetición 1	1,368	1,368	Repetición 1	22,5	22,5
Repetición 2	1,368	1,368	Repetición 2	22,5	22,5
Repetición 3	1,368	1,368	Repetición 3	22,5	22,5
Promedio	1,368	1,368	Promedio	22,5	22,5

Nota. Elaborado por el autor, 2016.

El índice de refracción para el extracto fluido en concentraciones de 25 y 50% fue de 1.368. No existe bibliografía de investigaciones similares con las que se pueda comparar.

La concentración de azúcares disueltos en el extracto fluido en concentración de 25 y 50% fue de 23 °Bx o 23% de sacarosa.

4.6.1.4. Determinación del pH

Tabla 13.

Determinación de pH del extracto fluido en concentraciones de 25 y 50%

	Concentración	Concentración
Repetición	25%	50%
Repetición 1	6,718	7,182
Repetición 2	6,718	7.184
Repetición 3	6,719	7,182
Promedio	6,7183	7,183

Nota. Elaborado por el autor, 2016.

El pH del extracto fluido en concentración de 25% fue de 6.7183 y para la concentración de 50% fue de 7.183 ambos valores de las concentraciones tienden a estar cerca del 7 lo que indica que es una solución con pH neutro.

4.6.2. Análisis cuantitativos para aceite esencial de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.)

4.6.2.1. Densidad relativa

Tabla 14.

Densidad relativa del aceite esencial

Repetición	Picnómetro vacío (g)	Picnómetro con agua destilada (g)	Picnómetro con Aceite esencial (g)
1	4,7832	5,8570	5,7338
2	4,7830	5,8563	5,7339
3	4,7821	5,8554	5,7332
Promedio	4,7828	5,8562	5,7336

Nota. Elaborado por el autor, 2016.

La densidad relativa para el aceite esencial fue de 0,8858 g/mL siendo menor a la del agua que es de 1,000 g/mL sin existir citas bibliográficas no se puede comparar los resultados.

4.6.2.2. Índice de refracción y concentración de azúcares

Tabla 15.

Índice de refracción y concentración de azúcar del aceite esencial

Índice de refracción		Concentración de azúcar	
Repetición 1	1,381	Repetición 1	29,5
Repetición 2	1,381	Repetición 2	29,5
Repetición 3	1,381	Repetición 3	29,5
Promedio	1,381	Promedio	29,5

Nota. Elaborado por el autor, 2016.

El índice de refracción para el aceite esencial fue de 1.381. No existe bibliografía de investigaciones similares con las que se pueda comparar.

La concentración de azúcares disueltos en el aceite esencial fue de 30 °Bx o 30% de sacarosa.

4.6.2.3. Determinación de pH

Tabla 16.

Determinación de pH del aceite esencial

Repetición 1	6
Repetición 2	6
Repetición 3	6
Promedio	6

Nota. Elaborado por el autor, 2016.

El pH del aceite esencial fue de 6 este valor tienden a estar cerca del 7 lo que indica que es una solución con pH neutro mínimamente ácido.

4.7.Evaluación de la actividad antifúngica

Tabla 17. (Anexo8)

Medición de los halos inhibición frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Concentración	Aceites esencial (mm)			Extracto blando (mm)						Extracto fluido (mm)	
	5%	2,50%	1,25%	15%	7,5%	3,75%	1,87%	0,93%	0,46%	25%	50%
Caja 1	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Caja 2	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Caja 3	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Caja 4	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Caja 5	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
Promedio	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00

Nota. Elaborado por el autor, 2016.

mm= milímetros

6,00 = Ausencia de actividad, dimensión del halo o pozo

Tabla 18. (Anexo9)

Medición de los halos inhibición frente a *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533

Concentración	Aceite esencial (mm)			Extracto blando (mm)						Extracto fluido (mm)	
	5%	2,5%	1,25%	15%	7,5%	3,75%	1,87%	0,93%	0,46%	25%	50%
Caja 1	16,00	8,00	6,25	20,25	17,70	12,45	9,80	8,35	8,20	11,25	15,10
Caja 2	14,50	7,05	6,15	19,50	15,95	11,90	9,65	8,60	7,60	14,95	11,35
Caja 3	12,20	8,75	6,05	21,80	17,60	13,65	10,25	8,10	8,25	15,70	9,20
Caja 4	11,60	8,65	6,05	20,45	15,35	15,80	9,70	9,05	8,15	11,60	10,35
Caja 5	11,85	9,55	6,20	21,35	18,55	11,45	9,35	7,95	7,90	17,05	11,25
Promedio	13,20	8,40	6,10	20,70	17,00	13,10	9,80	8,40	8,00	14,10	11,50

Nota. Elaborado por el autor, 2016.

mm= milímetros

Tabla 19. (Anexo10)

Medición de los halos inhibición frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

Concentración	Aceite esencial (mm)			Extracto blando (mm)						Extracto fluido (mm)	
	5%	2,5%	1,25%	15%	7,5%	3,75%	1,87%	0,93%	0,46%	25%	50%
Caja 1	12,00	11,65	9,35	16,20	12,30	9,35	9,15	6,00	6,00	7,75	8,30
Caja 2	12,60	11,20	9,95	15,85	12,15	13,25	10,05	6,00	6,00	8,55	6,75
Caja 3	9,10	8,20	9,85	19,25	13,95	15,35	9,75	6,00	6,00	8,25	8,85
Caja 4	12,35	10,75	7,10	18,63	11,70	13,55	9,05	6,00	6,00	9,15	8,45
Caja 5	13,10	12,30	7,95	17,80	12,80	14,55	9,65	6,00	6,00	8,30	8,35
Promedio	11,80	10,80	8,80	17,50	12,60	13,20	9,50	6,00	6,00	8,40	8,10

Nota. Elaborado por el autor, 2016.

mm= milímetros

6,00 = ausencia de actividad, dimensión del halo o pozo

Tabla 20. (Anexo11)

Medición de los halos inhibición frente a *Microsporium canis* ATCC 36299

Concentración	Aceite esencial (mm)			Extracto blando (mm)						Extracto fluido (mm)	
	5%	2,5%	1,25%	15%	7,5%	3,75%	1,87%	0,93%	0,46%	25%	50%
Caja 1	11,45	12,10	10,60	13,40	8,10	8,90	6,70	6,00	6,00	12,20	7,65
Caja 2	14,35	14,20	10,50	14,30	9,10	7,05	6,30	6,05	6,00	10,70	7,95
Caja 3	13,30	13,15	11,10	9,100	7,55	6,05	6,00	6,05	6,00	8,10	6,35
Caja 4	13,85	12,20	11,90	13,15	11,30	7,85	6,55	6,00	6,00	7,70	6,50
Caja 5	15,90	14,90	10,75	8,70	7,70	7,20	6,60	6,00	6,00	11,90	6,90
Promedio	13,80	13,30	11,00	11,70	8,80	7,40	6,40	6,00	6,00	10,10	7,10

Nota. Elaborado por el autor, 2016.

mm=milímetros

6,00 = ausencia de actividad, dimensión del halo o pozo

4.8. Análisis de varianza de una vía

4.8.1. Aceite esencial de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente hongos dermatofitos

Tabla 21.

