

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE QUITO

CARRERA:

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de: INGENIERAS EN
BIOTECNOLOGÍA DE LOS RECURSOS NATURALES

TEMA:

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DEL MARCO
(*Ambrosia arborescens* Mill.) Y MATICO (*Aristeguietia glutinosa* Lam.) SOBRE
HONGOS PATÓGENOS CAUSANTES DE LA DERMATOMICOSIS

AUTORAS:

SANDRA ELIZABETH AYALA VALAREZO
TATIANA ALEXANDRA VÁSQUEZ VILLARREAL

DIRECTORA:

TATIANA DE LOS ANGELES MOSQUERA TAYUPANTA

Quito, noviembre del 2014

DECLARATORIA DE RESPONSABILIDAD Y AUTORIZACIÓN DE USO DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotras, autorizamos a la Universidad Politécnica Salesiana la publicación total o parcial de este trabajo de titulación y su reproducción sin fines de lucro.

Además, declaramos que los conceptos y análisis desarrollados y las conclusiones del presente trabajo son de exclusiva responsabilidad de las autoras

Quito, noviembre del 2014

Sandra Elizabeth Ayala Valarezo
CC: 1718408543

Tatiana Alexandra Vásquez Villarreal
CC: 1719346270

DEDICATORIA

“El esfuerzo solo proporciona plenamente su recompensa, después de que una persona se niega a darse por vencida.”

Napoleón Hill

A mi Madre Alicia por toda su constancia, sacrificio, dedicación y entrega en nuestro hogar, por demostrarme su amor en cada forma posible y hacer de mí una mejor persona.

A mi Padre Carlos por su soporte y ayuda a lo largo de mi vida, por darme fuerza y valor para seguir siempre adelante.

A mi Hermana Cristina por ser mi mejor amiga, mi confidente , enseñarme a ser fuerte y luchar con devoción por mis objetivos, por motivarme y darme la mano en cada escenario y faceta de mi vida, por nunca dejar de creer en mí.

A mi Sammy por ser una luz pura y brillante, que ilumina por completo mi corazón y mi alma.

A Daniel por convertirse en un miembro importante de mi familia, por su apoyo, por el amor, cuidado y protección a mi hermana y mi sobrina.

A mis abuelitos por todo su amor y resguardo

A la Familia Vásquez Villarreal por siempre recibirme con los brazos abiertos y una sonrisa, por el apoyo brindado a lo largo de este trabajo.

Sandra Elizabeth Ayala Valarezo

Con todo mi amor para mi madre Cristina, que ha sido madre y padre a la vez, que ha hecho todo lo que estaba a su alcance para formarme, motivarme e inculcarme que la única forma de alcanzar mis sueños es luchando por ellos.

A mi hermana que es un pilar fundamental en cada paso que doy, porque es el motor que me inspira a ser mejor.

A mi familia, a todas las personas que estuvieron y ya no están, pero sobre todo a Tefy, Byron y Susy que siempre estuvieron listos para brindarme toda su ayuda, ahora me queda devolverles un poquito de todo lo que me han dado.

Por eso y mucho más dedico cada página de esta tesis a Uds.

Tatiana A. Vásquez Villarreal

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Politécnica Salesiana, la Carrera de Ingeniería en Biotecnología de los Recursos Naturales y a los docentes que la conforman, que han transitado nuestra vida estudiantil, transmitiendo sus saberes sin recelo, ni sordidez.

A nuestra profesora y amiga MSc. Tatiana Mosquera tutora de esta tesis por su dirección tiempo, conocimientos, experiencia, ayuda y motivación ofrecida a lo largo de la investigación.

Al Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad por brindar un lugar de trabajo adecuado, así como a los Ingenieros Carina Hidalgo, Marco Ibarra, Edison Osorio, Erika Paredes por su disposición, sugerencias y apertura a resolver nuestras dudas.

A PhD. María Elena Maldonado por brindarnos sus opiniones académicas para la realización y formulación del tema aquí presentado.

A PhD. Valentina Venturi por el tiempo invertido en la lectura y revisión de este trabajo.

A Consuelo Chasiqiza por su valiosa colaboración en la recolección del material vegetal y ayuda desinteresada al comunicar sus conocimientos en el uso de las especies de estudio.

A PhD. Román Rodríguez docente de la Universidad Técnica de Ambato por su tiempo y pericia en la obtención de principios activos con altos estándares de calidad.

Sandra y Taty

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1. Planteamiento del problema.....	3
1.2. Justificación	3
1.3. Hipótesis	6
1.3.1. Hipótesis nula.....	6
1.3.2. Hipótesis alternativa.....	6
1.4. Objetivos	6
1.4.1. Objetivo General	6
1.4.2. Objetivos Específicos	7
1.5. Variables	7
1.5.1. Variables independientes.....	7
1.5.2. Variables dependientes.....	7
1.6. Indicadores	7
1.7. Población y muestra.....	8
CAPÍTULO 2	9
MARCO TEÓRICO.....	9
2.1. Etnobotánica del Ecuador	9
2.1.1. Etnobotánica de la Región Andina.....	9
2.1.1.1. Planta Medicinal.....	10
2.1.1.2. Droga vegetal	10
2.2. <i>Ambrosia arborescens</i> Mill. (Marco).....	10
2.2.1. Taxonomía.....	10
2.2.2. Descripción botánica.....	11
2.2.3. Uso etnomédicos	11
2.2.4. Composición química	12
2.2.5. Propiedad antibacterial y antifúngica.....	12
2.2.6. Toxicidad.....	12

2.3. <i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam. (Matico).....	13
2.3.1. Taxonomía.....	13
2.3.2. Descripción botánica.....	13
2.3.3. Usos etnomédicos	14
2.3.4. Composición química	14
2.3.5. Propiedad antibacterial y antifúngica.....	14
2.3.6. Toxicidad.....	15
2.4. Principio Activo	15
2.4.1. Aceite esencial	15
2.4.2. Extracto	15
2.4.2.1. Tipos de extractos	15
2.4.3. Métodos extractivos a partir de la droga.....	16
2.4.3.1. Maceración.....	16
2.4.3.2. Destilación por arrastre de vapor	17
2.5. Dermatomicosis.....	18
2.5.1. Definición.....	18
2.5.2. Enfermedades causadas por dermatófitos	18
2.5.3. Hongos patógenos	21
2.5.3.1. Trichophyton	21
2.5.3.1.1. <i>Trichophyton rubrum</i>	22
2.5.3.1.2. <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	22
2.5.3.2. Microsporum.....	22
2.5.3.2.1. <i>Microsporum canis</i>	23
2.5.3.3. Candida	23
2.5.3.3.1. <i>Candida albicans</i>	23
2.5.4. Tratamiento	24
2.6. Actividad antifúngica.....	25
2.6.1. Antifúngico	25
2.6.2. Pruebas de sensibilidad de antifúngicos.....	25
2.6.2.1. Método de Barry	25
2.6.2.2. Método de Kirby-Bauer	26

2.6.2.3. Método modificado de Kirby-Bauer	26
2.6.2.4. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	27
CAPÍTULO 3	28
MARCO METODOLÓGICO	28
3.1. Lugar de investigación	28
3.2. Lugar de recolección	28
3.3. Desinfección, limpieza y secado del material vegetal	29
3.4. Obtención del extracto blando de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill. (Marco)	30
3.4.1. Proceso de maceración	30
3.4.2. Control de calidad	31
3.4.2.1. Características organolépticas o percepción	31
3.4.2.2. Densidad relativa: Método Gravimétrico.....	31
3.4.2.3. Sólidos Totales.....	33
3.4.2.4. Determinación de pH	34
3.5. Obtención del aceite esencial de <i>Aristeguietia glutinosa</i>	34
3.5.1. Proceso arrastre de vapor	34
3.5.2. Control de calidad	35
3.5.2.1. Características organolépticas o percepción	36
3.5.2.2. Densidad relativa: Método Gravimétrico.....	36
3.5.2.3. Índice de refracción.....	37
3.5.2.4. Determinación de pH	37
3.6. Evaluación de la actividad antifúngica de <i>Ambrosia arborescens</i> (Marco) y <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico)	38
3.6.1. Viabilización de las cepas	38
3.6.2. Preparación inóculo	39
3.6.2.1. Cámara de Neubauer: <i>Trichopyton rubrum</i> , <i>Trychopyton mentagrophytes</i> , <i>Microsporium canis</i>	39
3.6.2.2. Turbidimetría: <i>Candida albicans</i>	41
3.6.3. Preparación de las concentraciones	42
3.6.3.1. Extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> (Marco).....	42
3.6.3.2. Aceite esencial de <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico)	43

3.6.4. Métodos de siembra	44
3.6.4.1. Siembra en placa por homogenización en masa <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Microsporium canis</i>	44
3.6.4.2. Siembra en placa por estriado <i>Candida albicans</i>	44
3.6.5. Método modificado de Kirby-Bauer	45
3.6.5.1. Método modificado por difusión en pozo de agar	45
3.7. Análisis estadístico.....	46
3.7.1. Modelo Anova de una vía	46
3.7.2. Modelo Anova de dos vías	47
3.7.3. Porcentaje de inhibición relativa	49
CAPÍTULO 4	50
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
4.1.1. Rendimiento del Extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> (Marco) mediante el método de maceración.....	50
4.1.2. Rendimiento del Aceite esencial de <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico) mediante el método de arrastre por vapor.....	50
4.2. Control de Calidad	51
4.2.1. Extracto de <i>Ambrosia Arborescens</i> (Marco).....	51
4.2.1.1. Determinación organoléptica	51
4.2.1.2. Parámetros físicos	51
4.2.1.2.1. Densidad relativa	51
4.2.1.2.2. Sólidos totales.....	52
4.2.1.3. Determinación química.....	53
4.2.1.3.1. pH	53
4.2.2. Aceite esencial de <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico)	53
4.2.2.1. Determinación organoléptica	53
4.2.2.2. Determinación física	53
4.2.2.2.1. Densidad relativa	54
4.2.2.2.2. Índice de refracción	54
4.2.2.3. Determinación química.....	55
4.2.2.3.1. pH	55
4.3. Evaluación de la actividad antifúngica	55

4.3.1. Extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> (Marco)	57
4.3.2. Aceite esencial de <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico)	59
4.4. Análisis Estadístico	61
4.4.1. Extracto de <i>Ambrosia arborescens</i>	61
4.4.1.1. Análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía)	61
4.4.1.2. Análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías)	64
4.4.1.3. Porcentaje de inhibición relativa de <i>Ambrosia arborescens</i>	67
4.4.2. Aceite esencial de <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico)	70
4.4.2.1. Análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía)	70
4.4.2.2. Análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías)	75
4.4.2.3. Aceite esencial de <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico)	78
CONCLUSIONES	80
RECOMENDACIONES	82
LISTA DE REFERENCIAS	83
ANEXOS	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Infecciones por dermatófitos- enfermedades clínicas y etiologías comunes	19
Tabla 2. Infecciones por <i>Candida</i> - enfermedades clínicas y etiologías comunes	21
Tabla 3. Características de los cultivos de dermatófitos	24
Tabla 4. Datos Geomorfológicos	28
Tabla 5. Parámetros del Control de Calidad del extracto <i>Ambrosia arborescens</i>	31
Tabla 6. Parámetros del Control de Calidad del AE de <i>Aristeguietia glutinosa</i>	36
Tabla 7. Composición del Medio de Cultivo Sabouraud Dextrosa Agar (SDA)	39
Tabla 8. Consideraciones del análisis del ANOVA de una vía	46
Tabla 9. Consideraciones del análisis del ANOVA de dos vías o dos factores	48
Tabla 10. Rendimiento del extracto <i>Ambrosia arborescens</i>	50
Tabla 11. Rendimiento del AE de <i>Aristeguietia glutinosa</i>	50
Tabla 12. Características organolépticas de extracto de <i>Ambrosia arborescens</i>	51
Tabla 13. Densidad relativa de extracto de <i>Ambrosia arborescens</i>	52
Tabla 14. Sólidos totales de extracto de <i>Ambrosia arborescens</i>	52
Tabla 15. pH de extracto de <i>Ambrosia arborescens</i>	53
Tabla 16. Características organolépticas de AE <i>Aristeguietia glutinosa</i>	53
Tabla 17. Densidad relativa de AE <i>Aristeguietia glutinosa</i>	54
Tabla 18. Índice de refracción de AE <i>Aristeguietia glutinosa</i>	54
Tabla 19. pH de AE <i>Aristeguietia glutinosa</i>	55
Tabla 20. Concentraciones del extracto <i>Ambrosia arborescens</i>	56
Tabla 21. Concentraciones del AE <i>Aristeguietia glutinosa</i>	56
Tabla 22. Promedio de diámetro de halos de inhibición del extracto <i>Ambrosia arborescens</i>	57

Tabla 23.Promedios de diámetro de halos de inhibición del AE <i>Aristeguietia glutinosa</i>	59
Tabla 24.Porcentaje de inhibición relativa del extracto de <i>Ambrosia Arborescens</i> frente al Clotrimazol	68
Tabla 25.Porcentaje de inhibición relativa del AE de <i>Aristeguietia glutinosa</i> frente al Clotrimazol.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparación de los halos de inhibición (mm) y concentración (ppm) de extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill	58
Figura 2. Comparación de los halos de inhibición y comparación de AE de <i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam.....	60
Figura 3. Análisis de varianza ANOVA de una vía del extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> (Marco) frente a <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533.....	61
Figura 4. Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> (Marco) y halos de inhibición de <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	61
Figura 5. Análisis de varianza ANOVA de una vía del extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> (Marco) frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.....	62
Figura 6. Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> (Marco) y halos de inhibición de <i>Trichophyton rubrum</i>	62
Figura 7. Análisis de varianza ANOVA de una vía del extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> (Marco) frente a <i>Microsporium canis</i> ATCC 36299	62
Figura 8. Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> (Marco) y halos de inhibición de <i>Microsporium canis</i>	63
Figura 9. Análisis de varianza ANOVA de una vía del extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> (Marco) frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	63
Figura 10. Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> (Marco) y halos de inhibición de <i>Candida albicans</i>	63
Figura 11. Análisis de varianza ANOVA de dos vías del extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> (Marco) frente a <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533, <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188, <i>Microsporium canis</i> ATCC 36299, <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	65
Figura 12. Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> (Marco) y halos de inhibición.....	66
Figura 13. Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533, <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188, <i>Microsporium canis</i> ATCC 36299, <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 y halos de inhibición del extracto.....	66

Figura 14. Relación de los halos de inhibición y concentración del extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill.....	67
Figura 15. Porcentaje de inhibición relativa del extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> frente al control positivo, Clz.....	69
Figura 16. Análisis de varianza ANOVA de una vía del aceite esencial de <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico) frente a <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533	70
Figura 17. Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del aceite esencial de <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico) y halos de inhibición de <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	70
Figura 18. Análisis de varianza ANOVA de una vía del aceite esencial de <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico) frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.....	71
Figura 19. Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del aceite esencial de <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico) y halos de inhibición de <i>Trichophyton rubrum</i>	71
Figura 20. Análisis de varianza ANOVA de una vía del aceite esencial de <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico) frente a <i>Microsporum canis</i> ATCC 36299	72
Figura 21. Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del aceite esencial de <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico) y halos de inhibición de <i>Microsporum canis</i>	72
Figura 22. Análisis de varianza ANOVA de una vía del aceite esencial de <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico) frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	73
Figura 23. Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del aceite esencial de <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico) y halos de inhibición de <i>Candida albicans</i>	73
Figura 24. Análisis de varianza ANOVA de dos vías del AE de <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico) frente a <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533, <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188, <i>Microsporum canis</i> ATCC 36299, <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	75
Figura 25. Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del AE de <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico) y halos de inhibición	76
Figura 26. Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533, <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188, <i>Microsporum canis</i> ATCC 36299, <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 y los halos de inhibición del AE	76

Figura 27. Relación de los halos de inhibición y concentración de AE de <i>Aristeguietia glutinosa</i> Lam.....	77
Figura 28. Porcentaje de inhibición relativa del AE <i>Aristeguietia glutinosa</i> frente al control positivo, Clz.....	79

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Porcentaje del rendimiento del extracto	30
Ecuación 2. Densidad relativa del extracto <i>Ambrosia arborescens</i>	32
Ecuación 3. Sólidos totales del extracto <i>Ambrosia arborescens</i>	33
Ecuación 4. Porcentaje del rendimiento del aceite esencial.....	34
Ecuación 5. Densidad relativa del AE <i>Aristeguietia glutinosa</i>	36
Ecuación 6. Número de esporas por ml	40
Ecuación 7. Número total de esporas	41
Ecuación 8. Concentracion del extracto en partes por millón.....	43
Ecuación 9. Dilución del extracto	43
Ecuación 10. Porcentaje de inhibición relativa	49

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.Recolección del material vegetal.....	91
Anexo 2.Certificado del Herbario Nacional de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill. (Marco)	92
Anexo 3.Certificado del Herbario Nacional de <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico)	93
Anexo 4.Proceso de desinfección, limpieza y secado del material vegetal	94
Anexo 5.Extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> Mill (Marco).....	95
Anexo 6.Aceite esencial de <i>Aristeguietia glutinosa</i> (Matico)	95
Anexo 7.Certificado de Análisis de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533.....	96
Anexo 8.Certificado de Análisis de <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188	97
Anexo 9.Certificado de Análisis de <i>Microsporum canis</i> ATCC 36299.....	98
Anexo 10.Certificado de Análisis de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231	99
Anexo 11.Ficha técnica/ datos de seguridad del Polisorbato 80 (Tween 80)	101
Anexo 12.Ficha técnica de Dimethyl Sulfoxide ACS reagent 99.9% (DMSO)	108
Anexo 13.Ficha técnica del Clotrimazol 1% tubo 20 g	109
Anexo 14.Certificado de análisis de Clotrimazol 1% tubo de 20g	111
Anexo 15.Diámetros de halos de inhibición (mm) del Extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> , blanco positivo (Clz +), blanco negativo (DMSO -) sobre <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Microsporum canis</i> , <i>Candida albicans</i>	112
Anexo 16.Diámetros de halos de inhibición (mm) del AE de <i>Aristeguietia glutinosa</i> , blanco positivo (Clz +), blanco negativo (DMSO -) sobre <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Microsporum canis</i> , <i>Candida albicans</i>	113
Anexo 17.Valores Críticos de la Distribución F para un Nivel de Significancia=0,05	114
Anexo 18.Fotografías de Halos de Inhibición del extracto de <i>Ambrosia arborescens</i> (Marco) a 300 y 400 ppm y clotrimazol frente a <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 28188.....	115

Anexo 19. Fotografías de Halos de Inhibición del AE de *Aristeguietia glutinosa*
(Matico) a 2; 2,5; 3% y clotrimazol frente a *Trichophyton mentagrophytes* ATCC
28188..... 116

RESUMEN

La tendencia marcada hacia lo natural, y el uso etnomedicinal presente en el Ecuador, permite el estudio de especies que puedan ser usadas a nivel terapéutico y aunque el conocimiento empírico es valioso no es suficiente; es indispensable validar la presencia de sustancias químicas que tengan actividad antifúngica, antibacterial, antiviral, etc. con menor riesgo patológico que un producto sintético convencional.