Medición de los halos inhibición aceite esencial de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente a hongos dermatofitos

Especie	Caja	5%	2,50%	1,25%
<i>Candida albicans</i>	Caja 1	6,00	6,00	6,00
<i>Candida albicans</i>	Caja 2	6,00	6,00	6,00
<i>Candida albicans</i>	Caja 3	6,00	6,00	6,00
<i>Candida albicans</i>	Caja 4	6,00	6,00	6,00
<i>Candida albicans</i>	Caja 5	6,00	6,00	6,00
<i>Microsporum canis</i>	Caja 1	11,45	12,10	10,60
<i>Microsporum canis</i>	Caja 2	14,35	14,20	10,50
<i>Microsporum canis</i>	Caja 3	13,30	13,15	11,10
<i>Microsporum canis</i>	Caja 4	13,85	12,20	11,90
<i>Microsporum canis</i>	Caja 5	15,90	14,90	10,75
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Caja 1	16,00	8,00	6,25
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Caja 2	14,50	7,05	6,15
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Caja 3	12,20	8,75	6,05
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Caja 4	11,60	8,65	6,05
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Caja 5	11,85	9,55	6,20
<i>Trichophyton rubrum</i>	Caja 1	12,00	11,65	9,35
<i>Trichophyton rubrum</i>	Caja 2	12,60	11,20	9,95
<i>Trichophyton rubrum</i>	Caja 3	9,10	8,20	9,85
<i>Trichophyton rubrum</i>	Caja 4	12,35	10,75	7,10
<i>Trichophyton rubrum</i>	Caja 5	13,10	12,30	7,95

Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Tabla 22.

Análisis de varianza del aceite esencial al 5%, 2.5% y 1.25% de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Análisis de varianza para una vía: Aceite esencial (5%, 2.5%, 1.25%)					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	p
Tratamiento	2	0,00133	0,006	1,00	0,3966
Error	12	0,00800	0,017		
Total	14	0,00933			
Media general		6,0067			
Coeficiente de variación		0.39			

Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Tabla 23.

Análisis de varianza del aceite esencial al 5%, 2.5% y 1.25% de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente a *Microsporium canis* ATCC 36299

Análisis de varianza para una vía: Aceite esencial (5%, 2.5%, 1.75%)					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	P
Tratamiento	2	22,5453	11,27272	7,59	0,0074
Error	12	17,813	1,4844		
Total	14	40,3583			
Media general		12,683			
Coeficiente de variación		9,61			

Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Tabla 24.

Análisis de varianza del aceite esencial al 5%, 2.5% y 1.25% de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

Análisis de varianza para una vía: Aceite esencial (5%, 2.5%, 1,75%)					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	p
Tratamiento	2	23,1343	11,5672	5,30	0,0224
Error	12	26,1830	2,1819		
Total	14	49,3173			
Media general		10,067			
Coeficiente de variación		13,81			

Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Tabla 25.

Análisis de varianza del aceite esencial al 5%, 2.5% y 1.25% de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente a *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533

Análisis de varianza para una vía: Aceite esencial (5%, 2.5%, 1,75%)					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	p
Tratamiento	2	131,174	65,5872	42,7	0,000
Error	12	18,430	1,5358		
Total	14	149,604			
Media general		9,2567			
Coeficiente de variación		13,39			

Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Los Análisis de varianza para una vía muestran una influencia estadísticamente significativa de la actividad antifúngica del aceite esencial de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente al *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, puesto que el valor de P

es menor que $\alpha=0,05$, esto indica que se acepta la siguiente hipótesis alternativa: el aceite esencial de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) presenta actividad antifúngica sobre al menos uno de los cuatro hongos patógenos causantes de la dermatomicosis, al contrario de lo que pasa en *Candida albicans* ATCC 10231, no se observa presencia de actividad.

4.8.2. Extracto fluido de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente hongos dermatofitos

Tabla 26.

Medición de los halos inhibición extracto fluido de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente a hongos dermatofitos

Especie	Caja	25%	50%
<i>Candida albicans</i>	Caja 1	6,00	6,00
<i>Candida albicans</i>	Caja 2	6,00	6,00
<i>Candida albicans</i>	Caja 3	6,00	6,00
<i>Candida albicans</i>	Caja 4	6,00	6,00
<i>Candida albicans</i>	Caja 5	6,00	6,00
<i>Microsporum canis</i>	Caja 1	12,20	7,65
<i>Microsporum canis</i>	Caja 2	10,70	7,95
<i>Microsporum canis</i>	Caja 3	8,10	6,35
<i>Microsporum canis</i>	Caja 4	7,70	6,50
<i>Microsporum canis</i>	Caja 5	11,90	6,90
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Caja 1	11,25	15,10
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Caja 2	14,95	11,35
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Caja 3	15,70	9,20
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Caja 4	11,60	10,35
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Caja 5	17,05	11,25
<i>Trichophyton rubrum</i>	Caja 1	7,75	8,30
<i>Trichophyton rubrum</i>	Caja 2	8,55	6,75
<i>Trichophyton rubrum</i>	Caja 3	8,25	8,85
<i>Trichophyton rubrum</i>	Caja 4	9,15	8,45
<i>Trichophyton rubrum</i>	Caja 5	8,30	8,35

Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Tabla 27.

Análisis de varianza del extracto fluido al 25% y 50% de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Análisis de varianza para una vía: Extracto fluido (25%, 50%)					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	p
Tratamiento	1	0,00100	0,00100	1,00	0,3466
Error	8	0,00800	0,00100		
Total	9	0,00900			
Media general		6,0100			
Coeficiente de variación		0,53			

Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Tabla 28.

Análisis de varianza del extracto fluido al 25% y 50% de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente a *Microsporum canis* ATCC 36299

Análisis de varianza para una vía: Extracto fluido (25%, 50%)					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	P
Tratamiento	1	23,2562	23,2562	9,42	0,0154
Error	8	19,751	2,4689		
Total	9	43,0072			
Media general		8,595			
Coeficiente de variación		18,28			

Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Tabla 29.

Análisis de varianza del extracto fluido al 25% y 50% de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

Análisis de varianza para una vía: Extracto fluido (25%, 50%)					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	p
Tratamiento	1	0,169	0,169	0,37	0,5592
Error	8	3,642	0,45525		
Total	9	3,811			
Media general		8,27			
Coeficiente de variación		8,16			

Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Tabla 30.

Análisis de varianza del extracto fluido al 25% y 50% de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente a *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533

Análisis de varianza para una vía: Extracto fluido (25%, 50%)					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	p
Tratamiento	1	17,689	17,689	3,08	0,1175
Error	8	46,002	5,7503		
Total	9	63,691			
Media general		12,78			
Coeficiente de variación		18,76			

Nota: Elaborado por el autor, 2016.

En el Análisis de varianza para una vía se muestra una influencia estadísticamente significativa de la actividad antifúngica del extracto fluido de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente a los hongos patógenos, puesto que el valor de P es ligeramente menor al $\alpha=0,05$ de interés, esto indica que se acepta la siguiente hipótesis

alternativa; es decir, el extracto fluido de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.), presenta actividad antifúngica sobre al menos uno de los cuatro hongos patógenos causantes de la dermatomicosis.

4.8.3. Extracto blando de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente hongos dermatofitos

Tabla 31.

Medición de los halos inhibición extracto blando de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente a hongos dermatofitos

Especie	Caja	15%	7,5%	3,75%	1,87%	0,93%	0,46%
<i>Candida albicans</i>	Caja 1	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Candida albicans</i>	Caja 2	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Candida albicans</i>	Caja 3	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Candida albicans</i>	Caja 4	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Candida albicans</i>	Caja 5	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00	6,00
<i>Microsporium canis</i>	Caja 1	13,40	8,10	8,90	6,70	6,00	6,00
<i>Microsporium canis</i>	Caja 2	14,30	9,10	7,05	6,30	6,05	6,00
<i>Microsporium canis</i>	Caja 3	9,10	7,55	6,05	6,00	6,05	6,00
<i>Microsporium canis</i>	Caja 4	13,15	11,30	7,85	6,55	6,00	6,00
<i>Microsporium canis</i>	Caja 5	8,70	7,70	7,20	6,60	6,00	6,00
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Caja 1	20,25	17,70	12,45	9,80	8,35	8,20
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Caja 2	19,50	15,95	11,90	9,65	8,60	7,60
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Caja 3	21,80	17,60	13,65	10,25	8,10	8,25
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Caja 4	20,45	15,35	15,80	9,70	9,05	8,15
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Caja 5	21,35	18,55	11,45	9,35	7,95	7,90
<i>Trichophyton rubrum</i>	Caja 1	16,20	12,30	9,35	9,15	6,00	6,00
<i>Trichophyton rubrum</i>	Caja 2	15,85	12,15	13,25	10,05	6,00	6,00
<i>Trichophyton rubrum</i>	Caja 3	19,25	13,95	15,35	9,75	6,00	6,00
<i>Trichophyton rubrum</i>	Caja 4	18,63	11,70	13,55	9,05	6,00	6,00
<i>Trichophyton rubrum</i>	Caja 5	17,80	12,80	14,55	9,65	6,00	6,00

Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Tabla 32.

Análisis de varianza del extracto blando al 15%, 7.5%, 3.75%, 1.87%, 0.93% y 0.46% de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente a *Candida albicans* ATCC 10231

Análisis de varianza para una vía: Extracto blando					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	p
Tratamiento	5	0,00167	0,000003	1,00	0,4389
Error	24	0,00800	0,000003		
Total	29	0,00967			
Media general		6,0033			
Coeficiente de variación		0,30			

Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Tabla 33.

Análisis de varianza del extracto blando al 15%, 7.5%, 3.75%, 1.87%, 0.93% y 0.46% de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente a *Microsporium canis* ATCC 36299

Análisis de varianza para una vía: Extracto blando					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	P
Tratamiento	5	123,748	24,7495	14,2	0,000
Error	24	41,856	1,744		
Total	29	165,604			
Media general		7,7233			
Coeficiente de variación		17,1			

Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Tabla 34.

Análisis de varianza del extracto blando al 15%, 7.5%, 3.75%, 1.87%, 0.93% y 0.46% de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

Análisis de varianza para una vía: Extracto blando					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	p
Tratamiento	5	510,886	102,177	72,3	0,000
Error	24	33,894	1,412		
Total	29	544,78			
Media general		10,811			
Coeficiente de variación		10,99			

Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Tabla 35.

Análisis de varianza del extracto blando al 15%, 7.5%, 3.75%, 1.87%, 0.93% y 0.46% de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente a *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533

Análisis de varianza para una vía: Extracto blando					
Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F	p
Tratamiento	5	656,562	131,312	131	0,000
Error	24	24,046	1,002		
Total	29	680,608			
Media general		12,822			
Coeficiente de variación		7,81			

Nota: Elaborado por el autor, 2016.

En los Análisis de varianza para una vía del extracto blando de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente al *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporium*

canis ATCC 36299, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 se puede notar una actividad estadísticamente importante, puesto que el valor de P es menor que $\alpha=0,05$, esto indica que se acepta la siguiente hipótesis alternativa: el aceite esencial de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.), presenta actividad antifúngica sobre al menos uno de los cuatro hongos patógenos causantes de la dermatomicosis, a diferencia de lo que pasa en *Candida albicans* ATCC 10231, no se observa actividad antifúngica.

- La actividad antifúngica del Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente a *Candida albicans* ATCC 10231, donde todos los valores obtenidos que representan a P son mayores al nivel de significancia $\alpha=0.05$ en todas sus concentraciones.
- La actividad antifúngica del Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente a *Microsporum canis* ATCC 36299, donde todos los valores obtenidos que representan a P son menores al nivel de significancia $\alpha=0.05$ en todas sus concentraciones.
- La actividad antifúngica del Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 y *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 donde los valores obtenidos que representan a P son variados, en lo que respecta al aceite esencial y extracto blando los valores son menores al nivel de significancia $\alpha=0.05$, a diferencia del extracto fluido que tiene el valor de P mayor al nivel de significancia $\alpha=0.05$ para ambos.

4.8.4. Comparación de los extractos vegetales

Tabla 36.

Test de comparaciones múltiples con el mejor (Hsu)

Concentración	Medias	Límite inferior	Diferencia	Límite superior
5%	11.200	-9.027	-2.775	3.477
2,5%	9.625	-10.602	-4.350	1.902
1,25%	7.975	-12.252	-6.000	0.252
15%	13.975	-3.477	2.775*	9.027
7,5%	11.100	-9.127	-2.875	3.377
3,75%	9.925	-10.302	-4.050	2.202
1,87%	7.925	-12.302	-6.050	0.202
0,93%	6.600	-13.627	-7.375	0.000
0,46%	6.500	-13.727	-7.475	0.000
25%	9.650	-10.577	-4.325	1.927
50%	8.175	-12.052	-5.800	0.452

Nota: Elaborado por el autor, 2016.

*Concentración con mayor actividad frente a hongos patógenos

El test Hsu nos demuestra que la mejor actividad frente a las cepas fúngicas utilizadas es el extracto blando a la concentración del 15%, del mismo modo la actividad antifúngica que le continúa se trata del mismo extracto a una concentración de 7.5% y seguido por el aceite esencial a una concentración del 5% respectivamente. En base al mismo test se demostró que los tratamientos con menores resultados son del extracto blando a las concentraciones de 0,46% y 0.93%, obteniendo los resultados más bajos.

5. CONCLUSIONES

- En el presente trabajo investigativo se demuestra que el aceite esencial de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) revela actividad antifúngica debido a que en el análisis estadístico arrojó un resultado positivo al presentar un P estadístico menor al alfa de interés (0,05) en: *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 y *Microsporum canis* ATCC 36299, tres de los cuatro análisis exceptuando a *Candida albicans* ATCC 10231, dando como conclusión la aceptación de la hipótesis alternativa. En el caso del extracto blando se llegó a la conclusión de que se acepta la hipótesis alternativa; dado que la única cepa *Candida albicans* ATCC 10231 no presenta actividad antifúngica debido a que su valor p supera al alfa de interés (0,05). El extracto fluido no tuvo resultado de inhibición salvo en *Microsporum canis* ATCC 36299 que es el única cepa fúngica que se evidencio sensibilidad a sus concentraciones.
- Según el Test de (Hsu) nos permite comparar cuál es la mejor concentración de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) dando como resultado el extracto blando en una dilución de 15%, así mismo podemos señalar cuál cuenta con la menor actividad antifúngica tratándose del mismo extracto blando en su concentración más baja de 0.43%.
- En el proceso de tamizaje fitomiquimico de extracto fluido en concentraciones de 25% y 50% de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) dio como resultado positivo en los ensayos de: Catequinas, Azúcares reductores, Saponinas, Alcaloides, Triterpenos, Lactonas y Quinonas posibles responsables de la activada antimicótica.

- En lo que respecta a la extracción del aceite esencial de Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) se obtuvo un rendimiento de 0.005%, del total de material vegetal.
- Mediante el extracto fluido (25% y 50%), extracto blando (15%, 7.5%, 3.75%, 1.87%, 0.93% y 0.46%) y el aceite esencial (5%, 2.5% y 1.25%) se puede decir que el Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.) presentó actividad antifúngica frente a hongos filamentosos, pueden representar alternativas, que deberían ser probadas en la industria para poder combatir estos hongos patógenos, excepto *Candida albicans* ATCC 10231.