La investigación plantea la evaluación de la actividad antifúngica del extracto de *Ambrosia arborescens* Mill. (Marco) y aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* Lam. (Matico) sobre dermatófitos, así como una comparación con un compuesto químico de amplio espectro, Clotrimazol.

Se trabajó con siete concentraciones (100 a 700 ppm) de extracto de *Ambrosia arborescens* Mill. y diez concentraciones (0,5 a 5%) de Aceite esencial (AE) de *Aristeguietia glutinosa* Lam. sobre *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* y *Candida albicans*, utilizando como parámetros de comparación al dimetilsulfóxido (DMSO) como blanco negativo y Clotrimazol como blanco positivo, considerado para determinar el porcentaje de inhibición relativa.

El extracto de *Ambrosia arborescens* Mill. y el AE de *Aristeguietia glutinosa* Lam. en cada una de las concentraciones genera actividad antifúngica. El extracto a concentraciones de 400 y 300 ppm y en el AE a 2; 2,5 y 3% muestra un promedio homogéneo de halos de inhibición sobre todos los dermatófitos. Los porcentajes de inhibición relativa evaluados sobrepasan el 60 % para el extracto y el 30 % para el aceite; así como, los mayores porcentajes se observa sobre *Microsporum canis* sobrepasando el 100% estipulado por el clotrimazol, tanto en aceite como en extracto.

La actividad antifúngica generada por las especies de estudio frente al clotrimazol valida los resultados obtenidos, y se establece que el extracto de *Ambrosia arborescens* Mill. puede ser utilizado en formulaciones para tratar la dermatomicosis, así como, el AE de *Aristeguietia glutinosa* Lam.

Palabras clave: *Ambrosia Arborescens*, *Aristeguietia glutinosa*, aceite esencial, extracto, antifúngico, dermatomicosis.

ABSTRACT

The strong trend toward natural, and the current ethnomedicinal practice in Ecuador, allows the study of species that can be used therapeutically, although empirical knowledge is priceless, is not enough, it's essential to validate the presence of chemical substances which have antifungal, antibacterial, antiviral activity, with less pathological risk than conventional synthetic products.

The investigation presents the evaluation of the antifungal activity of *Ambrosia arborescens* Mill (Marco) extract and *Aristeguietia glutinosa* Lam. (Matico) essential oil on dermatophytes, and also a comparison with a full-scale antifungal, Clotrimazole.

Seven concentrations (100-700 ppm) of *Ambrosia arborescens* Mill extract and ten concentrations (0.5 to 5%) of *Aristeguietia glutinosa* Lam. EO, were evaluated over *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis* and *Candida albicans*, it has been used Dimethylsulfoxide (DMSO) as the negative target and Clotrimazole as the positive target, as the comparison parameters, also clotrimazole was considered to establish the relative percentage of inhibition.

Ambrosia arborescens Mill. extract and *Aristeguietia glutinosa* Lam. EO, in every concentrations produces antifungal activity. The extract at 400 and 300 ppm and the EO at 2; 2.5 and 3% exhibit a homogeneous average inhibition zones on all dermatophytes studied. 60% inhibition percentage has shown for the extract and 30% for essential oil; and *Microsporum canis* overtook 100% inhibition percentage stipulated by clotrimazole, both oil and extract.

The antifungal activity generated by these species versus clotrimazole study validates the results, and provides that *Ambrosia arborescens* Mill. extract can be used in formulations to treat dermatomycosis as the same way *Aristeguietia glutinosa* Lam. essential oil.

Keywords: *Ambrosia arborescens*, *Aristeguietia glutinosa*, essential oil, extract, antifungal, dermatomycosis.

INTRODUCCIÓN

En el Ecuador, dada su alta biodiversidad, a numerosas plantas se les ha otorgado la categoría de “medicinales”, siendo parte del patrimonio natural inmaterial, por lo que se plantea aprovechar el saber ancestral en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, el conocimiento actual de las plantas medicinales tiene dos objetivos fundamentales, una vez validado su valor terapéutico, el primero radica en descubrir la estructura molecular de los principios activos, el segundo es sentar bases científicas para el empleo directo de las plantas por parte de grandes sectores de la población (Chiriboga, 2010).

Así como se ha descubierto el valor alimenticio de ciertos productos vegetales a lo largo de los años, el hombre también ha ido descubriendo el valor curativo o analgésico de muchas plantas, la extinción de las plantas y la pérdida del saber cultural pone en riesgo nuevas aplicaciones aun no desarrolladas por la ciencia moderna, que puedan ser válidas, seguras y eficaces (Naranjo, P., 2010).

Las drogas de síntesis ofrecen indiscutibles ventajas, sin embargo se ha descubierto que se puede producir efectos indeseables y hasta graves, esto ha motivado el retorno al estudio de los vegetales en el intento de encontrar drogas naturales de mejor valor terapéutico y menor riesgo patológico y aunque el conocimiento empírico es valioso no es suficientemente confiable, es necesaria la confirmación científica (Chiriboga, 2010).

Una vez confirmado el valor terapéutico de las drogas vegetales, se plantea la necesidad de estimular su uso y la explotación racional de las plantas medicinales cultivables, beneficiando de esta manera tanto al sector agrícola como a la población en general ofreciendo alternativas naturales que permitan cuidar su salud y bienestar.

De esta manera se incentiva a investigadores, docentes y estudiantes, el estudio de los agentes terapéuticos de recursos vegetales que justifique o descarte la validez de la actividad de sus compuestos, por esta razón se propone la investigación del Marco (*Ambrosia arborescens*) y Matico (*Aristeguietia glutinosa*) como agentes inhibidores de hongos patógenos.

Ambrosia arborescens conocido comúnmente como “Marco”, es una planta muy difundida en el callejón interandino, ya que ha sido utilizado por varios años en la medicina popular de nuestro país (Naranjo, B., 2010).

Aristeguietia glutinosa conocido como “Matico”, es una especie nativa y endémica del Ecuador.

Las especies de estudio permitirán evaluar la actividad antifúngica sobre hongos patógenos causantes de la dermatomicosis, los mismos que ocasionan varias enfermedades con alta incidencia, no solo en nuestro país, sino en varios.

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

1.1. Planteamiento del problema

Ecuador cuenta con una alta gama de plantas que no han sido estudiadas y que son usadas por los grupos étnicos, la sustentación científica de las actividades terapéuticas enfoca el camino hacia el aprovechamiento racional y sustentable de los recursos vegetales y los saberes ancestrales.

El aumento latente del consumo de productos a base de principios activos obtenidos de plantas y la poca inversión para investigación y desarrollo por parte de las principales industrias evita que se realicen estudios de ingredientes naturales para ser incorporados en formulaciones en reemplazo de las sustancias químicas.

1.2. Justificación

Ecuador tiene un 10% de todas las especies de plantas que hay en el planeta. De este porcentaje, la mayor cantidad crece en la cordillera de los Andes, en la zona noroccidental, donde se calcula que hay aproximadamente 10 mil especies (Embajada de la República de Ecuador en China, 2012).

La herbolaria ecuatoriana y latinoamericana han realizado importantes contribuciones al desarrollo de la medicina científica y por ende a la salud humana, puesto que en nuestro país existen alrededor de 35000 especies que tienen interés médico y potencial terapéutico para elaboración de nuevos productos; cerca del 30 % de la población ecuatoriana esta desprotegida de medicina, por esta razón la Asamblea Mundial de Salud recomendó aprovechar lo positivo y beneficioso de la medicina tradicional (Naranjo, 2010).

Ecuador cuenta con 62 empresas relacionadas con varias etapas de la industrialización de las plantas medicinales en la región andina, de los cuales 42% se concentra en la

producción de medicamentos a base de plantas, el otro 42% en la agricultura, la recolección y procesamiento, el resto de las empresas se dedican a producción de cosméticos o especias (Gupta, 2006).

Las plantas han sido identificadas para tratar varias enfermedades que han afectado a las poblaciones desde la antigüedad, entre las que se destacan alergias, dolores, infecciones y enfermedades cutáneas. Las lesiones de la piel más estudiadas están relacionadas con diferentes formas de dermatitis, alergias de la piel, acné e infecciones bacterianas de la piel; varias de las plantas medicinales, aceites esenciales o extractos naturales obtenidos de las mismas presentan relación con dichas enfermedades ya que poseen actividad curativa sobre estas patologías (Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales, 2008).

Los hongos productores de micosis superficiales son oportunistas, siendo mayormente susceptibles: los pacientes diabéticos, pacientes con SIDA, pacientes con cáncer o cualquier otra afección debilitante o crónica. A nivel mundial, se indica una prevalencia de 5% a 10% de micosis por *Cándida* en los servicios de dermatología. Otras especies aisladas con mayor frecuencia son tinea corporis y tinea capitis, los siguientes hongos: *Microsporum canis* (9%), *Trichophyton mentagrophytes* (8,8%), *Trichophyton. rubrum* (8,6%). En nuestro país las infecciones dérmicas no es un tema tratado con todo el interés que este lo requiere, es así que dichas infecciones han proliferado rápidamente apareciendo entonces cuadros graves de dermatomicosis en diabéticos (Villares, 2012).

El autor Merck realizó un estudio en el cual se evidenció la incidencia de infecciones por dermatófitos en pacientes diabéticos, el resultado del estudio demuestra una mayor prevalencia de tinea pedis en pacientes diabéticos frente a quienes no lo son (Merck, 2005).

El medicamento más utilizado para lesiones es Clotrimazol (compuesto derivado de la familia de los imidazoles) comúnmente usado para el tratamiento de infecciones por

levaduras, candidiasis oral, y dermatofitosis (tiña). También se utiliza para tratar el pie de atleta y tinea corporis (FDA, 2011). Es un agente antifúngico de amplio espectro. *In vitro* el Clotrimazol exhibe actividad fungistática y fungicida contra especies aisladas de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* y *Microsporum canis* (Laboratorios Sanitas, 2012).

Entre los efectos secundarios del uso de este medicamento están: el eritema, picazón, ampollas, peladuras, edema, prurito, urticaria y en general irritación de la piel; sensación de quemadura, irritación, sequedad, picazón, foliculitis, erupciones acneiformes, hipopigmentación, dermatitis perioral, dermatitis de contacto alérgica, maceración de la piel, infección secundaria, atrofia de la piel, estrías y miliria. No se recomienda su aplicación durante el embarazo, por lo que lo que se busca es dar una alternativa para evitar estas lesiones (Laboratorios Sanitas, 2012).

No se ha probado su efectividad y seguridad en niños menores de 12 años de edad (OMS, 1999).

Afortunadamente en los últimos años ha resurgido el interés por el regreso a la naturaleza, por lo tanto es necesario construir una nueva relación con nuestro ambiente, llevando una vida menos artificial y recurriendo a las plantas no sólo para incluirlas en nuestra alimentación sino también para aliviar nuestras afecciones, con un mayor interés por los productos naturales, orgánicos y ecológicos (Hernández & Galli, 2011). Las propiedades antimicrobianas o antifúngicas de plantas medicinales pueden ser aprovechadas para tratar afecciones de la piel como tinea, pie de atleta, candidiasis, entre otras.

Ambrosia arborescens (Marco) y *Aristeguietia glutinosa* (Matico) pertenecen a la familia de las Asteraceae, que se caracterizan por ser plantas aromáticas, con propiedades medicinales. Marco es una especie muy difundida entre los pobladores de nuestra región para mitigar dolores de cabeza y migraña, reumatismos, baños vaginales, fiebre, estreñimiento, desórdenes de próstata, fracturas y lesiones (Vera, 2008); dentro de la agricultura utilizada como control biológico de plagas, relacionado a la protección

o defensa respecto ataques de microorganismo e insectos (Naranjo,B., 2010). Mientras que *Aristeguietia glutinosa* (Matico) es una especie nativa del callejón interandino y se encuentra solamente en el Ecuador, se le atribuye propiedades antiinflamatorias, expectorantes, antitusígena, cicatrizante, desinfectante, además es utilizada como emoliente y protector de la piel (Varela, 2011).

Estas dos especies reportan varios estudios sobre su actividad, entre ellas: “Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae” (Zapata, Duran, Stashenko, Betancur-Galvis & Mesa, 2010), “Eficacia antibacteriana *in vitro* de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill.) y Paico (*Chenopodium ambrosioides* L.) en una formulación cosmética (Ibarra & Paredes, 2013). Estudios que constituyen la base de la presente investigación, la misma que se enfoca en probar la actividad antifúngica sobre algunos de los más importantes hongos patógenos causantes de dermatomicosis.

1.3.Hipótesis

1.3.1. Hipótesis nula

El aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam.), no presenta actividad antifúngica

El extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill.), no presenta actividad antifúngica.

1.3.2. Hipótesis alternativa

El aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam.), presenta actividad antifúngica

El extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill.), presenta actividad antifúngica.

1.4.Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del Marco (*Ambrosia arborescens* Mill.) y Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam.) sobre hongos patógenos causantes de la dermatomicosis

1.4.2. Objetivos específicos

- Extraer el aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam.) mediante destilación a vapor.
- Obtener extracto blando de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill.) mediante un proceso de maceración.
- Determinar la actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam.) frente a los hongos dermatófitos *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299, *Candida albicans* ATCC 10231.
- Determinar la actividad antifúngica *in vitro* del extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill.) frente a los hongos dermatófitos *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299, *Candida albicans* ATCC 10231.

1.5. Variables

1.5.1. Variables independientes

- Concentración de aceite esencial de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam.)
- Concentración de extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill.)

1.5.2. Variables dependientes

- Especies de Hongos
- Halos de inhibición

1.6. Indicadores

- Factores físicos: Temperatura en °C, tiempo de incubación en horas, volumen del medio de cultivo en mililitros.
- Factores químicos: pH, volumen de disolventes en mililitros.
- Factores biológicos: diámetros de halos de inhibición en milímetros.

1.7.Población y muestra

De toda la población fúngica, en lo que respecta al grupo de hongos, por normativa internacional y en función de la incidencia de enfermedades cutáneas (Villares, 2012) el análisis *in vitro* se realizará sobre los siguientes microorganismos: *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Candida albicans*.

CAPÍTULO 2

MARCO TEÓRICO

2.1. Etnobotánica del Ecuador

La etnobotánica es una disciplina científica que hace énfasis tanto en el área botánica como en lo social, porque estudia la denominación, percepción y ordenación que reciben las plantas desde el punto de vista de las personas que las usan para alimentación, medicina, vestuario, herramientas, ritos, venenos, artesanías, armas y construcción de viviendas, entre otros múltiples empleos (Ríos, Kosiol, Borgtoft & Granda, 2007).

En el Ecuador la aplicación de esta disciplina científica permite distinguir, rescatar y valorizar el uso de las plantas empleadas por los diversos grupos humanos que habitan en la Costa, Sierra y Amazonía, diferenciando a cada uno por su propio sistema de aprovechamiento de las especies vegetales en los sitios donde están sus asentamientos (Ríos, Kosiol, Borgtoft & Granda, 2007).

Hay por lo menos un 30% de la población ecuatoriana totalmente desprotegida de medicamentos, que atiende sus problemas de salud mediante la medicina tradicional. Por esta y otras razones, la Asamblea Mundial de la Salud recomendó a los países miembros, lejos de condenar a la medicina tradicional, aprovechar lo que tenga de positivo y beneficioso y utilizarla sobre todo a favor de las poblaciones que no gozan de otro sistema de protección y promoción de su salud (Naranjo, P., 2010).

2.1.1. Etnobotánica de la región andina

A inicios del siglo XX, algunos clérigos botánicos como el padre Luis Azodiro y Luis Mille realizaron gran cantidad de colecciones y contribuyeron al conocimiento de la flora útil de la región andina, en un afán de documentación científica. Algunas de las

investigaciones en la sierra se han llevado a cabo ante el hecho de que es la región más deforestada del Ecuador, donde persiste menos del 3 % de la vegetación original (De la Torre, Navarrete, Muriel, Macía & Balslev, 2008).

2.1.1.1. Planta medicinal

Cualquier vegetal que contenga en uno de sus órganos, alguna sustancia con actividad farmacológica que se pueda utilizar con fines terapéuticos o que se pueda emplear como prototipo para obtener nuevos fármacos por síntesis o síntesis parcial (Osorio, 2009).

2.1.1.2. Droga vegetal

Planta medicinal, entera o cualquiera de sus partes, fragmentados o trozados, frescos o secos, así como gomas y resinas no tratadas, que se emplean puras o mezcladas en la elaboración de medicamentos fitoterápicos, que estén definidos por la parte vegetal usada, el nombre científico de la especie botánica (Torfe, Sylvestre, Morante & Mendoza, 2009).

2.2. *Ambrosia arborescens* Mill. (Marco)

2.2.1. Taxonomía

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Ambrosia*

Especie: *Ambrosia arborescens* Mill.

Sinónimo: *Franseria artemisioides* Willd.

Nombres Comunes: Marco, Marku, Markhu, Altamisa, Mano de marco,

Marku Yura

Hábito: Subarbusto, arbusto o arbolito

Origen: Nativa

Etnias: Kichwa de la sierra, Mestiza

2.2.2. Descripción botánica

Subarbusto de 0,5-3,0 m de altura, olor aromático. Hojas alternas de 10-20 cm de longitud por 7-18 cm de ancho, margen sectado, haz-glabrascente, envés densamente albescente; peciolo de 2-3 cm de largo. Inflorescencia de 15-30 cm de longitud en panícula, verde rojiza, capítulos unisexuales, monoicos. Capítulos verde amarillentos con flores tubulares. Capítulos masculinos pequeños dispuestos en los ápices de los ramos, los femeninos dispuestos en las axilas de las hojas superiores. Flores masculinas con gineceo rudimentar, flores femeninas con estilos divididos. (Gupta, 1995).

Es nativa de la Cordillera de América del Sur y crece entre los 2.500 y 3.000 metros sobre el nivel de mar (m.s.n.m.). Crece en toda la región interandina del Ecuador, sobre todo en la región central y norte (Naranjo, P., 2010).

2.2.3. Uso etnomédicos

- Medicinal.- Las hojas se usan para propiciar la labor de parto y aliviar los dolores en el parto y postparto, se emplean en bebida, emplastos para aumentar el flujo menstrual, dolor de hígado, evitan la formación de lesiones internas producidas por golpes, llagas ulcerosas, verrugas, regular presión arterial y combate la formación de abscesos. La planta macerada se usa como: antimicótico, anestésico, para sarampión tratar granos, sarpullidos, caries, hemorroides y sarna, en Ecuador se le atribuyen efectos emenagogos, así como antisépticos y antiparasitarios intestinales.
- Tóxico para otros microorganismos.- Las hojas y ramas se usan como insecticidas, para eliminar principalmente pulgas, piojos, moscos y chinches.
- Ambiente.- La planta se aprovecha en sistemas agroforestales, como cerca viva (De la Torre, Navarrete, Muriel, Macía & Balslev, 2008).