6. REFERENCIAS

- Guerra Corado , A. E. (2005). *Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (phlebodium pseudoaureum) a nivel de laboratorio*. GUATEMALA: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Yáñez Gonzales, L. E. (2011). *Establecimiento de protocolos de regeneración in vitro de pumamaqui oreopanax ecuadorensis mediante cultivo de tejidos*. Sangolquí: ESPE.
- Abdelnour-Esquivel, A. (1994). *Conceptos Basicos Del Cultivo de Tejidos Vegetales*. Turrialba: Catie.
- Aguilera, C., González, G., Bello, H., & Mella, S. (2010). Susceptibilidad antimicrobiana, serotipos capsulares y relación clonal entre cepas invasoras de Streptococcus pneumoniae aisladas de pacientes adultos de la Región del Bío-Bío, Chile. *Revista chilena de infectología*, 27, 393.
- Albores Velasco, M., Caballero Aroyo, Y., González Quezada, Y., & Pozas Horcasitas, R. (2006). *Grupos funcionales nomenclatura y reacciones principales*. México: Unam.
- Anderson Guarnizo , F., & Martínez Yopez, P. N. (2009). Extracción del aceite esencial de Clavos por arrastre de vapor de agua. En F. Anderson Guarnizo, *Experimentos de Química Orgánica con enfoque en ciencias de la vida* (pág. 89). Armenia - Colombia: Elizcom.
- Ansaloni, R., Wilches, I., León, F., Orellana, A., & Peñaherrera, E. (2010). Estudio Preliminar sobre Plantas Medicinales Utilizadas en Algunas Comunidades de las Provincias de Azuay, Cañar y Loja, para Afecciones del Aparato Gastrointestinal. *Revista Tecnológica ESPOL*, 90.
- ATCC® 10231™. (2016). *ATCC 10231*. American Type Culture Collection. Manassas: ATCC®.
- ATCC® 28188™. (2016). *Trichophyton rubrum ATCC 28188*. American Type Culture Collection. Manassas: ATCC®.
- ATCC® 36299™. (2016). *Microsporium canis ATCC 36299*. American Type Culture Collection. Manassas: ATCC®.
- ATCC® 9533™. (2016). *Trichophyton mentagrophytes ATCC 9533*. American Type Culture Collection. Manassas: ATCC®.
- Ballesté, R., Mousqués, N., & Gezuele, E. (Agosto de 2003). Onicomiosis. *Revista Médica del Uruguay*, 19, 95.

- Bastidas, O. (2013). *Conteo Celular con Hematocitómetro Uso Elemental del Hematocitómetro*. Celeromics.
- Beyer, H., & Walter, W. (1987). *Manual de química orgánica*. Barcelona, España: Reverte.
- Bonilla Rios, N. C., Varón, F. A., & Garzón, L. P. (2014). Extracción de pigmentos colorantes tipo flavonoides, flor del pomo (*Syzygium jambos*). zona verde del iear. florenca caquetá. *Revista Amazonia Investiga*, 36.
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., & Morse, S. (2008). *Candida albicans*. En G. Brooks, K. Carroll, J. Butel, & S. Morse, *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg* (pág. 674). México: El Manual Modernos.
- Brown, T., Lemay, E., Bursten, B., & Burdge, J. (2001). *Química la ciencia central*. México: Pearson.
- Cañedo, V., & Ames, T. (2004). Cámara de Neubauer. En V. Cañedo, *Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos* (pág. 40). Lima: Centro internacional de la papa.
- Carrillo, C. F. (29 de sep de 2011). *Criptomundo Ciencia para las masas*. Recuperado el 04 de octubre de 2016, de <https://criptomundo.wordpress.com/2011/09/27/el-crecimiento-en-medio-liquido/>
- Carrión Jara, A. V., & García Gómez, C. R. (2010). *Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia de metódica*. Cuenca: UNIVERSIDAD DE CUENCA .
- Carrion Moreno, M. J. (2006). *Reutilización del efluente del desamargado de Chocho*. Ambato: Universidad Technica De Ambato.
- Carvajal Rojas, L., Hata Uribe, Y., Sierra Martínez, N., & Rueda Niño, D. (diciembre de 2009). Análisis fitoquímico preliminar de hojas, tallos y semillas de Cupatá (*Strychnos schultesiana* KRUKOFF). *Revista Colombia Forestal*, 164-165.
- Castillo Morales, G. (2004). Conteo con cámara de Nuebauer. En G. C. Morales, *Ensayos Toxicológicos Y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones* (pág. 90). México: Centro Internacional de Investigación para el desarrollo.
- CECMED, C. p. (2001). Extractos vegetales. *Requisitos para las solicitudes de inscripción, renovación y modificación en el registro de medicamentos de origen natural de uso humano* (pág. 5). Ciudad de la Habana: CECMED.
- Cerón Martínez , C. E. (2006). Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica de los Andes Centrales*, 285-287.

- Cuamacás, S. B., & Tipaz, G. (1995). *Árboles de los bosques interandinos del norte del Ecuador*. Quito: Herbario QCNE.
- De la Torre, L. (2008). *Oreopanax ecuadorensis* seem. En L. De la Torre, H. Navarrete, & P. Muriel, *Enciclopedia plantas útiles del Ecuador* (pág. 192). Quito: Herbario QCA Universidad Católica de Quito.
- Dehesa, M. (2002). *CONTROL DE CALIDAD DE LOS FITOFÁRMACOS*. Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- Delgadillo, O., Camacho, A., Pérez, L., & Andrade, M. (2010). *Depuración de las aguas residuales por medio de humedales artificiales*. Cochabamba: Centro andino para la Gestión y uso del agua.
- Ege, S. (2000). *Química orgánica: estructura y reactividad*. Barcelona: Reverte .
- García Martos, P., Fernández del Barrio, M. T., & Paredes Salido, F. (1994). Inoculación. En P. García Martos, M. T. Fernández del Barrio, & F. Paredes Salido, *Microbiología clínica práctica* (págs. 136-137). Cádiz: Universidad de Cadiz.
- García-Rodríguez, J., & Picazo, J. (1999). Valoración de los antimicrobianos. En J. García-Rodríguez, *Compendio de microbiología médica* (pág. 63). Madrid: Harcourt.
- Griffin, R. W. (1981). *Química orgánica moderna*. Barcelona: Reverte.
- Guarnizo, A. (2008). Extracción de aceites esenciales . En A. Guarnizo, *Experimentos de Química Orgánica* (pág. 90). Armenia: Elizcom.
- Herbario de la pontificia universidad católica, E. (2015). *Certificado de Identificación Oreopanax ecuadorensis Seem*. Quito: Herbario QCA.
- Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, I. (1968). Reacción de Kedde. *Revista de investigaciones agropecuarias: Biología y producción vegetal*, 354.
- Kuklinski, C. (2000). Métodos generales de obtención de los principios activos. En C. Kuklinski, *Farmacognosia : estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural* (pág. 37). Barcelona: Omega.
- Lamarque, A., Zygodlo, J., Labuckas, D., López, L., Torres, M., & Maestri, D. (2008). Extracción por arrastre con vapor de agua. En A. Lamarque, *Fundamentos teorico-practicos de química organica* (pág. 50). Córdoba: Encuentro.
- Larrasoña, I. O. (2010). *Influencia de de temperatura y tiempo de secado en la calidad de las hojas de Cymbopogon Citratus D.C*. STAF. MINAS GERAIS: Universidade Federal de Viçosa.