2.2.4. Composición química

Contiene una variedad de monoterpenos en pequeñas cantidades incluso trazas, representando en este grupo un monoterpeno oxigenado la crisantenona (20,9%), se han identificado cinco lactonas sesquiterpénicas, en las hojas: la damsina, coronofilina, dihidrocoronofilina, psilostaquina y la psilostaquina C (Vera, 2008), altos contenidos de sesquiterpenos, destacándose el germacreno D (18,7%) y γ -curcumeno, en las semillas se han encontrado la damsina y la corofilina, el aceite esencial es rico en monoterpenos y sesquiterpenos oxigenados y algunos hidrocarburos sesquiterpénicos (Gupta, 1995).

Los compuestos más abundantes son: el isoborneol, δ -curcumeno, la δ -cadineno, el carotol y el δ -farneseno, contiene alcaloides encontrados principalmente en las flores femeninas. Extractos muestran la presencia de 3-careno, limoneno, p-cimeno, cariofileno, aloaromadendrano, humuleno, isoborneol, cariofileno-epóxido (Naranjo, B., 2010).

2.2.5. Propiedad antibacterial y antifúngica

El Marco presenta acción bactericida frente a *Staphylococcus aureus* y sobre *Candida albicans* y más hongos de tipo patógeno gracias a la presencia de flavonoides y fenoles y sus derivados mencionados anteriormente (Naranjo, B., 2010). La marcha fitoquímica y cromatográfica de extracto de *Ambrosia arborescens* fue evaluada por Alvarado, 2007 demostrando la presencia de antraquinonas, azúcares reductores, flavonoides, lactonas sesquiterpénicas, taninos, alcaloides, aminoácidos libres.

In vitro se ha encontrado que sus compuestos poseen actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Micrococcus oxford* (Gupta, 1995), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus epidermidis* (Ibarra & Paredes, 2013).

Villagomez y otros, en el 2013 demuestran el efecto múltiple anticancerígeno de damsina y coronofilina obtenidos de la especie de interés.

2.2.6. Toxicidad

La presencia de sesquiterpenos y monoterpenos en el aceite esencial manifiesta el poder tóxico que posee esta especie, contribuyendo a esta actividad la presencia de otros monoterpenos como tuyonas (Vera, 2008). La actividad alelopática puede estar

simultáneamente relacionada con funciones de protección o defensa de las plantas contra ataques de microorganismos e insectos (Naranjo, B., 2010).

La tuyona es letal por su elevada toxicidad. Exámenes toxicológicos han encontrado que la dosis letal media en ratones es de 45 mg de sustancias por kilogramo de peso, menos de 30 mg no causa muerte, pero por encima de los 60 mg es mortal en el 100%, siendo tóxica para el hígado y el cerebro en caso de sobredosis (Bravo, 2014).

2.3. *Aristeguietia glutinosa* Lam. (Matico)

2.3.1. Taxonomía

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: *Aristeguietia*

Especie: *Aristeguietia glutinosa* Lam.

Sinónimo: *Eupatorium glutinosum* Lam.

Nombres Comunes: Matico, matico silvestre, hierba de soldado, chusa lunku, migla

Hábito: Arbusto o arbolito

Origen: Endémica, Nativa

Etnias: Kichwa de la sierra, Mestiza

2.3.2. Descripción botánica

Arbusto de 1,0-3,0 m de altura, ramas grises. Hojas opuestas, 7-10cm de longitud por 2,5-3,5 cm de ancho, base cordada, ápice agudo, margen dentado, haz verrucosa, glabra y brillante, envés tomentoso albescente. Capítulos de 10-15cm de longitud por 12cm de ancho, brácteas café oscuras, flores tubulares, de color fucsia oscuro.

Crece en la región interandina del Ecuador, al borde de caminos entre los matorrales y en antiguas plantaciones, entre los 3000 y 3800 m.s.n.m. (Gupta, 1995).

2.3.3. Usos etnomédicos

- Medicinal.- infusión de hojas se usa para tratar afecciones renales, inflamaciones, heridas, fracturas, mal de orina, dolor de hígado, dolencias reumáticas, úlceras, golpes, dolor de estómago, lavados vaginales, diarreas.
- Las hojas maceradas o en emplasto son usadas para tratar heridas de la piel, granos, sarna, como cicatrizante y desinfectante, contra la gonorrea (De la Torre, Navarrete, Muriel, Macía & Balslev, 2008), se le atribuye efecto antiséptico (Gupta, 1995).

2.3.4. Composición química

El componente activo más importante del matico es el tanino condensado de tipo catéquico o proantocianidina que se encuentra en una concentración del 5.7%, al cual se le atribuye las propiedades cicatrizantes. También contiene cumarinas, flavonoides (especialmente medicinales), esteroides, alcaloides, saponinas y fenoles (Buestan & Guaraca, 2013).

De las hojas se han aislado varios compuestos triterpénicos como el friedeniol, la friedelina, δ -amirenona y acetato dammaradienilo y también algunos diterpénicos.

En la parte volátil se han encontrado parafinas de C_{18} a C_{29} , esterés metílicos de ácidos grasos, y sesquiterpenos: γ .gurjuneno, trans- β -farneseno, β -bisaboleno y el β -sesquifelandreno (Gupta, 1995).

2.3.5. Propiedad antibacterial y antifúngica

Los estudios de laboratorio realizados, han confirmado la acción cicatrizante, antiinflamatoria, antiséptica del matico e inhibitoria de las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y los hongos *Cryptococcus neoformans* (Buestan & Guaraca, 2013). En ensayos *in vitro* se ha encontrado que la planta tiene actividad antibacteriana contra gram-positivos (Gupta, 1995). La investigación de Varela, 2011 sobre el fraccionamiento bioguiado de extracto hidro-etanólico de esta especie y la elución estructural de los principios activos anti-*Trypanosoma cruzi*, demostró la presencia de diterpenos tipo copalanos, Yáñez & Velasteguí, 2014 en la Investigación de la actividad antimicrobiana y fitoquímica de extracto de plantas medicinales frente a los microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans* determinan la presencia de actividad antimicrobiana a concentraciones de 5000 ppm.

2.3.6. Toxicidad

Aunque no se conoce con exactitud la biotoxicidad de esta planta, la etnomedicina lo considera como una de las plantas con propiedades medicinales, que no produce efectos secundarios (Reynaud, 2003). Al ser el tanino o proantocianidina su mayor componente se ha confirmado que llega a ser tóxico por ingesta en un 6% del peso corporal. (Valle & Florentino, 2000)

2.4. Principio activo

Son los ingredientes de los productos naturales procesados de uso medicinal que tienen actividad terapéutica, en caso de casos que no se puedan identificar los principios activos, se puede considerar que todo el recurso natural de uso medicinal es un sólo principio activo (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2006).

2.4.1. Aceite esencial

Son productos volátiles o etéreos (Sharapin, 2000) de naturaleza compleja, elaborados por ciertos vegetales a los que confieren un aroma agradable que se pueden obtener por arrastre de vapor o por expresión del pericarpio de ciertos frutos (Bruneton, 2001).

Pueden encontrarse hidrocarburos alicíclicos y aromáticos, así como sus derivados oxigenados; alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, sustancias azufradas y nitrogenadas, etc. Los compuestos más frecuentes derivan biogénicamente del ácido mevalónico; se los cataloga como monoterpenoides (C₁₀) y sesquiterpenoides (C₁₅) (Domínguez, 1973).

2.4.2. Extracto

Son concentrados obtenidos por tratamientos de productos vegetales con solventes apropiados, constituidos por una mezcla de principios activos y sustancias inertes que se producen de la totalidad o de partes de una planta fresca o seca y que se incorporan al solvente (Lizcano & Vergara, 2008).

2.4.2.1. Tipos de extractos

- Extracto fluido.- La concentración de principio activo es similar a la concentración de principio activo en la droga original. Los extractos fluidos se alteran fácilmente

en contacto con la luz y el aire. Tienen consistencia líquida y se obtienen generalmente por maceración o percolación. Son muy utilizados para obtener formas líquidas ya que se manipulan y dosifican con facilidad.

- Extracto blando.- La concentración de principio activo es superior a la de la droga original y tiene consistencia semisólida. . El solvente suele ser agua o mezclas hidroalcohólicas
- Extracto seco.- Se obtienen por evaporación total del solvente y tienen una consistencia de polvo Presenta una concentración muy superior de principio activo que la droga original. Son preparados bastante estables y de fácil manipulación.
- Crioextractos.-Se obtienen de la droga fresca congelada y se extraen los principios activos mediante nitrógeno líquido, y se añade alcohol etílico, los crioextractos resultan muy caros pero son muy útiles para la obtención de proteínas y enzimas de ciertas especies. (Osorio, 2009)

2.4.3. Métodos extractivos a partir de la droga

A partir de la droga se realiza un proceso extractivo para aislar los principios activos directamente a partir de la droga, entre los que se destacan: extracción, destilación, extracción con gases y extracción continua y discontinua con disolventes. Los métodos utilizados para esta investigación son dos:

2.4.3.1. Maceración

El proceso consiste en poner en contacto la droga seca triturada con el disolvente, utilizando (agua o solventes polares) en proporción 1:10 (p/v) para la extracción a temperatura ambiente que oscila entre los 15-20°C, manteniendo todo en agitación durante 7 a 14 días dependiendo el tipo de extracto requerido, a continuación se decanta el conjunto, obteniéndose por una parte el extracto y por otra un residuo, para mejorar el rendimiento se vuelve a realizar otra maceración con el residuo (Kuklinski, 2000).

Con el fin de concentrar la muestra esta es sometida a rotoevaporación a presión reducida y a una temperatura de 60°C hasta obtener un volumen del concentrado (Yáñez & Velasteguí, 2014).

Cuando la droga se pone en contacto por el solvente tiende a reconstituir el estado original de la célula, penetra en la célula y expelen el aire contenido en el citoplasma, dando así un proceso extractivo, las sustancias extraíbles se adhieren a las moléculas del solvente y posteriormente se da la difusión de la solución fuera de la célula vegetal. El hinchamiento de la droga es un factor importante ya que aumenta la permeabilidad de la parte celular y la difusión del disolvente. La velocidad con que se obtiene el equilibrio está en función del tamaño de partícula de la droga molida, del grado de hinchamiento de las células y de las propiedades del solvente (Sharapin, 2000).

2.4.3.2. Destilación por arrastre de vapor

Es llamado comúnmente: destilación por arrastre de vapor, extracción por arrastre, hidrodestilación, hidrodifusión o hidroextracción. Sin embargo no existe un nombre claro y conciso para definirlo, debido a que se desconoce exactamente lo que sucede en el interior del equipo principal y porque se usan diferentes condiciones del vapor de agua para el proceso. Es así que, cuando se usa vapor saturado o sobrecalentado, fuera del equipo principal, es llamado “destilación por arrastre de vapor”. La materia prima vegetal es cargada en un hidrodestilador, de manera que forme un lecho fijo compactado. Su estado puede ser molido, cortado, entero o la combinación de éstos. Conforme el vapor entra en contacto con el lecho, la materia prima se calienta y va liberando el aceite esencial contenido y éste, a su vez, debido a su alta volatilidad se va evaporando. Al ser soluble en el vapor circundante, es “arrastrado”, corriente arriba hacia el tope del hidrodestilador. La mezcla, vapor saturado y aceite esencial, fluye hacia un condensador, En este, la mezcla es condensada y enfriada, hasta temperatura ambiente. A la salida del condensador, se obtiene una emulsión líquida inestable. La cual, es separada en un decantador dinámico, este equipo está lleno de agua fría al inicio de la operación y el aceite esencial se va acumulando, debido a su casi inmiscibilidad en el agua y a la diferencia de densidad y viscosidad con el agua. Posee un ramal lateral, por el cual, el agua es desplazada para favorecer la acumulación del aceite. (Günther, 1948).

Los usos de los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación son muy amplios, aunque básicamente están orientados a la perfumería; la cosmética; la

industria farmacéutica, como aditivo e insumo para sintetizar compuestos; la alimentaria, como aditivo y como insumo para la fabricación de productos de higiene personal y de limpieza doméstica (Cerpa, 2007).

2.5. Dermatomicosis

2.5.1. Definición

Las dermatomicosis se definen como infecciones producidas por hongos parásitos que afectan a la piel y anejos cutáneos. La mayoría de los hongos que desarrollan dermatomicosis suelen ser saprofitos del individuo, lo que significa que conviven con el ser humano sin causar ninguna enfermedad. En determinadas condiciones pueden comportarse como patógenos, con lo que producen una infección en tejidos ricos en queratina, como piel y sus anejos: pelo y uñas, así como las membranas mucosas (Lozano, 2006).

2.5.2. Enfermedades causadas por dermatófitos

Los dermatófitos son un grupo de hongos muy similares, que se relacionan tan íntimamente causando una variedad muy amplia de cuadros clínicos. La originan diversas especies de hongos: *Epidermophyton*, *Trichophyton* y *Microsporum*, todos hongos filamentosos afines a tejidos ricos en queratina, las mismas que pueden ser imitadas por *Candida albicans* o por los organismos dermatomicóticos (Rippon, 1990).

Tabla 1.

Infecciones por dermatófitos- enfermedades clínicas y etiologías comunes

Trastornos Clínicos	Dermatófitos involucrado	Síntomas	Zona afectada
Tinea capitis	<i>Microsporum sp.</i> <i>Trichopyton sp.</i>	Inflamación, producción de lesión escamosa eritematosa, alopecia permanente, producción de erupciones ulcerativas, formación de queloides y costras	Cuero cabelludo, cejas y pestañas
Tinea corporis	<i>Trichophyton rubrum,</i> <i>Trichophyton mentagrophytes,</i> <i>Microsporum audini,</i> <i>Microsporum canis</i>	Descamación con eritema y vesículas a granuloma intensa, lesiones verrugosas	Piel libre de pelo
Tinea cruris	<i>Trichophyton rubrum,</i> <i>Trichophyton mentagrophytes,</i> <i>Epidermatophyton floccosum</i>	Prurito intenso, descamación seca, delgada de la epidermis, comezón, erupción maculopapulosa	Ingle, perineo, región perianal, axilas
Tinea pedis o pie de atleta	<i>Trichophyton rubrum,</i> <i>Trichophyton mentagrophytes,</i> <i>Epidermatophyton floccosum</i>	Dermatitis crónica con exfoliación, maceración y fisuración de la piel, olor desagradable, papuloescamosa de tipo hiperqueratosa, aparición de	Membranas de los dedos de los pies y las plantas

		vesículas, vesiculopústulas, ampollas, ulceración de epidermis	
Tinea manuum	<i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Epidermatophyton floccosum</i>	Hiperqueratosis difusa, exfoliación de la piel, manchas vesiculares, manchas excretas, papulares rojas y foliculares, láminas escamosas eritematosas en el dorso	Manos y áreas interdigitales
Tinea barbae	<i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Microsporum caisi</i> , <i>Trichophyton violaceum</i> , <i>Trichophyton megnini</i>	Inflamación, foliculitis postular grave y profunda, descamación, alopecia, lesiones pustulosas y edematosas	Áreas barbadas de cara y cuello
Tinea unguium	<i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton schoenleinii</i> , <i>Trichophyton tonsurans</i>	Infección en el borde distal de la lámina ungueal, coloración parda oscura, inflamación paroniquial	Láminas ungueales

Nota: Infecciones por dermatófitos.

Fuente: Rippon, 1990; Gilbert, Moellering, Eliopoulos, Chambers & Saag, 2010, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Tabla 2.

Infecciones por *Candida*- enfermedades clínicas y etiologías comunes.

Trastornos Clínicos	Dermatófitos involucrado	Síntomas	Zona afectada
Candidiasis	Causada por diversas variedades de <i>Candida</i> , especialmente <i>Candida albicans</i>	<p><u>Candidiasis oral</u>: aftas micóticas, manchas o parches de un color blanco o rojo-rosáceo en la lengua, en las encías, en las paredes laterales o superior de la boca y en la pared posterior de la garganta, grietas, hendiduras y úlceras (queilitis angular)</p> <p><u>Candidiasis vaginal</u>: flujo espeso y blanco, similar a un queso cottage, picazón y sensación de quemazón dentro o alrededor de la vagina; y enrojecimiento e hipersensibilidad de los labios mayores de la vagina.</p>	Piel, en el estómago, en el colón, en el recto, en la vagina, en la boca y en la garganta

Nota: Infecciones producidas por *Candida*

Fuente: AIDSMEDES, 2009, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

2.5.3. Hongos patógenos

2.5.3.1. Trichophyton

Cada especie varía en su morfología de colonia y pigmentación. La formación de conidios varía según la cepa, influyendo en el cultivo donde se desarrolla los hongos; el uso de diferentes medios nutricionales es necesario en ocasiones para diferenciar la especie. Las más comunes son: *T. rubrum*, *mentagrophytes* y *tonsurans* (Sarmiento & Trujillo, 2006).

2.5.3.1.1. *Trichophyton rubrum*

Descripción

T. rubrum es antropófilo estricto, y en la actualidad se ha convertido en el dermatófito universal del hombre más común y más ampliamente distribuido, los individuos una vez parasitados son portadores de por vida, rara vez se aísla de animales y nunca del suelo (Rippon, 1990). Este dermatófito causa el 80-90% de las micosis (Navarrete, 2003).

Características

Crecimiento rápido, aspecto finamente veloso, que va tomando un aspecto aterciopelado. Cuando las colonias son blancas presentan mayor micelio aéreo que les da un aspecto algodonoso. El reverso se tiñe del pigmento rojo que se difunde hasta los bordes formando una franja roja que rodea la masa blanca central (Bos & Somers, 2008).

2.5.3.1.2. *Trichophyton mentagrophytes*

Descripción

Es el dermatófito más común del hombre y los animales, se han encontrado formas antropófilos, zoófilos y no se lo considera geófilos. Las cepas zoófilas causan menores infecciones en animales, pero producen una respuesta grave en los seres humanos (Al-Doory, 1980).

Características

Crecimiento rápido, las colonias generalmente planas son de color blanco o crema con una superficie pulverulenta o granulosa. Algunos cultivos muestran pliegues centrales o desarrollan áreas algodonosas o aterciopeladas. La pigmentación del reverso es usualmente café-amarillenta. (Fernández, Segundo, Arenas, da Silva & Guzmán, 2002).

2.5.3.2. *Microsporum*

Este hongo presenta colonias algodonosas y/o pulverulentas, de color blanco o parduzco; crecen bien en Sabouraud Dextrose Agar (SDA) a temperatura ambiente; las especies de

Microsporium infectan habitualmente la piel y el pelo pero rara vez las uñas (Sarmiento & Trujillo, 2006).