- Ledesma Guachiza , G. (2010). *Evaluación de tres tratamientos pregerminativos con cuatro tipos de sustratos para la propagación de Pumamaqui*. Escuela Superior de Chimborazo. Riobamba: Escuela Superior de Chimborazo.
- León-Yáñez, S., Valencia, R., Pitman, N., Endara, L., Ulloa Ulloa, C., & Navarrete, H. (2011). *Oreopanax ecuadorense*. En S. León-Yáñez, R. Valencia, N. Pitman, L. Endara, C. Ulloa Ulloa, & H. Navarrete, *Libro rojo de las plantas endémicas del Ecuador* (pág. 192). Quito: Pontificia Universidad Católica del Ecuador.
- López Muñoz, F., & Álamo González, C. (2006). *Historia de la psicofarmacología: la revolución de la psicofarmacología sobre el descubrimiento y desarrollo de los psicofármacos*. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana.
- Maldonado Rodríguez , M. E. (2006). *Estudio químico y evaluación de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de Myrcianthes rophaloides McVaugh*. Quito: Universidad Politécnica Salesiana.
- Marcano, D., & Hasegawa, M. (2002). *Fitoquímica Organica*. Caracas, Venezuela: Universidad central de Venezuela.
- Martínez, R., & Gragera, R. (2008). *Fundamentos teóricos y prácticos de la histoquímica*. Madrid: Consejo superior de investigaciones científicas.
- Mauri, A., Llobat, M. J., & Herráez, R. (2010). *Laboratorio de análisis instrumental*. Valencia: Universida de Valencia.
- MicroBioLogics. (2011). KWIK-STIK™. *Microbiologics Retail Catalog*, 95.
- Migdalia, M. (2002). *Farmacognosia y Productos Naturales*. La Habana.
- Minga Ochoa, D. (2000). *Oreopanax*. En D. Minga Ochoa, *Árboles y arbustos del Bosque de Mazan* (pág. 77). Cuenta: ETAPA.
- Miñana , M., & Goncalvez, E. (2011). *Aplicaciones cosméticas y farmacéuticas de los surfactantes*. Univerisidad de los Andes, Laboratorio FIRP. Merida: Escual de Ingeniería Química.
- Montes-Belmont, R., Cruz-Cruz, V., Martínez-Martínez, G., & Sandoval-García, G. (2000). *Propiedades Antifúngicas en Plantas Superiores. Análisis Retrospectivo de Investigaciones*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 18(2), 128.
- Monzote Fidalgo, L., Sariego Ramos, I., Montalvo Álvarez, A., & Garrido Lorente, N. (2004). *Propiedades antiprotozoarias de aceites esenciales extraídos de plantas cubanas*. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 231.

- Naranjo, J. d. (2009). Evaluación fitoquímica de extractos naturales de *Eucalyptus citriodora* y *Pinus caribaea* con actividad biocida. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 447.
- NTE INEN 0154. (1987). NTE INEN 0154. *Tamices de ensayo. Dimensiones nominales de las aberturas*, 3. Quito, Pichincha, Ecuador: Inen.
- NTE INEN 14. (1984). NTE INEN 14. *Leche. Determinación de sólidos totales y cenizas*, 2. Quito, Pichincha, Ecuador.
- NTE INEN 2150. (1999). NTE INEN 2150. *Solventes. Determinación de la densidad relativa*, 2. Quito, Pichincha, Ecuador: INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.
- NTE INEN 42. (1973). NTE INEN 42. *Aceites y grasas comestibles, determinación del índice de refracción*, 2. Quito, Pichincha, Ecuador: INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.
- NTE INEN 973. (1984). NTE INEN 973. *Agua potable. Determinación del pH*, 2. Quito, Pichincha, Ecuador: INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN.
- Ocampo, R., Ríos, L. A., Betancur, L. A., & Ocampo, D. M. (2008). *Curso práctico de química orgánica. Enfocado a biología y alimentos*. Caldas : Universidad de Caldas.
- Ojeda Ojeda, C. B. (2010). *Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares tumorales humanas, para la valoración citotóxica in vitro de extractos vegetales y metabolitos secundarios, mediante el ensayo de tinción con violeta cristal*. Loja: UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA.
- Ormeño, A., & Candela, J. (2012). Características Clínicas y Epidemiológicas de la Candidiasis Nosocomial del Torrente sanguíneo en el Instituto Nacional de Salud del Niño. *Revista Peruana de Pediatría*, 59.
- Oxford University Press. (2003). *Diccionario de Química*. Madrid, España: Complutense.
- Palacios, W. (2011). *Árboles del Ecuador*. Ecuador: Ministerio del Ambiente.
- Passerini de Rossi, B., García, C., Alcaraz, E., & Franco, M. (2014). *Stenotrophomonas maltophilia* interfiere via the DSF-mediated quorum sensing system with *Candida albicans* filamentation and its planktonic and biofilm modes of growth. *Revista Argentina de Microbiología*, 46(4), 290.
- Payo, A., Oquendo, M., & Oviedo, R. (1996). Tamizaje fitoquímico preliminar de plantas que crecen en Holguín. *Revista Cubana de Farmacia*, 30(2), 120.
- Prats, G. (2005). Las micosis cutáneas mucosas. En G. Prats, *Microbiología clínica* (pág. 87). Buenos Aires: Panamericana.

- Primo Yúfera, E. (1995). *Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria* (Vol. 2). Valencia: Reverte.
- Remington Gennaro, A. (2003). *Farmacología*. Buenos Aires, Argentina: Panamericana.
- Rios, M., De La Cruz, R., & Mora, A. (2008). *Conocimiento Tradicional Y Plantas Útiles Del Ecuador: Saberes Y Prácticas*. Quito, Pichincha, Ecuador: Abya Yala.
- Rivas-Morales, C., Oranday-Cárdenas, M. A., & Verde-Star, M. J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. Nuevo León: Omniascience.
- Rodolfo López, F. (2010). ESTANDARIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN DE DISCO DE HOJA EN LA INDUCCIÓN DE. *Revista de Investigación Universidad de Quindío*, 121.
- Rodríguez Cavallini, E., Gamboa Coronado, M., & Hernández, F. (2005). Pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos PSA. En E. Rodríguez Cavallini, *Bacteriología General: Principios Y Prácticas de Laboratorio* (pág. 339). Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- Rojas, J. J., García, A. M., & López, A. J. (Marzo de 2005). Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. *Revista Blacpma*, 4(2), 28-29.
- Romero Marquez, M. D. (2004). *Plantas Aromáticas*. Buenos Aires: Kier.
- Romo, A. (2006). *Química de la Flora Mexicana* (1era ed.). Mexico, México: Unam.
- Ruiz-Reyes, E., & Suarez, M. (2015). Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 46(1), 10.
- Ryan, K. J., & Ray, G. (2008). *Sherris Microbiología médica; Una introducción a las enfermedades infecciosas* (4ta edición ed.). México: Mc Gran Hill.
- Sadzawka R., A. (2007). *Métodos de análisis de tejidos vegetales*. Santiago de Chile: Ministerio de agricultura Instituto de investigaciones Agropecuarias INIA.
- SantaCruz Cifuentes, L. A. (2011). *Análisis químico de antocianinas en frutos silvestres colombianos*. Bogotá: UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA.
- Santos Guerreros, G., & Reateguá Lozano, R. (2012). La diversidad Biológica en Cajamarca: Visión étnico cultural y potencialidades. En G. Santos Guerreros, & R. Reateguá Lozano, *la Diversidad Biológica* (Primera edición ed., pág. 129). Cajamarca, Perú: Universidad Nacional de Cajamarca.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Colombia: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.