2.5.3.2.1. *Microsporium canis*

Descripción

Son dermatófitos zoófilos que producen enfermedades inflamatorias y reacciones de querión queleloide, la especie esta en evolución activa para infectar a un huésped en particular o una variedad de huéspedes y con el tiempo estarán separándose en varias especies diferentes. El nombre más adecuado para *M. canis* sería el de *M. felis*, ya que los gatos son el principal reservorio de este dermatófito. En la mayor parte de los casos es tan ligera que pasa inadvertida. Dichos animales infectados diseminan la enfermedad a las personas (Brooks, Morse, Carroll, Mietzner & Butel, 2010).

Características

Colonias de crecimiento rápido a 25-30°C, con micelio blanco, de aspecto lanoso, bordes desflecados. Posteriormente, centro pulvurento. Pigmento muy ligero con tonalidades crema (Pontón, Moragues, Gené, Guarro & Quindós, 2002).

2.5.3.3. Candida

La presencia de colonias, infección y producción de Candida se debe a la alteración de las defensas celulares del huésped en la fisiología y en la flora normal. En los diabéticos la infección es más común que por dermatofitosis. (Al-Doory, 1980).

2.5.3.3.1. *Candida albicans*

Descripción

Es un tipo común de hongo, que a menudo se encuentra en pequeñas cantidades en la vagina, la boca, el tubo digestivo y en la piel. La mayoría de las veces, no ocasiona infección ni síntomas, normalmente viven en la vagina y se mantiene en equilibrio. Sin embargo, algunas veces, la cantidad de *Candida albicans* aumenta llevando a que se presente una candidiasis (Biggs & Williams, 2009).

Características

Colonias de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas y blandas de bordes precisos, centro ligeramente prominente, con olor a levadura (Pontón, Moragues, Gené, Guarro & Quindós, 2002).

Tabla 3.

Características de los cultivos de dermatófitos

Dermatófito	Crecimiento	Color	Superficie y aspecto del anverso	Superficie y aspecto del reverso
<i>Trichophyton rubrum</i>	14 días	Blanco, difunde pigmento	Velosas, algodonosa y plano	Rojo sangre
<i>Trichopyton mentagrophytes</i>	7-10 días	Blanco marfil	Pulverulenta, granulosa, plana	Vinoso (No siempre)
<i>Microsporium canis</i>	6-10 días	Blanco amarillento	Velosa, plana radiada o lanosa	Anaranjado
<i>Candida albicans</i>	1-3 días	Blanco amarillento	Gemantes, ovaladas o redondeadas	Amarillento

Nota: Características comunes de dermatofitos de estudio.

Fuente: Arenas, 2008, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

2.5.4. Tratamiento

El clotrimazol es un medicamento que pertenece al grupo de los antifúngicos imidazólicos. Se utiliza para tratar infecciones causadas por hongos. Actúa inhibiendo la síntesis del ergosterol (sustancia componente de la pared celular del hongo). De esta manera, altera la permeabilidad de la membrana celular y con ello el crecimiento del hongo (FDA, 2011).

No se debe usar en el embarazo si no es estrictamente necesario. No es recomendable el uso de esta crema en la dermatitis del pañal. Si se desarrolla algún tipo de irritación o

hipersensibilidad con el uso de la crema, el tratamiento deberá ser discontinuado e instituir una terapia apropiada o alternativa del medicamento (FDA, 2011).

Una característica de todos los derivados imidazólicos es la posibilidad de dar una reacción tipo antabús si se toma alcohol mientras se está en tratamiento con ellos.

Su asociación con otros fármacos de características similares puede originar trastornos del ritmo cardiaco. Y se debe tener especial cuidado en pacientes que tomen anticoagulantes ya que pueden potenciar sus efectos (Narro, 2009).

2.6. Actividad antifúngica

2.6.1. Antifúngico

Antifúngico es una sustancia que elimina o detiene el crecimiento de hongos. Agente antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal, de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped (Stuttman & Fishbein, 1967).

2.6.2. Pruebas de sensibilidad de antifúngicos

Las pruebas de sensibilidad tienen como objetivo conocer si los hongos patógenos ensayados son sensibles o resistentes a los antifúngicos. Los procedimientos de prueba *in vitro* con agentes antifúngicos son de diseño similar a los empleados con agentes antibacterianos, pero existen diferencias que hacen más difíciles las pruebas con agentes antifúngicos, como por ejemplo: crecimiento lento, temperaturas específicas, tiempo de incubación y medio de cultivo, estas pruebas se hacen para obtener datos confiables que permitan elegir el agente más activo para usarlo en el tratamiento de infecciones humanas (Murray, Baron, Jorgensen, Landry & Pfaller, 2007).

2.6.2.1. Método de Barry

En este método, el medio de cultivo se mezcla con el inóculo, al solidificar las colonias crecen en diferentes niveles, los cuales servirán para contaje de colonias. Para ello en el

medio de cultivo previamente fundido (de 20 a 25 ml de medio a una temperatura de 45 a 50°C) en el tubo, en el tubo se adicionará la cantidad de inóculo que oscila entre 0,1 a 0,4 y se homogenizará la muestra en el tubo mediante el vibrador. Una vez, constituida la muestra, se vierte ésta en la placa petri estéril y se dejará solidificar, la mezcla también se podría realizar en la misma placa petri, aunque la homogenización en este caso es más difícil. Esta técnica es utilizada, por ejemplo, para la determinación de CMI (concentración mínima inhibitoria) de un antibiótico frente a determinados microorganismos (García, Fernández & Paredes, 1997).

2.6.2.2. Método de Kirby-Bauer

La prueba de Kirby-Bauer, conocido como el método de difusión del disco, es la prueba de susceptibilidad a los antibióticos más utilizada en el tratamiento de una infección. Este método se basa en la inhibición del crecimiento bacteriano medido en condiciones estándar. Para esta prueba, un medio de cultivo, específicamente el agar de Mueller-Hinton, se inocula uniformemente y de forma aséptica con el organismo de ensayo y después se filtra discos de papel, que se impregnan con una concentración específica de un antibiótico particular, se coloca en el medio. El organismo crece en la placa de agar mientras que el antibiótico inhibe el crecimiento. Si el organismo es susceptible a un antibiótico específico, no habrá crecimiento alrededor del disco que contiene el antibiótico. Por lo tanto, se puede observar una "zona de inhibición" y se mide para determinar la susceptibilidad de un antibiótico para un microorganismo en particular. (Bauer, Kirby, Sherris & Turck, 1966).

2.6.2.3. Método modificado de Kirby-Bauer

La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer, Kirby, Sherris & Turck, 1966, este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos. El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana

y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997).

2.6.2.4. Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante algunas de las variantes de los métodos de dilución. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la mínima concentración de antimicrobiano (en $\mu\text{g/ml}$) que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C. La CMI se ha establecido como "Gold Standard" frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado (Andrews, 2001); la CMI mide con mayor exactitud la concentración del antibiótico necesaria para inhibir el crecimiento de un inóculo estandarizado bajo condiciones definidas (Brooks, Butel & Morse, 2005).

CAPÍTULO 3

MARCO METODOLÓGICO

3.1. Lugar de investigación

La investigación experimental se realizó en los laboratorios de Proyectos y tesis, Biotecnología general, Microbiología y Química Analítica de los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana, Sede el Girón- Quito.

3.2. Lugar de recolección

Se recolectó el material vegetal en la provincia de Imbabura, en la ciudad de Ibarra. *Ambrosia arborescens* se obtuvo de los alrededores de la Laguna de Yaguarcocha y *Aristeguietia glutinosa* en el barrio San Miguel de Arcángel en la loma Alto de Reyes. (Anexo 1) Ibarra se encuentra a 2225 metros sobre el nivel de mar (m.s.n.m.). Está ubicada a 115 Km al noroeste de Quito y a 125 Km al sur de la ciudad de Tulcán, posee un clima seco templado y agradable. Los anuarios meteorológicos históricos determinan una temperatura media de 15,90° C, con una variación mínima menor a 0,3°C. Los registros promedian una temperatura máxima media entre los 20 y 25° C y una mínima media entre los 7 y 11° C. Los vientos promedios son del orden de 7m/s como máximo y de 3.5 m/s, como mínimos. El análisis hidrometeorológico determina que las precipitaciones están entre los 1000 mm y 1400mm (Naranjo, y otros, 2013).

El día de recolección se precisó los siguientes datos.

Tabla 4.

Datos geomorfológicos

	<i>Ambrosia arborescens</i>	<i>Aristeguietia glutinosa</i>
Ubicación	Laguna de Yaguarcocha	Loma Alto de Reyes
Coordenadas	0°22'0" N 78°7'0" W	0°21'46"N 78°07'48"O
m.s.n.m.	2190	2405
Temperatura	15°C	17°C
Humedad	72% HR	68% HR

Nota: Datos obtenidos el día de la recolección mediante el GPS, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Se realizó la recolección de 25 kilos de hojas de *Aristeguietia glutinosa* (Matico) en sacos de yute y 30 kilos de *Ambrosia arborescens* (Marco) de la misma manera en sacos de yute. Las especies de estudio fueron certificadas por el Herbario de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador (Anexo 2 y 3). El proceso de preparación del material vegetal se realizó en los laboratorios de la Universidad Politécnica Salesiana, para su posterior extracción en Isabru Botanik.

3.3. Desinfección, limpieza y secado del material vegetal

El material vegetal se limpió y se separó las hojas del tallo, las partes deterioradas, manchadas y con señales de ataques por insectos. Las hojas fueron sumergidas en la solución de Hipoclorito de sodio al 1% en agua durante 10 min, para reducir la carga bacteriana, luego fueron extendidas sobre papel periódico, en las mesas de los laboratorio a una temperatura ambiente de 17°C y 48% HR, sin influencia directa de la luz, para que se filtre el exceso de agua.(Anexo 4).

Dominguez, 1973 estableció que se obtiene un rendimiento del 1% en hierba fresca, por esta razón, se envió *Aristeguietia glutinosa* (matico) fresca para su posterior extracción del aceite esencial

En el caso de *Ambrosia arborescens* (marco) para el proceso de secado, se colocó 3 bandejas con el material vegetal limpio en una cámara climática de aire recirculado programado a 50°C y 40% HR, debe garantizarse una buena circulación de aire para facilitar el proceso.

La temperatura del aire debe moderarse para evitar que la temperatura de las hierbas supere la temperatura crítica (generalmente entre 30 y 60°C para plantas medicinales). El secado interrumpe los procesos de degradación causados por enzimas o fermentos, impide el desarrollo de microorganismos, reacciones de oxidación y de hidrolisis. (Sharapin, 2000).

Equipo utilizado

- Cámara climática con control de humedad BINDER modelo KBF240

3.4. Obtención del extracto blando de *Ambrosia arborescens* Mill. (Marco)

El extracto fue obtenido, por maceración con ayuda de un rotavapor propiedad de la empresa Isabru Botanik en la Provincia de Tungurahua, ciudad de Ambato.

3.4.1. Proceso de maceración

Se colocó 2,5 Kg de hojas, secas y trituradas, conjuntamente con 10 litros de alcohol etílico al 96% en un recipiente oscuro y herméticamente cerrado hasta cubrir completamente el material vegetal, se dejó en maceración a temperatura ambiente por un espacio de 72 horas, agitando ocasionalmente. Se procedió a filtrar a través de papel filtro y el filtrado obtenido se evaporó en un rotavapor al vacío, a una temperatura máxima de 35°C hasta lograr una pasta pegajosa semilíquida, se envasó, pesó y almacenó el extracto obtenido (Anexo 5).

Equipos utilizados

- Molino
- Rotavapor Buchi R-144

Cálculos

Ecuación 1.

Porcentaje del rendimiento del extracto

$$\%R = \frac{m_E}{m_{MV}} \times 100$$

Siendo

m_E : masa del extracto obtenido, g

m_{MV} : masa del material vegetal seco, g

3.4.2. Control de calidad

El control de calidad del extracto es muy importante debido a que permite determinar la calidad y pureza, se empleó algunos métodos físico-químicos, los cuales se describen a continuación.

Tabla 5.

Parámetros del control de calidad del extracto *Ambrosia arborescens*

Determinación organoléptica	Determinación física	Determinación química
Color	Densidad relativa	pH
Olor	Sólidos Totales	
Aspecto		

Nota: Parámetros organolépticos, físicos y químicos a evaluar de la especie, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

3.4.2.1. Características organolépticas o percepción

Se tomó una alícuota de 1g y se colocó en vidrio reloj de 5 cm de diámetro, para determinar el análisis sensorial.

3.4.2.2. Densidad relativa: método gravimétrico

Según la Norma Técnica Peruana NTP 319.081: 1974 la densidad relativa d_{20} es la relación entre la masa de un determinado volumen de la sustancia a 20°C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura.

Procedimiento

Se lavó cuidadosamente el picnómetro y se dejó escurrir, se enjuagó con alcohol etílico y con éter dietílico y se sometió a secado con una corriente de aire seco. Se secó por la parte externa con papel toalla o absorbente. Se colocó el picnómetro en la balanza durante 30 min para trabajar a temperatura ambiente, se registró el peso del picnómetro vacío con el tapón, m_1 .

Luego se llenó de Dimetilsulfóxido a 20°C , hasta la señal de enrase, teniendo cuidado con la presencia de burbujas de aire, se sumergió en el baño de agua a $20^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo inmerso durante 30 min, se retiró y se secó con el papel

Se colocó el picnómetro en la balanza durante 30 min para trabajar a temperatura ambiente y se pesó nuevamente el picnómetro con el tapón, m_2 , se retiró el DMSO y se lavó con alcohol etílico y se enjuagó con éter dietílico, sometiéndolo a secado con aire seco.

Se colocó el extracto y se tapó, teniendo cuidado con la presencia de burbujas de aire, se sumergió en el baño de agua a $20^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo inmerso durante 30 min, se retiró y se secó con el papel, se colocó el picnómetro en la balanza durante 30 min para trabajar a temperatura ambiente y se pesó en la balanza analítica, m_3 .

Equipos utilizados

- Balanza analítica DENVER SCIENTIFIC modelo TR204
- Picnómetro tipo Gay-Lussac LMC Germany , con capacidad de 2 cm^3
- Baño maría SHEL LAB, modelo W14M-2, con regulador de temperatura, ajustado a $20^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.

Cálculos

Ecuación 2.

Densidad relativa del extracto *Ambrosia arborescens*

$$\delta_{20} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1}$$

Siendo:

δ_{20} : densidad relativa 20/20 °C

m_1 : masa picnómetro vacío en g

m_2 : masa picnómetro con dimetilsulfóxido en g

m_3 : masa picnómetro con extracto de *Ambrosia Arborescens*

3.4.2.3.Sólidos totales

Los sólidos totales es la expresión que se aplica a los residuos de material que quedan en un recipiente después de la evaporación de una muestra y su consecutivo secado en estufa a una temperatura definida de 103 a 105 °C (Centro de Investigaciones Hidráulicas, 2006).

Procedimiento

Se calentó un crisol limpio a 103 – 105 °C, durante una hora, se conservó el crisol en un desecador el cual fue llevado a una balanza analítica mediante pinzas para poder registrar su peso, se colocó 0,5 g del extracto en el crisol y se secó la muestra en un horno de secado durante una hora a 103 – 105 °C. Se enfrió el crisol en un desecador para equilibrar la temperatura y pesar en una balanza analítica (Centro de Investigaciones Hidráulicas, 2006).

Equipos utilizados

- Balanza analítica DENVER SCIENTIFIC modelo TR204
- Estufa ESCO modelo OFA-54-8

Cálculos

Ecuación 3.

Sólidos totales del extracto *Ambrosia arborescens*

$$\text{Sólidos totales} = \frac{A - B}{m} \times 100$$

Siendo:

A: masa del residuo seco más crisol en g

B: masa del crisol en g

m: masa del extracto en g

3.4.2.4. Determinación de pH

El valor de pH es el logaritmo negativo de la concentración del ión hidrógeno de una solución acuosa. Determinando la acidez o alcalinidad de una sustancia (Romero, 2012).

Procedimiento

Antes de leer la muestra, se puso a temperatura ambiente considerando que no deben diferir por más de 2°C con respecto a la solución amortiguadora (buffer).

En un vaso de precipitación de 25ml, se vació un volumen de 15 ml y se introdujo el electrodo en la muestra de manera que no toque el fondo. Esta medición se realizó por triplicado con volúmenes iguales de muestra, los cuales no difirieron por más de 0,1 unidades de pH. Finalmente se registró y anoto los valores del pH junto con la temperatura de las muestras.

Equipo utilizado

- Potenciómetro METTLER TOLEDO modelo Seven Multi

3.5. Obtención del aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa*

3.5.1. Proceso arrastre de vapor

Se colocó el material vegetal en un reactor de acero inoxidable propiedad de la empresa Isabru Botanik S.A, para la destilación, se lo cerró herméticamente y se administró vapor de agua a 92°C. El vapor se condensó a través de un refrigerante de acero inoxidable, se dejó en reposo por un espacio de 45 minutos para que se separe completamente el agua y el aceite esencial, el mismo que se mantuvo sobre la superficie del agua. Se separó el agua del AE con la ayuda de un embudo de decantación. El aceite esencial obtenido, se filtró a través de un filtro doble de celulosa/sulfato de sodio anhidro/celulosa, a fin de eliminar cualquier material extraño y

el resto de humedad asociada. Se envasó en un frasco oscuro con tapa hermética (Anexo 6).

Equipo utilizado

- Tanque reactor de acero inoxidable
- Refrigerante de acero inoxidable
- Embudo de decantación
- Filtro celulosa/sulfato de sodio anhidro/celulosa

Ecuación 4.

Porcentaje del rendimiento del aceite esencial

$$\%R = \frac{m_{AE}}{m_{MV}} \times 100$$

Siendo

m_{AE} : masa del aceite esencial obtenido, g

m_{MV} : masa del material vegetal, g

3.5.2. Control de calidad

El control de calidad de un aceite esencial tiene como objetivo garantizar que posea determinadas características analíticas y estas se mantengan. Los aceites esenciales tienen parámetros de valor específico, dependiendo el origen geográfico, meteorología y el método de extracción.

Tabla 6.

Parámetros del control de calidad del AE de *Aristeguietia glutinosa*

Determinación organoléptica	Determinación física	Determinación química
Color	Índice de refracción	pH
Olor	Densidad relativa	
Aspecto		

Nota: Parámetros organolépticos, físicos y químicos a evaluar de la especie, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

3.5.2.1. Características organolépticas o percepción

Se tomó una alícuota de 1 ml y se colocó en vial transparente de 4 ml de capacidad, para determinar el análisis sensorial.

3.5.2.2. Densidad relativa: método gravimétrico

Se realizó el procedimiento indicado en el apartado 3.4.2.2., se utilizó agua destilada en lugar de dimetilsulfóxido.