- Stanier, R., Ingraham, J., Wheelis, M., & Painter, P. (1996). Medición del Cremiento. En R. Stanier, *Microbiología* (pág. 199). Barcelona: Reverte.
- Toribio, M., Oriani, D., Fernández, J., Toso, R., & Tortone, C. (2007). Estudio de la actividad antimicrobiana de cuatro especies del género *Baccharis*. *Ciencia veterinaria*, 46.
- Toro, D. R. (2005). *Manual para la introducción al laboratorio de microbiología*. Manizales - Colombia: Universidad de Caldas.
- Vilata Corell, J. J. (2005). *Micosis cutáneas*. Buenos Aires: Medica panamericana.
- Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., y otros. (2006). Diagnóstico microbiológico Texto y Atlas en color. En Koneman, *Diagnóstico microbiológico Texto y Atlas en color* (págs. 1138-1168). México: Panamericana.
- Yáñez, P. (2010). Análisis de Varianza. En P. Yáñez, *Biometría y bioestadística fundamentales* (pág. 58). Quito: Patricio Yáñez.

7. ANEXOS

Anexo 1.

Secado del material vegetal



Nota: Elaborado por el autor, 2016

Anexo 2.

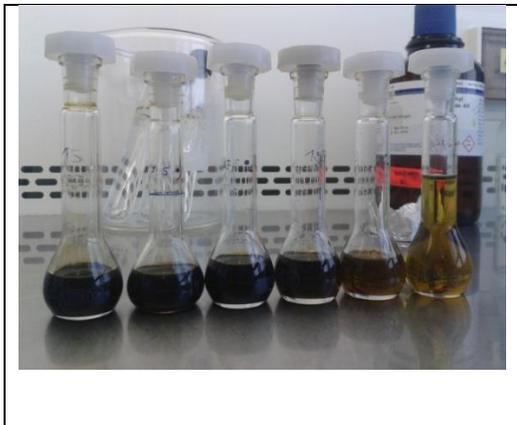
Percolación del material vegetal



Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Anexo 3.

Diluciones del extracto blando



Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Anexo 4.

Tamizaje fitoquímico

ENSAYO CATEQUINAS



ENSAYO RESINAS



ENSAYO FEHLING



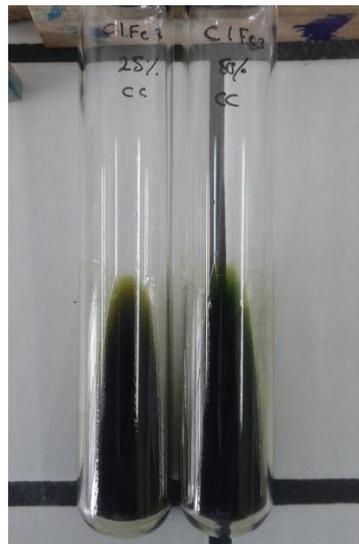
ENSAYO BALJET



ENSAYO ESPUMA



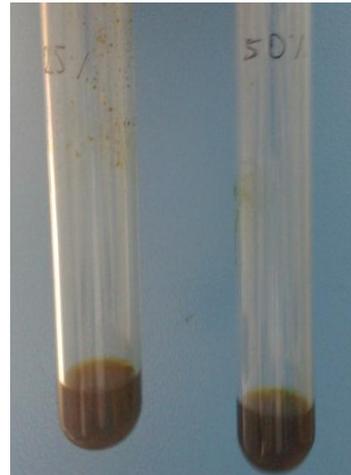
ENSAYO CLORURO FERRICO



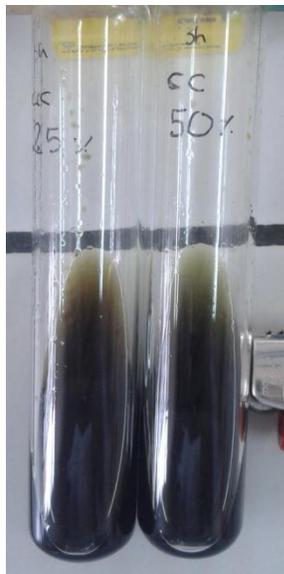
ENSAYO NINHIDRINA



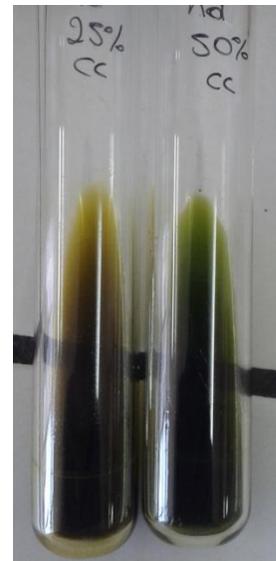
ENSAYO BORNTRAGER



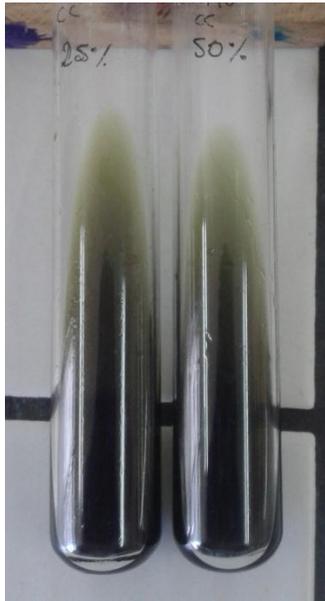
ENSAYO SHINODA



ENSAYO KEDDE



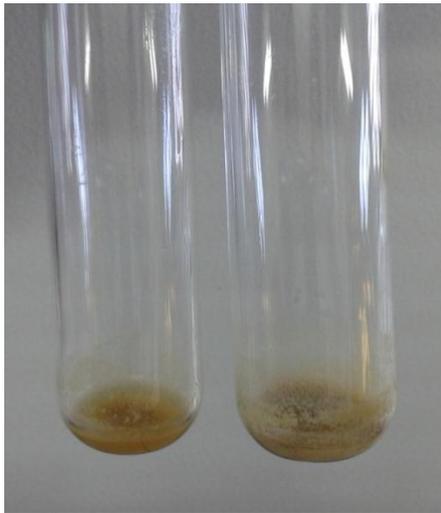
ENSAYO ANTOCIANIDINA



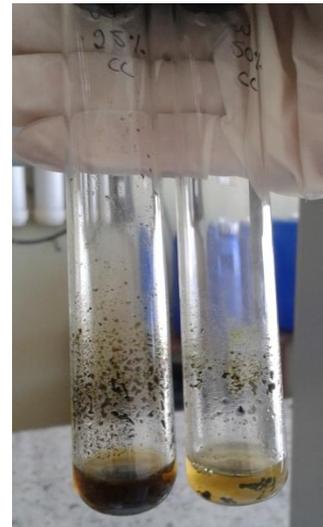
ENSAYO DRAGENDORFF



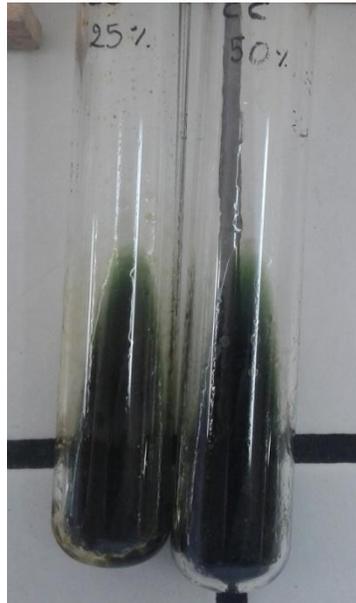
ENSAYO MAYER



ENSAYO WAGNER



ENSAYO LIEBERMAN-BUCHARD



Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Anexo 5.

Destilación de aceite esencial Pumamqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman)



Destilador del laboratorio de la Universidad Politécnica Salesiana



Destilador del laboratorio de operaciones unitarias de la Universidad Politécnica Nacional

Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Anexo 6.

Recolección del material vegetal



Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Anexo 7.

Certificado de identificación Pumamaqui (*Oreopanax ecuadorensis* Seeman.)

Quito, 14 de Septiembre del 2015

CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN

El espécimen examinado corresponden a:

Oreopanax ecuadorensis Seem.