Cálculos

Ecuación 5.

Densidad relativa del AE *Aristeguietia glutinosa*

$$\delta_{20} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1}$$

Siendo:

δ_{20} : densidad relativa 20/20 °C

m_1 : masa picnómetro vacío en g

m_2 : masa picnómetro con agua destilada en g

m_3 : masa picnómetro con AE *Aristeguietia glutinosa*

3.5.2.3. Índice de refracción

El índice de refracción n_{λ}^t de un aceite esencial es la relación del seno de ángulo de incidencia al seno del ángulo de refracción de una rayo luminoso de longitud de onda determina, que pasa del aire al aceite esencial mantenido a una temperatura constante (Norma Técnica Nacional de Perú, 1974).

Procedimiento

Para confirmar las mediciones del refractómetro se colocó en el prisma de medición una gota de agua destilada con gotero a 25 °C, previamente calentado mediante baño de agua para mantener la temperatura constante el resultado dio 1.3330 cuyo valor indica el índice de refracción del agua destilada según el Instituto de Investigación Tecnológica Industrial y Normas Técnicas (ITINTEC), una vez confirmado que está ajustado, se colocó una gota de AE previamente sumergido en baño de agua a 25 °C utilizando un gotero sobre el prisma de medición, evitando que difiera de la temperatura de referencia en más de 2 °C; se cerró el prisma y se enfocó la luz por medio del espejo, obteniendo así los resultados. El procedimiento se realiza por triplicado donde se confirmó que los valores no varían en más de 0.0002; Se reportó como valor de índice de refracción, el promedio de las tres lecturas

Equipos utilizados

- Baño maría SHEL LAB, modelo W14M-2, con regulador de temperatura, ajustado a $25^{\circ} \pm 0,2^{\circ}\text{C}$.
- Refractómetro Abbé ATAGO modelo NAR-1T

3.5.2.4. Determinación de pH

Se realizó el procedimiento indicado en el apartado 3.4.2.4.

3.6. Evaluación de la actividad antifúngica de *Ambrosia arborescens* (Marco) y *Aristeguietia glutinosa* (Matico)

Este estudio fue llevado a cabo para determinar la influencia del extracto blando de *Ambrosia arborescens* y AE de *Aristeguietia glutinosa* sobre hongos dermatófitos causantes de dermatomicosis. Algunos de los factores que se consideran de gran influencia en estos ensayos son: la cantidad del inóculo, la composición del medio de cultivo, pH del medio, formato de la prueba, temperatura y humedad de incubación.

La resistencia innata y adquirida ha sido demostrada *in vitro* e *in vivo*, por lo que el reconocimiento temprano de especies resistentes a uno o más antifúngicos garantiza un tratamiento óptimo y un mejor resultado. Sin embargo la resistencia continua creciendo y evoluciona, por lo que es importante la introducción de nuevos antifúngicos (Lass-Flörl, Perkhofer & Mayr, 2010).

3.6.1. Viabilización de las cepas

Para la activación de las cepas de investigación *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533 (Anexo 7), *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 (Anexo 8), *Microsporum canis* ATCC 36299 (Anexo 9), *Candida albicans* ATCC 10231 (Anexo 10), adquiridas en Medibac se siguió el procedimiento establecido por Microbiologics- KWIK-STIK™.

Procedimiento

El método de activación depende del material biológico, en el caso de estos dermatófitos se utiliza el método 5 (MicroBioLogics, 2011).

Se oprimió la ampolla para liberar el líquido de hidratación y facilitar la bajada del líquido hasta la pastilla. Se fragmentó la pastilla y se mezcló con el líquido hasta saturar el hisopo.

Se extrajo el hisopo KWIK-STIK™ (pellet liofilizado de microorganismo ATCC) y se hisopó en dos placas con Sabouraud Dextrose Agar (SDA) (Tabla 5), en espiral desde el centro hasta las paredes de la caja, el hisopo se colocó en un tubo de ensayo con Tryptic Soy Broth (TSB), para su conservación. La incubación se realizó a 25°C en una atmosfera aerobia de 2 a 7 días.

Una vez activadas la cepas se colocó en Cryobank para su conservación (MicroBioLogics, 2011).

Equipos utilizados

- Cámara de Flujo laminar FORMA SCIENTIFIC modelo 1845
- Incubadora MEMMERT modelo BE-400

Tabla 7.

Composición del medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar (SDA)

Sabouraud Dextrose Agar	
<i>Fórmula</i>	<i>Concentración por litro</i>
Peptona	10 g
D-Glucosa	40g
Agar	15g
<i>Preparación</i>	
<p>Añadir 65 g a 1 litro de agua destilada. Llevar a ebullición para disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 121 ° C durante 15 minutos. Mezclar bien y verter en las cajas petri estérile.</p>	
Fecha de apertura	feb-14
Fecha de caducidad	Mar-18
Lote	3148097

Nota: Composición cuali-cuantitativa y método de preparación del SDA, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

3.6.2.Preparación inóculo

3.6.2.1.Cámara de Neubauer: *Trichopyton rubrum*, *Trychopyton mentagrophytes*, *Microsporium canis*

La cámara de Neubauer o cámara de recuento es un aparato de precisión hecho de vidrio óptico especial. Se utiliza para contar células u otras partículas en suspensiones bajo el microscopio. Las cámaras de recuento sirven para contar bacterias, esperma, esporas de

hongo, así como para el análisis de sangre (recuento de leucocitos, eritrocitos, trombocitos) (Marienfeld Laboratory Glassware, 2011).

Procedimiento

El procedimiento se basó en el Manual de Laboratorio para el Manejo de Hongos Entomopatógenos descrito por Cadeño & Ames, 2004.

Se preparó una suspensión de esporas en agua destilada con Tween 80 al 1% (Anexo 11), se homogenizó con el vortex durante 10 min. Se limpió la cámara de Neubauer con alcohol para desinfectar, se secó y colocó el cubreobjetos. Con una micropipeta automática, se llenó la cámara con 10 µl de la suspensión de esporas. Se observó al microscopio utilizando el aumento conveniente de acuerdo al tamaño de la estructura (40x es un aumento adecuado). Se contó las esporas presentes en los cuadrados elegidos (generalmente se cuentan en los cuadrados de los cuatro ángulos y el centro). También se contó las esporas que están ubicadas tocando la primera de las tres líneas que se encuentran circundando el cuadrado, las que se encuentran en la parte superior y la derecha del cuadrado. Se contó en total 10 cuadrados, cinco en cada cámara (cinco arriba y cinco abajo).

Se limpió la cámara con alcohol para desinfectar. Se determinó el número de esporas por ml y el número total de esporas, el valor obtenido del recuento debe aproximarse a 10^6 para garantizar una cantidad semejante de microorganismo en cada siembra (Roussos, Aquiahuatl, Brizuela, Olmos, Rodríguez & Viniegra, 1989).

Cálculos

Ecuación 6.

Número de esporas por ml

$$\frac{\text{Esporas}}{\text{ml}} = n_{\text{esporas contadas}} \times 10000 \times \text{factor de dilución}$$

Siendo

$n_{\text{esporas contadas}}$: número de esporas contadas en la cámara de Neubauer

$\text{factor de dilución}$: concentración Tween 80 (1%)

10000: volumen de la cámara de Neubauer expresado en 1/ml; se considera el área por la profundidad (Bastidas, 2012).

Ecuación 7.

Número total de esporas

$$\text{Esporas totales} = \frac{\text{Esporas}}{\text{ml}} \times V_{\text{suspensión}}$$

Siendo

$V_{\text{suspensión}}$: volumen de la suspensión original de esporas (10 ml)

Equipos utilizados

- Cámara de Neubauer MARIENFELD
- Vortex Mixer GEMMY modelo VM-300
- Microscopio MICROS AUSTRIA modelo MCX 100 LCD
- Micropipeta automática GLASSCO de 10- 100 μl

3.6.2.2. Turbidimetría: *Candida albicans*

Método para la cuantificación del crecimiento de poblaciones microbianas en base a la masa celular por turbidimetría, mide la reducción de la transmisión de luz debido a partículas de una suspensión y cuantifica la luz residual transmitida.

Estudios teóricos y experimentales han mostrado que soluciones diluidas de diferentes tipos de bacterias, independientemente del tamaño celular, tienen casi la misma absorbancia por unidad de concentración de peso. Esto quiere decir que, en soluciones diluidas, la absorbancia es directamente proporcional al peso, independientemente del tamaño celular del microorganismo (Microbiología! Outside, 2010). Tales mediciones se hacen normalmente con un fotómetro o espectrofotómetro.

Las condiciones referenciadas bibliográficamente determinan que la longitud de onda de 655 nm con valor de absorbancia de 0,20 aprox. es equivalente a 10^8 células para hongos y levaduras (Mosquera & Veloz, 2011).

Procedimiento

Para el cultivo overnight se tomó de una caja petri de cepa activa, una porción de la cepa y se inoculó en un tubo de ensayo con 8ml de Tryptic Soy Broth (TSB), y se incubó a 25°C durante 18 horas.

Se separó el pellet de cepas del medio, mediante centrifugación por 20 minutos a 3000 rpm en la centrífugadora. Se descartó el caldo y se añadió cantidad suficiente de suero fisiológico estéril y se homogenizó el pellet celular mediante agitación utilizando vortex, se realiza diluciones continuas hasta alcanzar la absorbancia deseada.

Se realizó la lectura de absorbancia de las soluciones diluídas del pellet celular, en el Espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 655nm hasta llegar a los valores de absorbancia establecidos por la referencia.

Equipos utilizados

- Centrífuga SELECTA modelo Centro 8/7001356.
- Vortex Mixer GEMMY modelo VM-300
- Espectrofotómetro UV SHIMADZU modelo mini 1240
- Autoclave vertical PHOENIX modelo AV50

3.6.3.Preparación de las concentraciones

3.6.3.1.Extracto de *Ambrosia arborescens* (Marco)

Se realizó 7 diluciones sucesivas de extracto de *Ambrosia arborescens* (Marco), en concentraciones de 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm, 500ppm, 600ppm y 700ppm (partes por millón) utilizando como diluyente Dimetilsulfóxido (DMSO) (Anexo 12) líquido polar miscible y sin actividad antifúngica. Las concentraciones utilizadas en la investigación se definieron luego de la revisión bibliografica del estudio antibacteriano de *Ambrosia arborescens* realizado por Ibarra & Paredes, 2013 donde se trabajó con valores que oscilan desde los 5ppm a 640ppm, siendo los resultados semejantes en concentraciones de 5 a 100ppm. Por esta razón, se estableció que el estudio se realizaría

en las concentraciones antes mencionadas, para de esta manera aportar con la línea de investigación de la especie vegetal.

Ecuación 8.

Concentración del extracto en partes por millón

$$ppm = \frac{m_e}{V}$$

Siendo:

m_e : masa del extracto en mg

V: volumen del disolvente (DMSO) en L

Ecuación 9.

Dilución del extracto

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

Siendo

C_1 : concentración final en ppm

V_1 : volumen final en ml

C_2 : concentración inicial en ppm

V_2 : volumen inicial en ml

3.6.3.2. Aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* (Matico)

Se realizó 10 diluciones de Aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* (Matico), en porcentajes de 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4%, 4,5%, 5% y 100% utilizando como diluyente Dimetilsulfóxido (DMSO) líquido polar miscible y sin actividad antifúngica.

Los rangos de las diluciones, se escogieron para poder ser aplicados en formulaciones, las mismas que no admiten concentraciones superiores al 5% de AE, incluso concentraciones mayores de 3%, generan problemas organolépticos especialmente en lo que respecta a la apariencia del producto (Miñana & Goncalves, 2011).

3.6.4.Métodos de siembra

3.6.4.1.Siembra en placa por homogenización en masa *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*

Técnica de siembra fundamental para la obtención de los recuentos microbianos característicos de las principales técnicas clásicas de análisis microbiológicos (León, 2001).

Procedimiento

En cajas Petri estériles, desechables y vacías, se depositó 1 ml de inóculo del hongo y se añadió 19 ml de medio de cultivo Sabouraud Dextrose Agar (SDA) fundido, temperado aproximadamente a 45°C y estéril. Se mezcló ambos por rotación suave de las placas. De esta forma los microorganismos se distribuyeron de forma homogénea en el medio de cultivo permitiendo el crecimiento por todo el agar (Quiroz, 2012).

Equipos utilizados

- Autoclave vertical PHOENIX modelo AV50
- Cámara de Flujo laminar FORMA SCIENTIFIC modelo 1845
- Balanza analítica DENVER SCIENTIFIC modelo TR204
- Micropipeta automática GLASSCO de 100-1000 µl
- Plancha calefactora THERMO SCIENTIFIC modelo SP131015
- Purificador de agua MILLIPORE modelo Direct-Q
- Potenciómetro METTLER TODELO modelo Seven Multi
- Pipeta graduada GLASSCO de 25 ml

3.6.4.2.Siembra en placa por estriado *Candida albicans*

Es el método más fácil y el más usado para obtener cultivos puros (AIDSMEDS, 2009).

Procedimiento

Se vertió 20 ml de medio de cultivo SDA estéril en cajas petri estériles y desechables, se dejó solidificar. Se dispensó 200 µl de inóculo sobre el medio sólido y se estrió homogéneamente con hisopos estériles por toda la caja.

Equipos utilizados

- Autoclave vertical PHOENIX modelo AV50
- Cámara de Flujo laminar FORMA SCIENTIFIC modelo 1845
- Balanza analítica DENVER SCIENTIFIC modelo TR204
- Micropipeta automática GLASSCO de 100-1000 μ l
- Plancha calefactora THERMO SCIENTIFIC modelo SP131015
- Purificador de agua MILLIPORE modelo Direct-Q
- Potenciómetro METTLER TODELO modelo Seven Multi
- Pipeta graduada GLASSCO de 25 ml

3.6.5.Método modificado de Kirby-Bauer

3.6.5.1.Método modificado por difusión en pozo de agar

Procedimiento

Se realizó los pozos sobre la superficie de los agares con ayuda de un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro y en cada uno de ellos se vertió 50 μ l de concentraciones diferentes de extracto, concentraciones diferentes de aceite, blanco positivo (Clotrimazol) (Anexo 13 y 14) y blanco negativo (Dimetilsulfóxido-DMSO). Las placas se incubaron de 2 a 5 días a 25°C para permitir el crecimiento fúngico confluyente.

Todas las pruebas se realizó por triplicado.

Se midió los halos de inhibición con un calibrador o pie de rey (mm) considerado desde el punto de completa inhibición según se aprecie a simple vista. Se realizó la lectura por el reverso de la placa con un fondo negro con luz reflejada.

La interpretación de la lectura está fundamentada en el método Kirby- Bauer, que relaciona la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana con el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar (Ramirez & Marin, 2009).

Equipos utilizados

- Autoclave vertical PHOENIX modelo AV50
- Cámara de Flujo laminar FORMA SCIENTIFIC modelo 1845
- Micropipeta automática GLASSCO de 100-1000 μ l

- Incubadora MEMMERT modelo BE-400
- Pie de rey digital STANLEY

3.7. Análisis estadístico

3.7.1. Modelo Anova de una vía

Es un método matemático creado para probar la hipótesis de que las medias aritméticas de más de 2 grupos poblacionales son iguales. El análisis de la varianza se basa en la descomposición de la variabilidad total en dos partes, una parte debida a la variabilidad entre las distintas poblaciones o tratamientos (variabilidad entre grupos o variabilidad explicada por el diseño) y otra parte que puede considerarse como la variabilidad intrínseca de las observaciones (variabilidad dentro de los grupos o residual) (Yáñez, 2010).

Software utilizado

- Programa Statistix 10.0 General ONE WAY AOV
- Programa Statistix 10.0 Tukey HSD All- Pairwise Comparisons Test

Tabla 8.

Consideraciones del análisis del ANOVA de una vía

Fuente de variación	Grados de libertad (DF)	Suma de cuadrados (SS)	Cuadrados medios (MS)	F	P
Entre Bloques	k-1	SCE	$CME = SCE / k - 1$		
Error	k(n-1)	$SCD = STC - SCE$	$CMD = SCD / N - k$	$F_c = CME / CMD$	
Total	kn-1	SCT			

Nota: Factores a considerar y evaluar en el análisis Anova de una vía.
Fuente: Yáñez, 2010, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Donde

SCE: suma de cuadrados entre grupos

CME: varianzas entre grupos

CMD: varianza dentro de grupos

SCD: suma de cuadrados dentro de grupos

SCT: suma de cuadrados total

k: número de grupos

n: número de filas o réplicas en grupo

N: número total de casos o mediciones del experimento

Los parámetros utilizados para aceptar la hipótesis alternativa son:

- $p < \alpha$
- $F > F_t$

Los parámetros utilizados para aceptar la hipótesis nula son:

- $p > \alpha$
- $F < F_t$

Donde

P: probabilístico calculado

α : nivel de significancia o error más aceptable (0,05)

F: estadístico calculado

F_t: estadístico tabulado

3.7.2. Modelo Anova de dos vías

Esta prueba busca determinar diferencias entre medias de dos o más grupos (bloques), pero al mismo tiempo detectar si existen diferencias entre los datos debidas a algún tipo o tipos de factores que afecten interiormente a cada grupo (tratamientos), nivel de significancia $\alpha=0,05$; cuyos valores son corroborados mediante un test *a posteriori* para la discriminación de cual o cuales grupos de datos son diferentes entre sí. El Test de Tukey (HSD) es el más utilizado para este análisis (Yáñez, 2010).

Para este análisis se utilizó software para análisis estadístico donde se importó los datos obtenidos de la evaluación antifúngica, los cuales fueron ordenados de acuerdo a la concentración empleada.

Software utilizado

- Programa Statistix 10.0 General AOV/ AOCV
- Programa Statistix 10.0 Tukey HSD All- Pairwise Comparisons Test

Tabla 9.

Consideraciones del análisis del ANOVA de dos vías o dos factores

Fuente de variación	Grados de libertad (DF)	Suma de cuadrados (SS)	Cuadrados medios (MS)	F	p
Entre bloques	k-1	SCC	CMEC = SCC/DF	F=CMEC/CMR	DF= (k-1)/(n-1)(k-1)
Entre tratamientos	n-1	SCF	CMEF=SCF/DF	F=CMEF/CMR	DF= (n-1)/(n-1)(k-1)
Error	(n-1)(k-1)	SCD	CMR=SCD /DF		
Total	kn-1	SCT			

Nota: Factores a considerar y evaluar en el análisis Anova de dos vía.
Fuente: Yáñez, 2010, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Donde

SCC: suma de cuadrados entre columnas

SCF: suma de cuadrados entre filas

CMEC: cuadrados medios entre columnas

SCD: suma de cuadrados dentro de grupos

SCT: suma de cuadrados total

k: número de grupos

n: número de columnas

N: mediciones del experimento

Los parámetros utilizados para aceptar la hipótesis alternativa son los mismos considerados en el apartado 3.8.1.

3.7.3. Porcentaje de inhibición relativa

Porcentaje de inhibición relativa (PIR): Asumiendo que el máximo efecto inhibitorio es el producto por el control positivo (CP), se determina el porcentaje de efecto de inhibición del crecimiento del microorganismo de cada extracto y aceite, relativo al CP. (Rivero, Álvarez, López & González, 1997).

Cálculos

Ecuación 10.

Porcentaje de inhibición relativa

$$\% \text{ inhibición}_{\text{relativa}} = \frac{Halo_{\text{inhibición}} - Halo_{\text{Control}(-)}}{Halo_{\text{Control}(+)} - Halo_{\text{Control}(-)}} \times 100$$

Siendo:

$Halo_{\text{inhibición}}$: halo de inhibición del extracto o aceite esencial, mm

$Halo_{\text{Control}(-)}$: halo de inhibición de dimetilsulfóxido (DMSO), mm

$Halo_{\text{Control}(+)}$: halo de inhibición de clotrimazol, mm

CAPÍTULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Obtención de principios activos

4.1.1. Rendimiento del extracto de *Ambrosia arborescens* (Marco) mediante el método de maceración.

El rendimiento se calcula mediante la Ecuación 1, en el apartado 3.4.1. dando como resultado:

Tabla 10.

Rendimiento del extracto *Ambrosia arborescens*

	1	2	3	\bar{X}
Masa del material vegetal seco (g)	1500,00	1505,00	1503,00	1502,67
Masa del extracto obtenido (g)	59,25	59,25	59,25	59,25
Rendimiento (%)	3,94			

Nota: Resultados del rendimiento en porcentaje de obtención del extracto, por S. Ayala & T. Vázquez, 2014

El rendimiento obtenido fue de 3,94%, superior al 2,70% obtenido por Ibarra & Paredes 2013. Características que se dan por el sitio de recolección, la temperatura, humedad, provocan la variación de los resultados.

4.1.2. Rendimiento del aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* (Matico) mediante el método de arrastre por vapor.

El rendimiento se calcula mediante la Ecuación 4, en el apartado 3.5.1. dando como resultado:

Tabla 11.

Rendimiento del AE de *Aristeguietia glutinosa*

	1	2	3	\bar{X}
Masa del material vegetal (g)	1998,00	1996,00	1997,00	1997,00
Masa del aceite esencial obtenido (g)	19,378	19,378	19,378	19,378
Rendimiento (%)	0,97			

Nota: Resultados del rendimiento en porcentaje de obtención del aceite esencial, por S. Ayala & T. Vázquez, 2014

El rendimiento obtenido fue de 0,97, el cual se encuentra dentro de los límites de 0,50 a 2,00% para aceites esenciales reportado por Guadarrama, Buendía, Orozco, Estrada & Cruz, 2012; en hierba fresca los rendimientos son menores al 1,00% (Silva, 2013).

4.2. Control de Calidad

4.2.1. Extracto de *Ambrosia Arborescens* (Marco)

4.2.1.1. Determinación organoléptica

Tabla 12.

Características organolépticas de extracto de *Ambrosia arborescens*

Parámetros	Descripción
Olor	acre, penetrante
Color	verde petróleo
Aspecto	viscoso, adherente

Nota: Parámetros evaluados sensorialmente, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Las características organolépticas de los extractos no tienen estándares de comparación, ya que estos tienen sus propios valores y características dependiendo de cada especie que se analice y de la parte de esta que se utilice.

4.2.1.2. Parámetros físicos

4.2.1.2.1. Densidad relativa

Los resultados presentados en la tabla se calculan de la Ecuación 2, establecidas en el apartado 3.4.2.2.

Tabla 13.

Densidad relativa de extracto de *Ambrosia arborescens*

	Lectura			
	1	2	3	\bar{X}
Masa del picnómetro vacío, m1 (g)	5,4073	5,4076	5,4074	5,4074
Masa del picnómetro con DMSO, m2 (g)	6,4828	6,4825	6,4826	6,4826
Masa del picnómetro con la muestra, m3 (g)	6,4929	6,4931	6,4927	6,4929
Densidad relativa, (g/ml)	1,01			

Nota: Valores obtenidos del cálculo de la densidad en relación masa/volumen, por S. Ayala & T. Vázquez, 2014

La densidad relativa obtenida es 1,01 g/ml; parámetro que fue comparado con los valores obtenidos en la investigación de Ibarra & Paredes, 2013 de 0,9 g/ml; los valores aunque presentan diferencias son similares, los cuales varían por las condiciones de extracción o el lugar de recolección, de igual manera en el estudio de Ochoa, Marín, Fernández, Vinet & García, 2006 se obtuvo resultados de 1.11 g/ml.

4.2.1.2.2. Sólidos totales

Los resultados presentados en la tabla se calculan de la Ecuación 3, establecidas en el apartado 3.4.2.3.

Tabla 14.

Sólidos totales de extracto de *Ambrosia arborescens*

	Lectura			
	1	2	3	\bar{X}
Masa del residuo seco más crisol, A (g)	4,0863	4,1765	4,0754	4,1127
Masa del crisol, B (g)	4,039	4,1264	4,0282	4,0645
Masa del extracto, m (g)	1,7456	1,7395	1,7433	1,7428
Sólidos totales (%)	2,77			

Nota: Valor de solidos totales presentes en el extracto en porcentaje, por S. Ayala & T. Vázquez, 2014

El valor obtenido es 2,77%; relacionado con el resultado de 2,3% en la investigación de Ibarra & Paredes, 2013. En la evaluación de Ortiz, López, Padró & Velásquez, 2009 se obtuvo resultados entre 2,376, lo que permite apreciar que la cantidad de sólidos presente por cada gramo de extracto, es similar a los obtenidos en otras investigaciones.

4.2.1.3. Determinación química

4.2.1.3.1. pH

Los resultados presentados en la tabla se obtuvieron mediante la metodología establecida en el apartado 3.4.2.4.

Tabla 15.

pH de extracto de *Ambrosia arborescens*

	Lectura			
	1	2	3	\bar{X}
Valor de pH	6,5	6,7	6,7	6,6

Nota: Resultados de la medición de pH por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Al medir el pH se obtuvo 6,6; como se ha mencionado antes los extractos no tienen valores de cotejo por lo que se establece una comparación con los datos de la investigación de Ibarra & Paredes, 2013 y Cruz, 2009 que entregan resultados de 6,8 y 6,3, respectivamente.

4.2.2. Aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* (Matico)

4.2.2.1. Determinación organoléptica

Tabla 16.

Características organolépticas de AE *Aristeguietia glutinosa*

Parámetros	Descripción
Olor	aromático
Color	amarillo claro
Aspecto	fluido

Nota: Parámetros evaluados sensorialmente, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

4.2.2.2. Determinación física

4.2.2.2.1. Densidad relativa

Los resultados presentados en la tabla se calculan mediante la Ecuación 5, establecidas en el apartado 3.5.2.2.

Tabla 17.

Densidad relativa de AE *Aristeguietia glutinosa*

	Lectura			
	1	2	3	\bar{X}
Masa del picnómetro vacío, m1 (g)	5,4071	5,4071	5,407	5,407
Masa del picnómetro con agua, m2 (g)	6,3816	6,3818	6,3818	6,382
Masa del picnómetro con la muestra, m3 (g)	6,2427	6,2426	6,2427	6,243
Densidad relativa, (g/ml)	0,86			

Nota: Valores obtenidos del cálculo de la densidad en relación masa/volumen, por S. Ayala & T. Vázquez, 2014

El valor de 0,86 g/ml obtenido es menor a 0,90 g/ml que indica un alto porcentaje de hidrocarburos terpénicos o compuestos alifáticos (Domínguez, 1976).

4.2.2.2.2. Índice de refracción

Los resultados presentados en la tabla se obtuvieron mediante la metodología establecida en el apartado 3.5.2.3.

Tabla 18.

Índice de refracción de AE *Aristeguietia glutinosa*

	Lectura			
	1	2	3	\bar{X}
Índice de refracción	1,483	1,484	1,483	1,483

Nota: Valores obtenidos de la lectura en el refractómetro, por S. Ayala & T. Vázquez, 2014

El valor 1,48 obtenido; es mayor a 1,47 es posible que haya compuestos oxigenados alifáticos (Domínguez, 1976).

4.2.2.3. Determinación química

4.2.2.3.1. pH

Los resultados presentados en la tabla se obtuvieron mediante la metodología establecida en el apartado 3.5.2.4.

Tabla 19.

pH de AE *Aristeguietia glutinosa*

	Lectura			
	1	2	3	\bar{X}
Valor de pH	5,429	5,431	5,428	5,429

Nota: Resultados de la medición de pH por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Los aceites de alta calidad presentan pH cercanos 5 (máximo de 5,8) (Rodríguez, Martínez, Téllez & Miranda, 2013), el valor obtenido en la investigación es de 5,43 lo que muestra que el aceite es de alta calidad.

4.3. Evaluación de la actividad antifúngica

Los resultados expuestos del estudio de la actividad antifúngica del extracto y AE son derivados de los promedios de las tres repeticiones realizadas con cada uno de los hongos patógenos, en los que se utilizó como blanco positivo una dilución de clotrimazol (Clz +) al 0,5% y como blanco negativo dimetilsulfóxido (DMSO -).

En la tabla 18 se muestra la obtención de las diferentes concentraciones mediante diluciones consecutivas a partir de la mayor concentración en base a las ecuaciones 8 y 9 descritas en el apartado 3.6.3.1.

Tabla 20.

Concentraciones del extracto *Ambrosia arborescens*

Concentración	Cantidad de extracto	Cantidad DMSO
700 ppm	7 mg	0,010L
Concentración	Cantidad de extracto (ml)	DMSO (ml)
600 ppm	6 (700ppm)	1
500 ppm	5 (600ppm)	1
400 ppm	4 (500ppm)	1
300 ppm	3 (400ppm)	1
200 ppm	2 (300ppm)	1
100 ppm	1 (200ppm)	1

Nota: Diluciones realizadas consecutivamente a partir de una solución inicial a 700ppm, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Los datos entregados para la elaboración de las concentraciones del extracto en ppm están bajo la consideración de la densidad del dimetilsulfóxido ($\delta_{\text{DMSO}} = 1,1 \text{ g/ml}$)

Tabla 21.

Concentraciones del AE *Aristeguietia glutinosa*

Concentración	Aceite <i>Aristeguietia glutinosa</i> (μl)	Dimetilsulfóxido (DMSO) (μl)
0,5%	2,5	497,5
1%	5,0	495,0
1,5%	7,5	492,5
2%	10,0	490,0
2,5%	12,5	487,5
3%	15,0	485,0
3,5%	17,5	482,5
4%	20,0	480,0
4,5%	22,5	477,5
5%	25,0	475,0

Nota: Diluciones a partir del aceite esencial al 100%, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

El valor alcanzado de las concentraciones está en base a la relación volumen/volumen.

4.3.1. Extracto de *Ambrosia arborescens* (Marco)

Tabla 22.

Promedio de diámetro de halos de inhibición del extracto *Ambrosia arborescens*

Concentración (ppm)	Diámetros de los halos de inhibición (mm)			
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Microsporium canis</i>	<i>Candida albicans</i>
100	13,7	13,5	17,5	11,2
200	14,7	22,0	19,4	11,1
300	22,5	24,9	28,2	10,8
400	25,9	27,6	29,1	10,9
500	26,9	29,7	40,1	11,3
600	30,8	32,9	43,5	13,1
700	32,1	35,6	40,6	10,4
Clz (+)	48,8	53,2	30,6	24,9
DMSO (-)	6,0	6,0	6,0	6,0

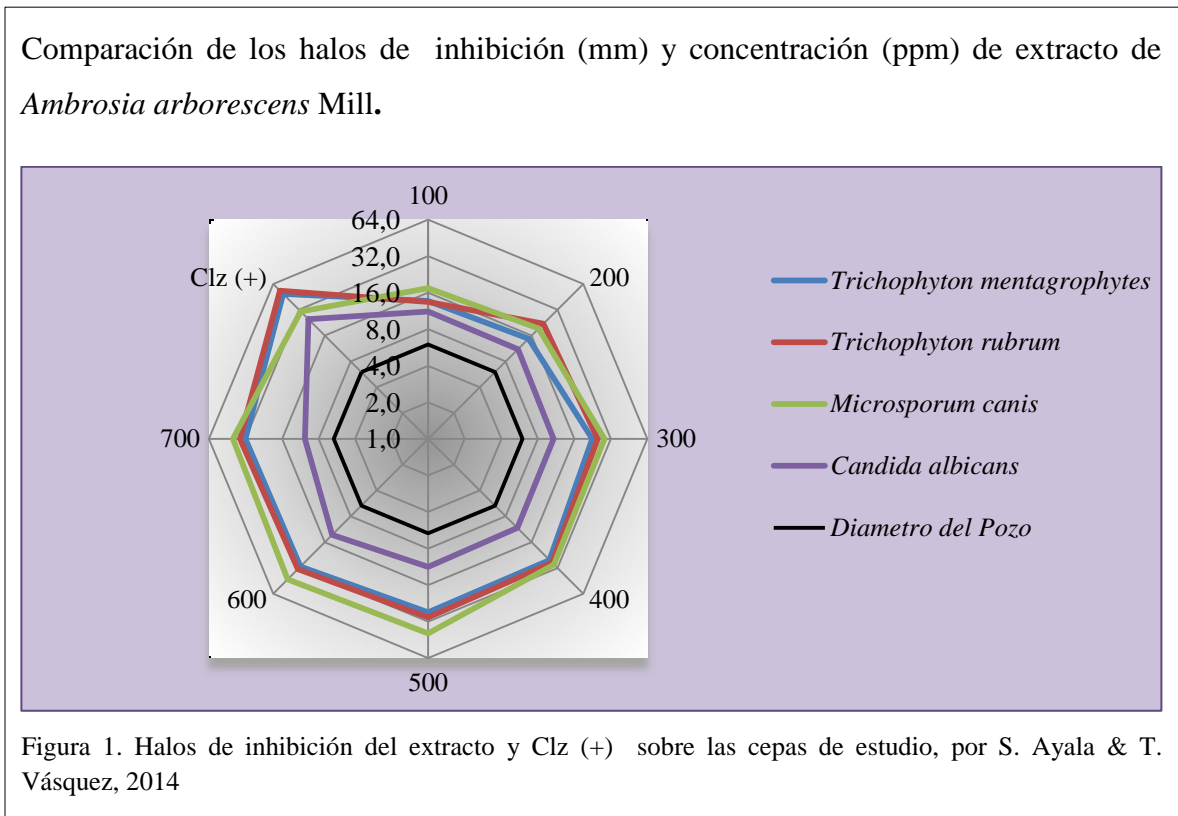
Nota: Resultados de los halos de inhibición del extracto sobre cada cepa de estudio, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

En la tabla 22. se muestra el resultado de un promedio de tres determinaciones cuyo límite de desviación está entre el 95% los mismos que se encuentran reflejados en el Anexo 15.

En la presente investigación se evidenció actividad antifúngica en cada una de las concentraciones y el blanco positivo (Clz) empleadas sobre *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis*, *Candida albicans*.

El dimetilsulfóxido destinado como blanco negativo no actúa como agente inhibidor demostrando que al ser utilizado como diluyente no influye sobre los halos de inhibición, en la tabla 22 el valor de 6 mm evidencia el tamaño del pozo.

Los resultados logrados se reflejan en la Figura 1.



La Figura 1. representa los halos de inhibición, la línea negra muestra el diámetro del pozo (6mm), donde se aprecia que existe inhibición por parte del extracto sobre las diferentes cepas, siendo mayor para el *Microsporum canis*, seguida por ambas cepas del género *Trichophyton* y obteniéndose halos menores pero aun superiores al diámetro del pozo en *Candida albicans*

4.3.2. Aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* (Matico)

Tabla 23.

Promedios de diámetro de halos de inhibición del AE *Aristeguietia glutinosa*

Concentración (%)	Diámetros de los halos de inhibición (mm)			
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Microsporum canis</i>	<i>Candida albicans</i>
0,5	6,0	6,0	6,0	9,2
1	6,1	10,7	6,9	10,2
1,5	9,1	12,3	11,5	10,5
2	9,9	12,6	13,8	11,9
2,5	11,3	14,0	13,8	10,7
3	12,3	13,7	17,9	10,9
3,5	14,2	15,6	30,7	10,7
4	11,3	15,2	33,5	10,4
4,5	12,7	17,7	37,0	10,9
5	13,2	19,0	37,8	10,7
100	16,4	22,0	15,7	6,0
Clz (+)	49,9	52,0	37,5	24,5
DMSO (-)	6,0	6,0	6,0	6,0

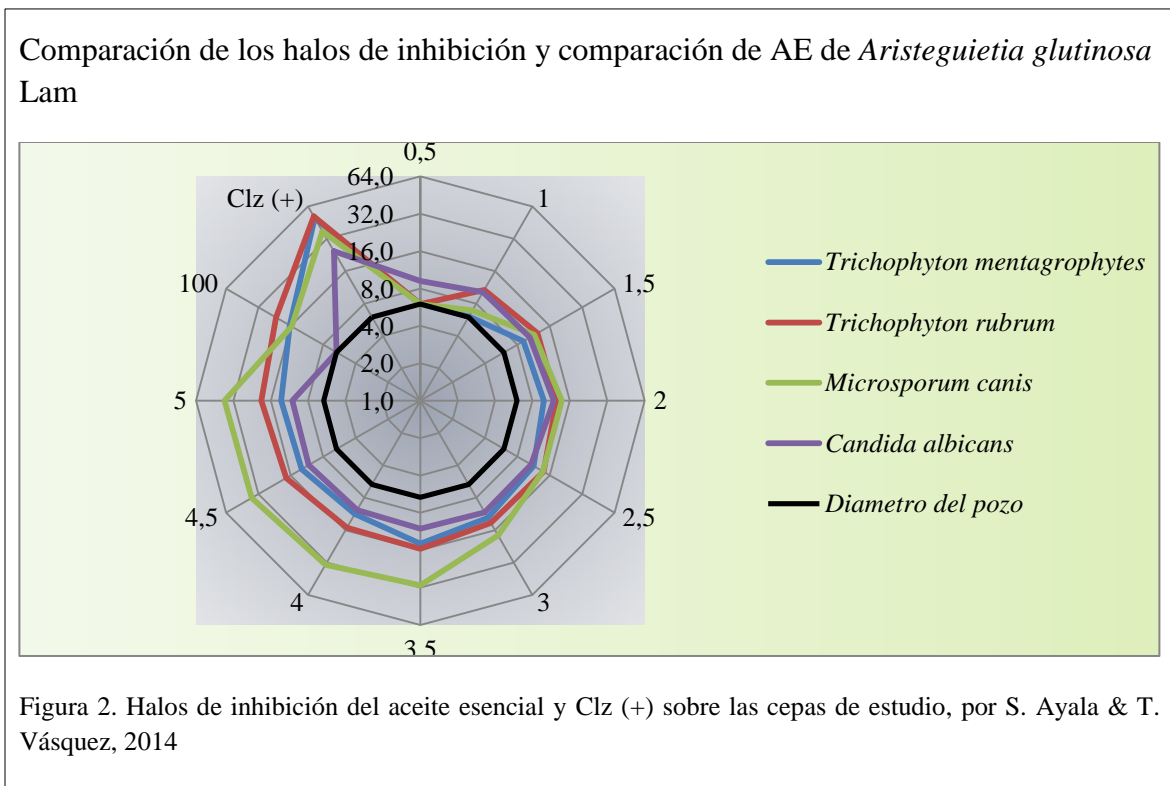
Nota: Resultados de los halos de inhibición del aceite esencial sobre cada cepa de estudio, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

En la tabla 23. se muestra el resultado de un promedio de tres determinaciones cuyo límite de desviación está entre el 95% los mismos que se encuentran reflejados en el la tabla del anexo 16.