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Asteranae Takht.
- Orden: Apiales Nakai
- Familia: Araliaceae Juss.
- Género: *Oreopanax* Decne. & Planch.
- especie: *ecuadorensis* Seem.
- Nombre común: puma maqui



Álvaro J. Pérez

Curador de Angiospermas, Herbario QCA

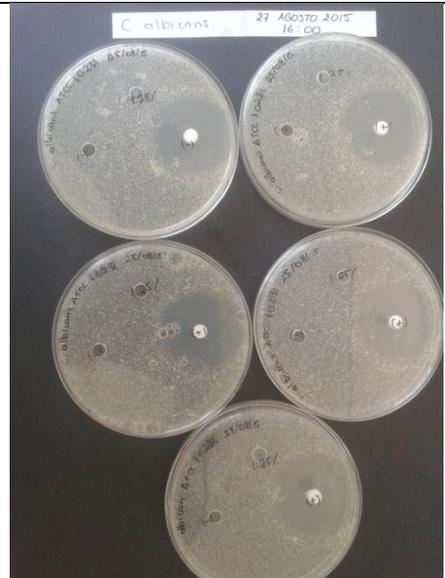
Nota: Herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador

Anexo 8.

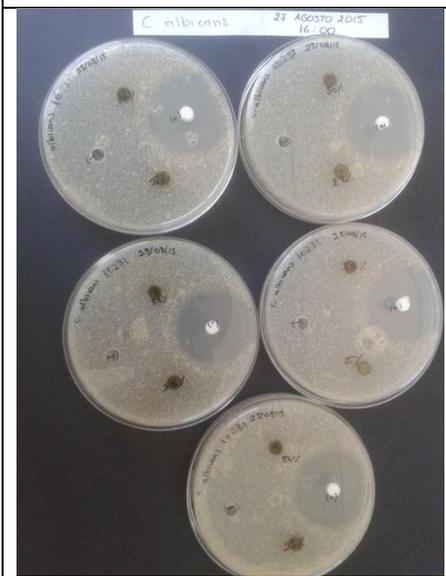
Halos de inhibición frente a *Candida albicans* ATCC 10231



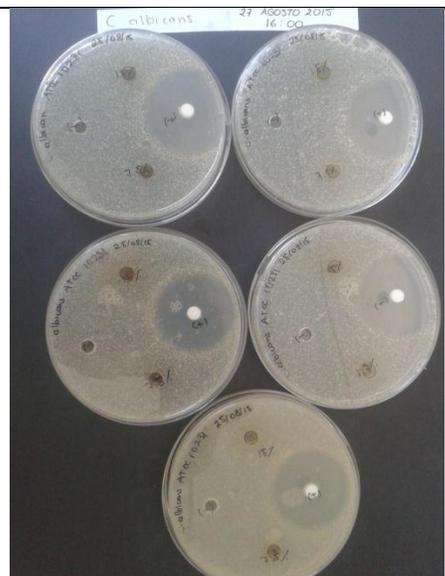
Aceite esencial al 5% 2.5%



Aceite esencial al 1.25%



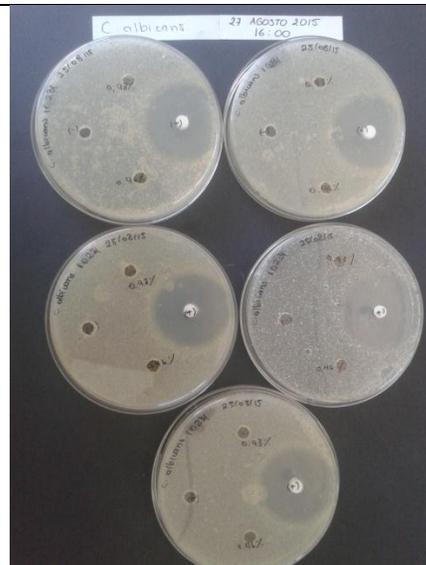
Extracto fluido al 25% y 50%



Extracto blando al 15% y 7.5%



Extracto blando al 3.75% y 1.87%



Extracto blando al 0.93% y 0.46%

Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Anexo 9.

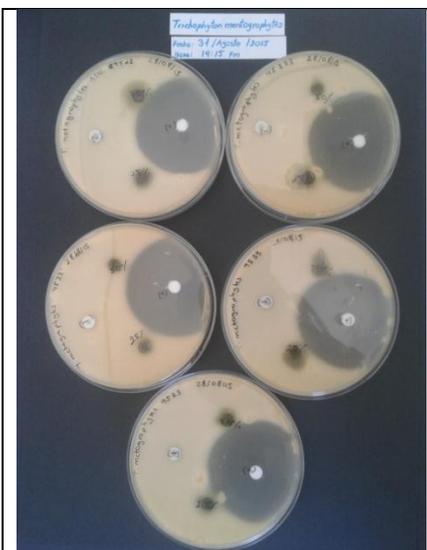
Halos de inhibición frente a *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533