En la presente investigación se evidencio actividad antifúngica en cada una de las concentraciones y el blanco positivo (Clz) empleadas sobre *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis*, *Candida albicans*.

El dimetilsulfóxido destinado como blanco negativo no actúa como agente inhibidor demostrando que al ser utilizado como diluyente no influye sobre los halos de inhibición.

Los resultados logrados se reflejan en la Figura 2.



La Figura 2 representa los halos de inhibición, la línea negra muestra el diámetro del pozo (6mm), donde se aprecia que existe inhibición por parte del AE sobre las diferentes cepas, siendo mayor para el *Microsporium canis* y una gran similitud entre las cepas del genero *Trichophyton* y *Candida albicans*.

4.4. Análisis estadístico

4.4.1. Extracto de *Ambrosia arborescens*

4.4.1.1. Análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía)

Los resultados presentados en las siguientes figuras se obtienen de la aplicación de las pruebas estadísticas, establecidas en el apartado 3.7.1

Análisis de varianza ANOVA de una vía del extracto de *Ambrosia arborescens* (Marco) frente a *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533

One-Way AOV for: E100 E200 E300 E400 E500 E600 E700						
Source	DF	SS	MS	F	P	
Between	6	954,858	159,143	1392,50	0,0000	
Within	14	1,600	0,114			
Total	20	956,458				
Grand Mean	23,810		CV 1,42			

Figura 3. Análisis estadístico de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del extracto de *Ambrosia arborescens* (Marco) y halos de inhibición de *Trichophyton mentagrophytes*

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test			
Variable	Mean	Homogeneous Groups	
E700	32,100	A	
E600	30,767	B	
E500	26,933	C	
E400	25,933	D	
E300	22,533	E	
E200	14,733	F	
E100	13,667	G	
Alpha	0,05	Standard Error for Comparison	0,2760
Critical Q Value	4,832	Critical Value for Comparison	0,9430
All 7 means are significantly different from one another.			

Figura 4. Análisis estadístico a posteriori de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Análisis de varianza ANOVA de una vía del extracto de *Ambrosia arborescens* (Marco) frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

One-Way AOV for: E100 E200 E300 E400 E500 E600 E700						
Source	DF	SS	MS	F	P	
Between	6	982,516	163,753	771,03	0,0000	
Within	14	2,973	0,212			
Total	20	985,490				
Grand Mean		26,595	CV		1,73	

Figura 5. Análisis estadístico de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del extracto de *Ambrosia arborescens* (Marco) y halos de inhibición de *Trichophyton rubrum*

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test			
Variable	Mean	Homogeneous Groups	
E700	35,600	A	
E600	32,900	B	
E500	29,667	C	
E400	27,633	D	
E300	24,867	E	
E200	22,033	F	
E100	13,467	G	
Alpha	0,05	Standard Error for Comparison	0,3763
Critical Q Value	4,832	Critical Value for Comparison	1,2856
All 7 means are significantly different from one another.			

Figura 6. Análisis estadístico a posteriori de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Análisis de varianza ANOVA de una vía del extracto de *Ambrosia arborescens* (Marco) frente a *Microsporum canis* ATCC 36299

One-Way AOV for: E100 E200 E300 E400 E500 E600 E700						
Source	DF	SS	MS	F	P	
Between	6	1981,44	330,239	295,74	0,0000	
Within	14	15,63	1,117			
Total	20	1997,07				
Grand Mean		31,195	CV		3,39	

Figura 7. Análisis estadístico de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del extracto de *Ambrosia arborescens* (Marco) y halos de inhibición de *Microsporium canis*

```

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable      Mean  Homogeneous Groups
E600          43,467  A
E700          40,600  AB
E500          40,133  B
E400          29,100  C
E300          28,233  C
E200          19,367  D
E100          17,467  D

Alpha          0,05      Standard Error for Comparison  0,8628
Critical Q Value  4,832      Critical Value for Comparison  2,9478
There are 4 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.
    
```

Figura 8. Análisis estadístico a posteriori de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Análisis de varianza ANOVA de una vía del extracto de *Ambrosia arborescens* (Marco) frente a *Candida albicans* ATCC 10231

```

One-Way AOV for: E100 E200 E300 E400 E500 E600 E700

Source      DF      SS      MS      F      P
Between     6    13,9268  2,32113  28,19  0,0000
Within     14     1,1527  0,08234
Total      20    15,0795

Grand Mean 11,272      CV 2,55
    
```

Figura 9. Análisis estadístico de los resultados de la e investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del extracto de *Ambrosia arborescens* (Marco) y halos de inhibición de *Candida albicans*

```

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test

Variable      Mean  Homogeneous Groups
E600          13,133  A
E500          11,333  B
E100          11,233  B
E200          11,137  BC
E400          10,900  BC
E300          10,767  BC
E700          10,400  C

Alpha          0,05      Standard Error for Comparison  0,2343
Critical Q Value  4,832      Critical Value for Comparison  0,8005
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means
are not significantly different from one another.
    
```

Figura 10. Análisis estadístico a posteriori de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

En el análisis estadístico ANOVA de un factor se considera a las concentraciones del extracto como E100, E200, E300, E400, E500, E600 y E700.

El análisis presentó como resultados un probabilístico de $p= 0,000$ que es menor al α (0,05) para todas las cepas de estudio, *Trichophyton mentagrophytes*, *rubrum*, *Microsporium canis*, así como, también para *Candida albicans*, se cumplen los parámetros establecidos en el apartado 3.7.1. permitiendo de esta manera aceptar la hipótesis alternativa, el extracto de *Ambrosia arborescens* (marco) tiene actividad antifúngica sobre hongos patógenos causantes de la dermatomicosis.

El test a posteriori Tukey para *Trichophyton mentagrophytes* mostró una mayor inhibición en las concentraciones de 700 ppm con un halo de 32,1 mm y no se observó homogeneidad entre los 7 grupos de análisis.

Para *Trichophyton rubrum* existen 7 grupos los cuales no son significativamente diferentes, entre ellos se mostró el mayor halo de inhibición a 700 ppm con un halo de 35,6mm.

Microsporium canis contiene 4 grupos, A, B, C, D, la mayor homogeneidad se encontró en las concentraciones de 700, 600 y 500 ppm donde el mayor halo de inhibición está en la concentración de 600 ppm.

Para las cepas antes mencionadas el halo de inhibición menor se encontró a concentraciones de 100 ppm con halos superiores al diámetro del pozo.

Candida albicans posee tres grupos, A, B, C, donde se mostró homogeneidad entre las concentraciones de 200, 300 y 400 ppm, sin embargo se destaca que las mayores concentraciones se observaron en las concentraciones de 600 ppm y la menor con un halo de 10,40 a 100 ppm, el test de Tukey mostró en realidad homogeneidad entre casi todas las concentraciones.

4.4.1.2. Análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías)

Los resultados presentados en las siguientes tablas se obtienen de la aplicación de las pruebas estadísticas, establecidas en el apartado 3.7.2

Análisis de varianza ANOVA de dos vías del extracto de *Ambrosia arborescens* (Marco) frente a *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299, *Candida albicans* ATCC 10231

Statistix 10,0 (30-day Trial)

Analysis of Variance Table for HALOS

Source	DF	SS	MS	F	P
CEPAS	3	1529,86	509,952	24,16	0,0000
EXT	6	929,12	154,854	7,34	0,0004
Error	18	379,95	21,108		
Total	27	2838,93			

Grand Mean 23,214
CV 19,79

Tukey's 1 Degree of Freedom Test for Nonadditivity

Source	DF	SS	MS	F	P
Nonadditivity	1	319,111	319,111	89,16	0,0000
Remainder	17	60,842	3,579		

Figura 11. Análisis estadístico de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

El análisis estadístico ANOVA de dos factores dió como resultado un probabilístico de $p = 0,000$ que es menor al $\alpha (0,05)$ y el estadístico de la prueba F es de 24,16 mayor al F_t de 4,76 de los valores de F en tabla, Yáñez, 2010 (Anexo 17).

Se cumplen los parámetros establecidos en el apartados 3.7.2. y se acepta la hipótesis alternativa, es decir, el extracto de Marco (*Ambrosia arborescens* Mill.), presenta actividad antifúngica.

Una vez aceptada la hipótesis alternativa se realizó el Test de Tukey *a posteriori* para demostrar si existe o no una diferencia significativa entre los halos de inhibición, a continuación se evidencia en la Figura 12 y 13.

Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del extracto de *Ambrosia arborescens* (Marco) y halos de inhibición

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of HALOS for EXT			
EXT	Mean	Homogeneous Groups	
600	30,075	A	
700	29,675	A	
500	27,000	AB	
400	23,375	ABC	
300	21,600	ABC	
200	16,800	BC	
100	13,975	C	
Alpha	0,05	Standard Error for Comparison	3,2487
Critical Q Value	4,674	Critical Value for Comparison	10,736
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.			

Figura 12. Análisis estadístico a posteriori de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

El test evidenció la existencia de 3 grupos A, B y C el grupo A conformado por las concentraciones de 700 a 300 ppm; el grupo B conformado por las concentraciones de 500 a 200 ppm. y el grupo C conformado por las concentraciones de 400 a 100 ppm Los promedios de halos de inhibición que presentan mayor homogeneidad son a concentraciones de 400 y 300 ppm (ABC) demostrando ser más eficaces en todos los dermatófitos estudiados (Anexo 18).

Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299, *Candida albicans* ATCC 10231 y halos de inhibición del extracto

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of HALOS for CEPAS			
CEPAS	Mean	Homogeneous Groups	
3	31,200	A	
2	26,600	AB	
1	23,800	B	
4	11,257	C	
Alpha	0,05	Standard Error for Comparison	2,4558
Critical Q Value	3,997	Critical Value for Comparison	6,9416
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.			

Figura 13. Análisis estadístico a posteriori de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

El test evidenció la existencia de tres grupos A, B y C, el grupo A conformado por 3 y 2 siendo *Microsporium canis* y *Trichophyton rubrum* respectivamente, el grupo B conformado por 2 y 1 siendo *Trichophyton rubrum* y *Trichopyton mentagrophytes* respectivamente y el grupo C conformado por 4 siendo *Candida albicans*. El promedio de inhibición más evidente se ve sobre *Microsporium canis* con un promedio de 31,20 mm.

Los resultados evidenciados se observan en la Figura 14.

Relación de los halos de inhibición y concentración del extracto de *Ambrosia arborescens* Mill.

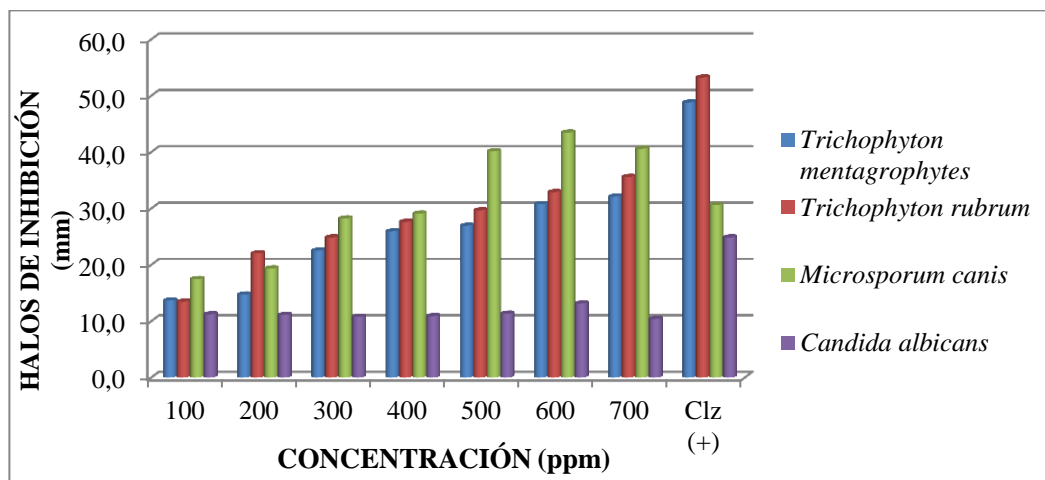


Figura 14. Inhibición demostrada por el extracto a distintas concentraciones, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

En la Figura 14. Se muestra mayor homogeneidad en los resultados obtenidos en los halos de inhibición para concentraciones de 300ppm y 400 ppm, donde se destacan halos desde los 20 hasta los 30 mm para cada una de las cepas de estudio, mostrando que *Candida albicans* no supera halos de 10 mm en todas las concentraciones a excepción del blanco positivo.

4.4.1.3. Porcentaje de inhibición relativa de *Ambrosia arborescens*

Los resultados presentados en las siguientes tablas se calculan de la Ecuación 10, establecidas en el apartado 3.7.3.

Tabla 24.

Porcentaje de inhibición relativa del extracto de *Ambrosia Arborescens* frente al Clotrimazol

EXTRACTO <i>Ambrosia arborescens</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Microsporum canis</i>	<i>Candida albicans</i>
Halo (máx efecto inhibitorio) (mm)	32,1	35,6	43,5	13,1
Halo Control positivo, Clz (mm)	48,8	53,2	30,6	24,9
Halo Control negativo, DMSO (mm)	6	6	6	6
% Inhibición relativa	60,98	62,67	152,30	37,81

Nota: Inhibición relativa en porcentaje del extracto en función de los resultados del control positivo, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Al analizar la Tabla 24, se muestran los porcentajes de inhibición relativa del extracto frente al control positivo Clotrimazol (Clz+), se observó que muestra una significativa actividad antifúngica.

El extracto presenta mayor porcentaje de inhibición en el *Microsporum canis*, corroborando el resultado obtenido en el test de Tukey en el apartado 4.4.1.2. en la Figura 13, así como también sobre las cepas de *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Candida albicans*.

El extracto es superior al efecto de clotrimazol en un 52.3% en *Microsporum canis*.

El extracto presenta una efectividad frente al *Trichophyton sp.* de 61% aprox. en relación al clotrimazol considerado al 100%. Bajo estas condiciones el extracto presentó una efectividad de 37.8% sobre *Candida albicans*.

Porcentaje de inhibición relativa del extracto de *Ambrosia arborescens* frente al control positivo, Clz

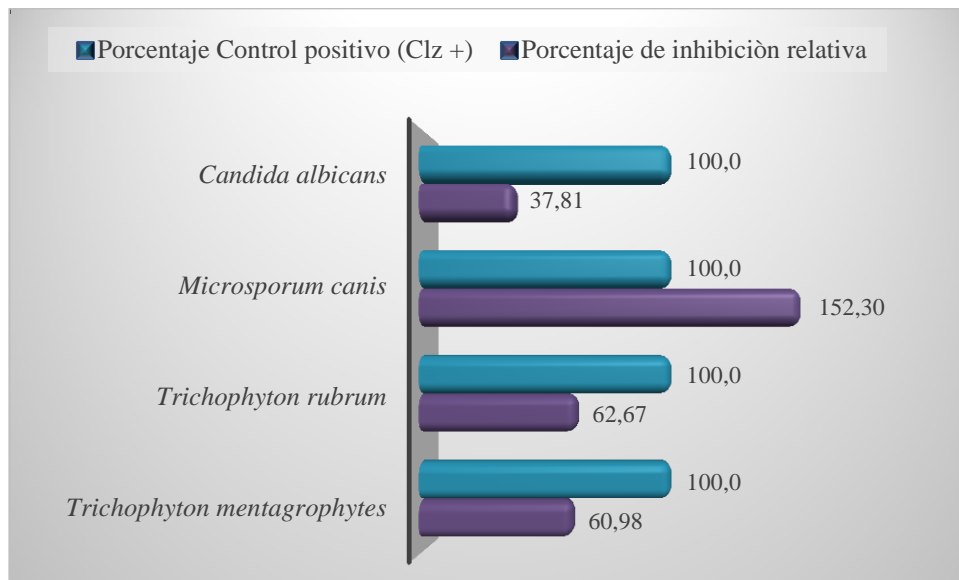


Figura 15. Porcentaje de inhibición relativa del extracto y el Clz (+) sobre las cepas de estudio, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

En la Figura 15, se observa los halos de inhibición en relación al blanco positivo, donde, se ha tomado el mayor halo de inhibición causado por el clotrimazol para cada una de las cepas como un 100% y se ha realizado un análisis comparativo entre los halos obtenidos en el estudio, los cuales se están evidenciando en un gráfico de barra. Las cepas de *Trichophyton* tuvieron porcentajes de inhibición relativa aproximadamente del 60%, así como también se aprecia que el extracto de *Ambrosia arborescens* presenta un mayor halo de inhibición que el control positivo Clotrimazol sobre *Microsporium canis*. y *Candida albicans* presento menor halo de inhibición.

4.4.2. Aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* (Matico)

4.4.2.1. Análisis de varianza de una vía (ANOVA de una vía)

Análisis de varianza ANOVA de una vía del aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* (Matico) frente a *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533

One-Way AOV for: AE05 AE1 AE15 AE2 AE25 AE3 AE35 AE4 AE45 AE5					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	223,074	24,7860	3,37	0,0113
Within	20	146,954	7,3477		
Total	29	370,027			
Grand Mean		10,978	CV 24,69		

Figura 16. Análisis estadístico de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* (Matico) y halos de inhibición de *Trichophyton mentagrophytes*

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test			
Variable	Mean	Homogeneous Groups	
AE5	16,400	A	
AE45	13,200	AB	
AE4	12,667	AB	
AE25	11,873	AB	
AE35	11,333	AB	
AE2	10,800	AB	
AE15	9,7667	AB	
AE3	9,6100	AB	
AE1	8,1333	B	
AE05	6,0000	B	
Alpha	0,05	Standard Error for Comparison	2,2132
Critical Q Value	5,007	Critical Value for Comparison	7,8361
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.			