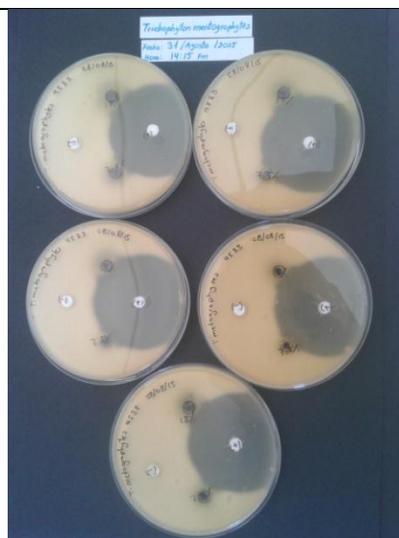
Aceite esencial al 5% 2.5%



Aceite esencial al 1.25%



Extracto fluido al 25% y 50%



Extracto blando al 15% y 7.5%



Extracto blando al 3.75% y 1.87%

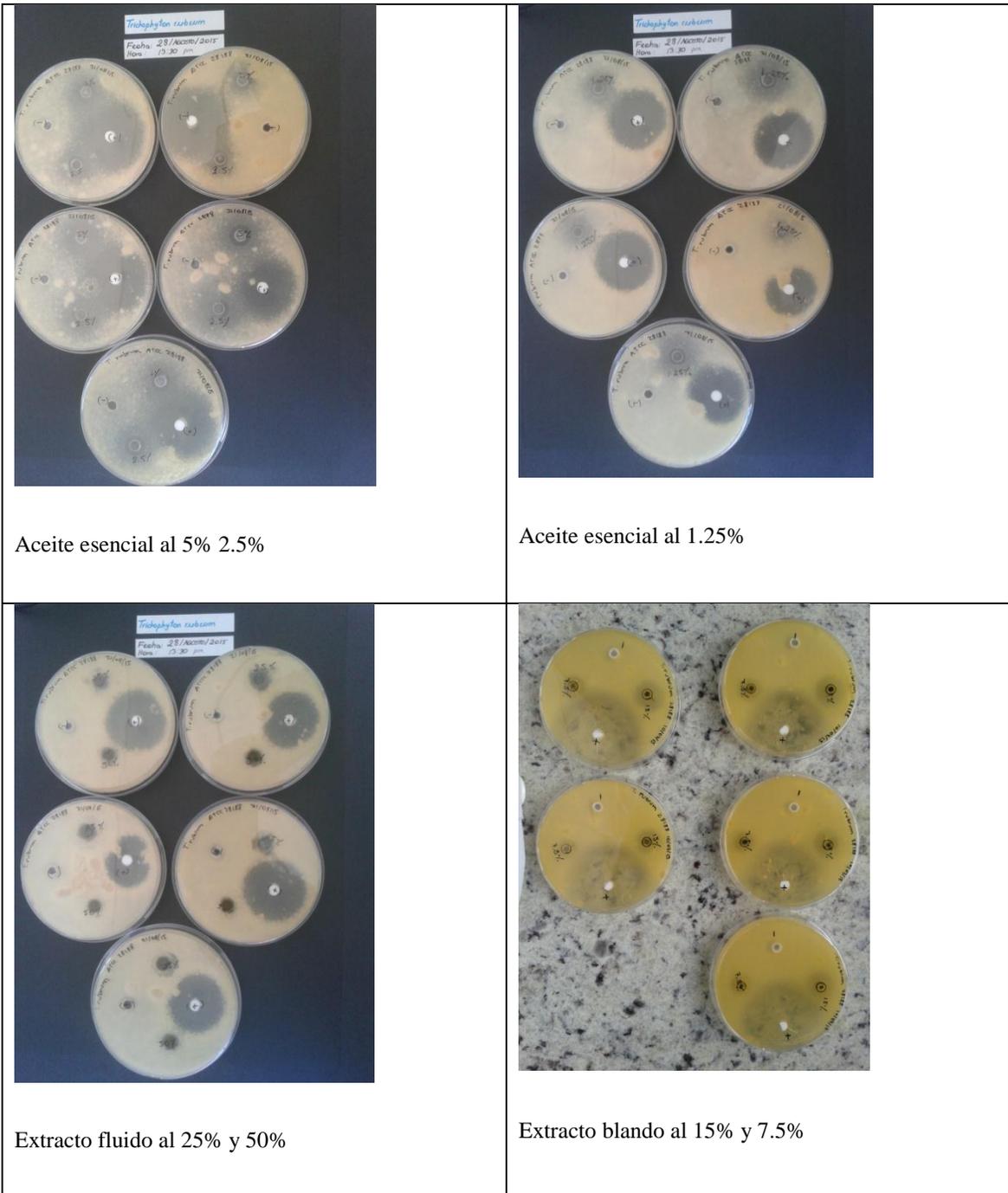


Extracto blando al 0.93% y 0.46%

Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Anexo 10.

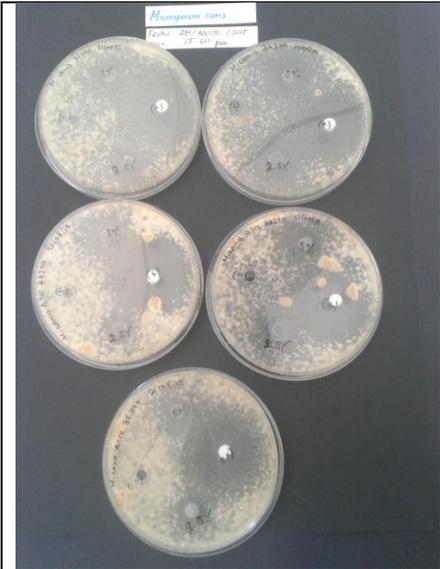
Halos de inhibición frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188



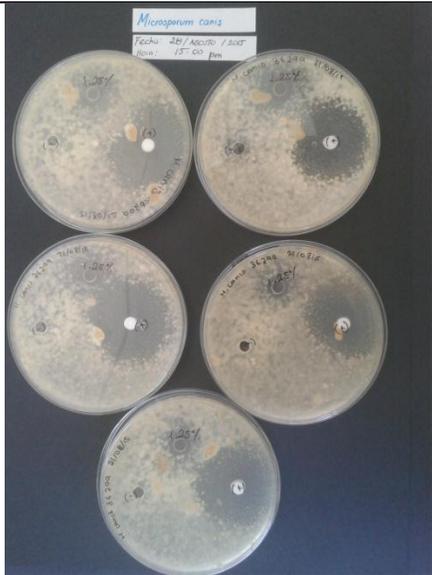
Nota: Elaborado por el autor, 2016.

Anexo 11.

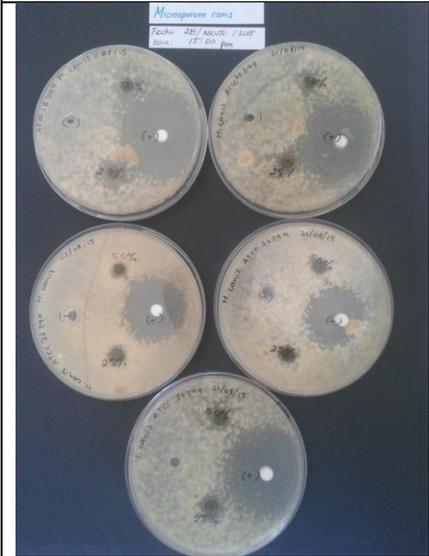
Halos de inhibición frente a *Microsporium canis* ATCC 36299



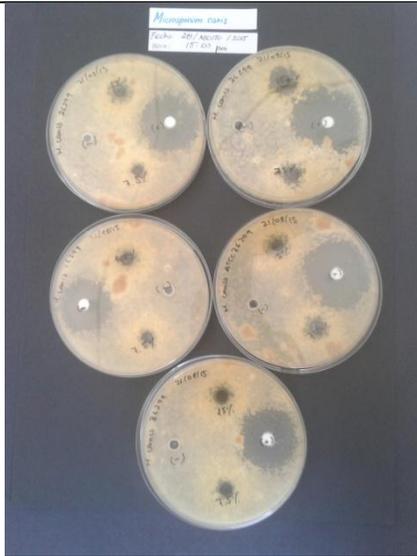
Aceite esencial al 5% 2.5%



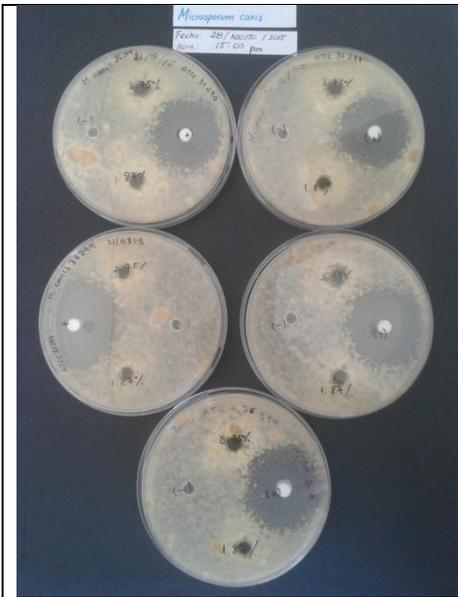
Aceite esencial al 1.25%



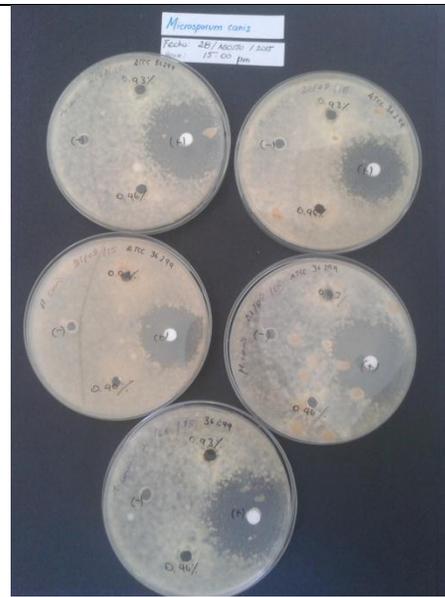
Extracto fluido al 25% y 50%



Extracto blando al 15% y 7.5%



Extracto blando al 3.75% y 1.87%



Extracto blando al 0.93% y 0.46%

Nota: Elaborado por el autor, 2016.