Figura 17. Análisis estadístico a posteriori de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Análisis de varianza ANOVA de una vía del aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* (Matico) frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

One-Way AOV for: AE05 AE1 AE15 AE2 AE25 AE3 AE35 AE4 AE45 AE5					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	366,054	40,6726	288,46	0,0000
Within	20	2,820	0,1410		
Total	29	368,874			
Grand Mean		13,677	CV 2,75		

Figura 18. Análisis estadístico de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* (Matico) y halos de inhibición de *Trichophyton rubrum*

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test			
Variable	Mean	Homogeneous Groups	
AE5	19,033	A	
AE45	17,700	B	
AE35	15,600	C	
AE4	15,200	C	
AE25	14,000	D	
AE3	13,700	D	
AE2	12,567	E	
AE15	12,267	E	
AE1	10,700	F	
AE05	6,0000	G	
Alpha	0,05	Standard Error for Comparison	0,3066
Critical Q Value	5,007	Critical Value for Comparison	1,0855
There are 7 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.			

Figura 19. Análisis estadístico a posteriori de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Análisis de varianza ANOVA de una vía del aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* (Matico) frente a *Microsporium canis* ATCC 36299

One-Way AOV for: AE05 AE1 AE15 AE2 AE25 AE3 AE35 AE4 AE45 AE5					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	4249,58	472,175	2920,67	0,0000
Within	20	3,23	0,162		
Total	29	4252,81			
Grand Mean		20,903	CV 1,92		

Figura 20. Análisis estadístico de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* (Matico) y halos de inhibición de *Microsporium canis*

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test			
Variable	Mean	Homogeneous Groups	
AE5	37,833	A	
AE45	37,033	A	
AE4	33,533	B	
AE35	30,667	C	
AE3	17,867	D	
AE2	13,833	E	
AE25	13,833	E	
AE15	11,500	F	
AE1	6,9333	G	
AE05	6,0000	G	
Alpha	0,05	Standard Error for Comparison	0,3283
Critical Q Value	5,007	Critical Value for Comparison	1,1623
There are 7 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.			

Figura 21. Análisis estadístico a posteriori de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Análisis de varianza ANOVA de una vía del aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* (Matico) frente a *Candida albicans* ATCC 10231

One-Way AOV for: AE05 AE1 AE15 AE2 AE25 AE3 AE35 AE4 AE45 AE5					
Source	DF	SS	MS	F	P
Between	9	12,2747	1,36385	20,36	0,0000
Within	20	1,3400	0,06700		
Total	29	13,6147			
Grand Mean		10,613	CV 2,44		

Figura 22. Análisis estadístico de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* (Matico) y halos de inhibición de *Candida albicans*

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test			
Variable	Mean	Homogeneous Groups	
AE2	11,900	A	
AE3	10,900	B	
AE45	10,900	B	
AE35	10,733	B	
AE25	10,733	B	
AE5	10,700	B	
AE15	10,467	B	
AE4	10,400	B	
AE1	10,200	B	
AE05	9,2000	C	
Alpha	0,05	Standard Error for Comparison	0,2113
Critical Q Value	5,007	Critical Value for Comparison	0,7483
There are 3 groups (A, B, etc.) in which the means are not significantly different from one another.			

Figura 23. Análisis estadístico a posteriori de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

En el análisis estadístico ANOVA de un factor se considera a las concentraciones del Aceite esencial como AE, donde:

AE05: aceite esencial al 0,5%
AE1: aceite esencial al 1%
AE15: aceite esencial al 1,5%
AE2: aceite esencial al 2%
AE25: aceite esencial al 2,5%
AE3: aceite esencial al 3%
AE35: aceite esencial al 3,5%
AE4: aceite esencial al 4%
AE45: aceite esencial al 4,5%
AE5: aceite esencial al 5%

El análisis presentó en la cepa de *Trichophyton mentagrophytes* un resultado probabilístico de $p= 0,0113$ que es menor al $\alpha (0,05)$ así como para las demás cepas *Trichophyton rubrum* , *Microsporum canis* y *Candida albicans* un probabilístico de $p= 0,000$ que también es menor al $\alpha (0,05)$ aceptando la hipótesis alternativa, el aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* (Matico) tiene actividad antifúngica sobre hongos patógenos causantes de la dermatomicosis.

El test a posteriori Tukey para *Trichophyton mentagrophytes* mostró dos grupos uno en el que se encuentra el mayor halo de inhibición a 5% y una homogeneidad desde las concentraciones de 1,5 a 4,5%.

Para *Trichophyton rubrum* existen 7 grupos donde se observó que los mayores halos de inhibición se encuentra al 5% con un halo de 19.0 mm. Se apreció homogeneidad en el grupo C con 3,5 y 4%, el grupo D compuesto por 2,5 y 3%, así como en el grupo E con 1,5 y 2%.

Microsporum canis contiene 7 grupos, la mayor homogeneidad estuvo representada por el Grupo A en 4,5 y 5% observando halos de inhibición de 37,033 y 7,833 mm, respectivamente.

Candida albicans posee tres grupos, A,B,C, donde el grupo mostró homogeneidad entre las concentraciones de 1; 1,5; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5 y 5%, el mayor halo de inhibición en esta cepa se encuentra a concentraciones de 2% con un halo de 11,9 mm.

Para todas la cepas que se han investigado el menor halo de inhibición se obtuvo a la mínima concentración de 0,5% con halos iguales al diámetro del pozo, excepto en

Candida albicans donde el menor halo de inhibición alcanza los 9,2 mm con 0,5% de AE.

4.4.2.2. Análisis de varianza de dos vías (ANOVA de dos vías)

Análisis de varianza ANOVA de dos vías del AE de *Aristeguietia glutinosa* (Matico) frente a *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporium canis* ATCC 36299, *Candida albicans* ATCC 10231

Analysis of Variance Table for HALOS					
Source	DF	SS	MS	F	P
CEPAS	3	705,477	235,159	8,23	0,0004
ACEITE	5	727,645	145,529	5,09	0,0016
Error	31	885,878	28,577		
Total	39				

Note: SS are marginal (type III) sums of squares

Grand Mean 13,871
CV 38,54

Figura 24. Análisis estadístico de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

El análisis estadístico ANOVA de dos factores dio como resultado un probabilístico de $p = 0,0004$ que es menor al $\alpha (0,05)$ y el estadístico de la prueba F es de 8,23 mayor al F_t de 5,41 de los valores de F en tabla, Yáñez, 2010 (Anexo 17).

Se cumplen los parámetros establecidos en el apartados 3.7.2. y se acepta la hipótesis alternativa, es decir, El AE de Matico (*Aristeguietia glutinosa* Lam.), presenta actividad antifúngica. Una vez aceptada la hipótesis alternativa se realizó el Test de Tukey a posteriori para demostrar si existe o no, una diferencia significativa entre los halos de inhibición, que se presentan a continuación en las Figuras 25 y 26.

Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons del AE de *Aristeguietia glutinosa* (Matico) y halos de inhibición

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of HALOS for ACEITE			
ACEITE	Mean	Homogeneous Groups	
5	20,175	A	
4	18,588	A	
3	15,750	AB	
2	12,250	AB	
1	9,663	B	
0	6,800	B	
Alpha	0,05	Standard Error for Comparison	2,6729 TO 3,7800
Critical Q Value	4,292	Critical Value for Comparison	8,1124 TO 11,473
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.			

Figura 25. Análisis estadístico a posteriori de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

El test evidenció la existencia de dos grupos A y B, el grupo A conformado por las concentraciones de 5 a 2% y el grupo B conformado por las concentraciones de 3 a 0,5%. Los promedios de halos de inhibición que presentan mayor homogeneidad son a concentraciones de 3 a 2% (AB) demostrando ser más eficaces en todos los dermatófitos estudiados (Anexo 19).

Test de Tukey HSD All- Pairwise Comparisons de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299, *Candida albicans* ATCC 10231 y los halos de inhibición del AE

Tukey HSD All-Pairwise Comparisons Test of HALOS for CEPAS			
CEPAS	Mean	Homogeneous Groups	
3	20,813	A	
2	13,603	B	
1	10,533	B	
4	10,533	B	
Alpha	0,05	Standard Error for Comparison	2,3907
Critical Q Value	3,839	Critical Value for Comparison	6,4902
There are 2 groups (A and B) in which the means are not significantly different from one another.			

Figura 26. Análisis estadístico a posteriori de los resultados de la investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

El test evidenció la existencia de dos grupos A y B, el grupo A conformado por 3 siendo *Microsporium canis*, el grupo B conformado por 4, 2 y 1 siendo *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. El promedio de inhibición más evidente se ve sobre *Microsporium canis* con un promedio de 20,81 mm.

Los resultados evidenciados se observan en la Figura 27.

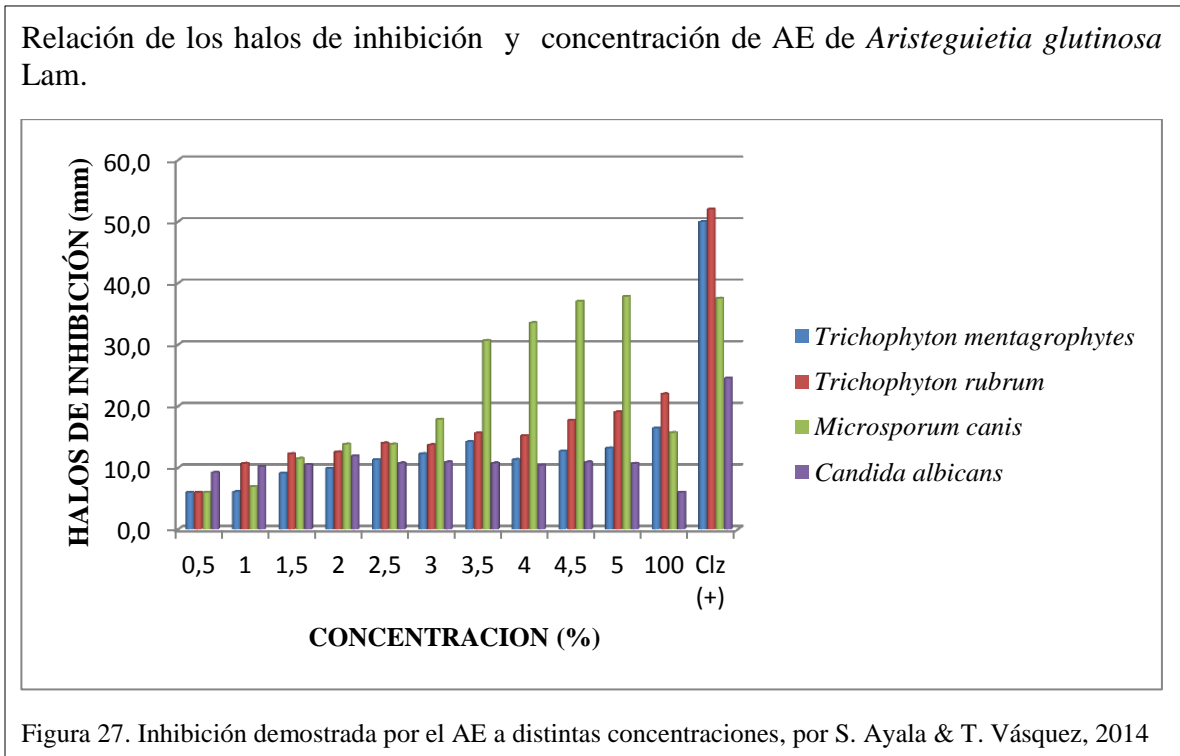


Figura 27. Inhibición demostrada por el AE a distintas concentraciones, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

En la Figura 27. la homogeneidad de resultados en los halos de inhibición se presenta para concentraciones de 2; 2,5 y 3%, los cuales oscilan entre 10 y 20 mm, y aunque se puede observar halos mayores en concentraciones más altas, el efecto que presenta el AE en cada una de las cepas no son semejantes. Para el blanco positivo, Clotrimazol, la inhibición alcanzada es superior a todas las concentraciones estudiadas, también se evidencia que, en una concentración al 100 % los halos no son mayores que en los obtenidos al 5%

4.4.2.3. Aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* (Matico)

Tabla 25.

Porcentaje de inhibición relativa del AE de *Aristeguietia glutinosa* frente al Clotrimazol

<i>AE Aristeguietia glutinosa</i>	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Microsporum canis</i>	<i>Candida albicans</i>
Halo (max efecto inhibitorio) (mm)	14,2	19,03	37,83	11,90
Halo Control positivo, Clz (mm)	49,9	52,0	37,5	24,5
Halo Control negativo, DMSO (mm)	6,00	6,00	6,00	6,00
% Inhibición relativa	18,66	28,33	100,95	31,83

Nota: Inhibición relativa en porcentaje del AE en función de los resultados del control positivo, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Al analizar la Tabla 25, se muestran los porcentajes de inhibición relativa del AE de *Aristeguietia glutinosa* frente al control positivo Clotrimazol (Clz+), el AE presenta mayor porcentaje de inhibición en el *Microsporum canis*, corroborando el resultado obtenido en el test de Tukey en el apartado 4.4.2.2. en la figura 26, que sobre las cepas de *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Candida albicans*.

El AE es superior al efecto de clotrimazol en un 0.95% en *Microsporum canis*.

El AE presenta una efectividad frente al *Trichophyton mentagrophytes* de 18.6% y al *Trichophyton rubrum* de 28.3% y una efectividad de 31.8% sobre *Candida albicans* en relación al clotrimazol considerado al 100%.

Porcentaje de inhibición relativa del AE *Aristeguetia glutinosa* frente al control positivo, Clz

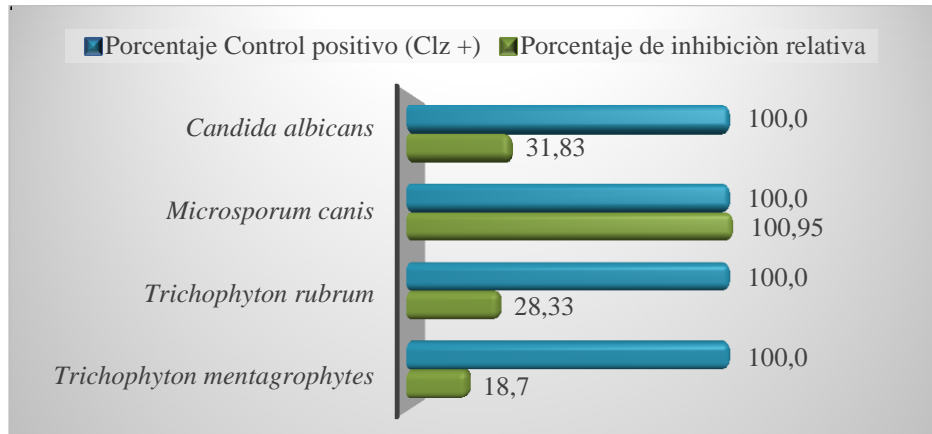


Figura 28. Porcentaje de inhibición relativa del AE sobre las cepas de estudio, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

En la Figura 28, se observó un porcentaje de inhibición relativa, en el caso de *Microsporium canis* un 100% causado por el AE *Aristeguetia glutinosa* igual a la inhibición generada por el clotrimazol, en las cepas del genero *Trichophyton* y *Candida albicans* se demostró una inhibición relativa del 27% aproximadamente.

CONCLUSIONES

- Se obtuvo extracto de *Ambrosia arborescens* Mill. (Marco) por proceso de maceración alcanzando un rendimiento de 3,9%, y aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* Lam. (Matico) por destilación de arrastre de vapor con un rendimiento de 0,97%, el control de calidad comprobó que el extracto y el aceite esencial están dentro de datos referenciados en otros estudios.
- Se acepta las hipótesis planteadas, el análisis ANOVA de una vía para el extracto de *Ambrosia arborescens* Mill. (Marco) confirma actividad antifúngica en todas las concentraciones de estudio, así como, para el AE *Aristeguietia glutinosa* (Matico) sobre las cepas de estudio *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, *Microsporum canis* ATCC 36299 y *Candida albicans* ATCC 10231.
- La evaluación de la actividad antifúngica del extracto *Ambrosia arborescens* demostró inhibición en los dermatófitos de estudio, en cada una de las concentraciones planteadas (100 a 700 ppm), la discriminación de datos del test de Tukey, posterior al Anova de una vía, demostró que las concentraciones más efectivas fueron a 700ppm para *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, y de 600ppm para *Microsporum canis* y *Candida albicans*.
- El análisis estadístico Anova de dos vías probó que el extracto presentó una mayor homogeneidad a concentraciones de 300 y 400 ppm sobre los dermatófitos de estudio respecto a las otras concentraciones obteniéndose un promedio de halos de 23,37 mm.
- La evaluación de la actividad antifúngica del AE de *Aristeguietia glutinosa* demostró inhibición en los dermatófitos de estudio, en cada una de las concentraciones planteadas (0,5 a 5%), la discriminación de datos del test de Tukey, posterior al Anova de una vía, demostró que las concentraciones más efectivas

fueron a 5% para *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, de 4,5 y 5% para *Microsporum canis* y de 2% para *Candida albicans*.

- El análisis de varianza Anova de dos vías probó que el AE posee mayor uniformidad de inhibición a 2; 2,5 y 3 % en relación a las demás concentraciones, por lo que se determinó un promedio de halos de 15,75 mm sobre los dermatófitos estudiados.
- La relación en porcentaje de inhibición del extracto y del AE tomando como referencia al clotrimazol por ser un antifúngico de amplio espectro, determina que los dos componentes naturales presentan un efecto inhibitorio para el caso de *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* y *Candida albicans* indico altos porcentajes de inhibición relativa, 60 % para el extracto, 30 % para el aceite; así como, una rendimiento superior del extracto y aceite frente a *Microsporum canis* sobrepasando el mayor halo de inhibición obtenido por el clotrimazol.
- El efecto antifúngico probado *in vitro* permite concluir que ambas especies utilizadas, pueden ser utilizadas en formulaciones tanto de productos cosméticos como medicamentos para tratar dermatomicosis superficiales.

RECOMENDACIONES

- Ecuador es megadiverso y pluriétnico, por esta razón, es indispensable aprovechar los saberes ancestrales, la investigación realizada sobre el extracto de *Ambrosia arborescens* Mill. y el aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* Lam. establece un precedente científico, ya que valida el potencial uso terapéutico de estas especies, su obtención racional y sustentable, pudiendo ser aplicado en la formulación de productos de naturaleza cosmética, farmacéutica o cosmeceúticas.
- Debido a investigaciones previas y la presente, se plantea la posibilidad de evaluar la actividad conservante de *Ambrosia arborescens* Mill. (Marco) y *Aristeguietia glutinosa* Lam. (Matico), para ser utilizado como preservarte natural.
- Se propone la investigación de *Ambrosia arborescens* Mill. (Marco) y *Aristeguietia glutinosa* Lam. (Matico) como agentes antivirales y citotóxicos aún no estudiados, de igual manera su acción como control biológico en el manejo integral de plagas y enfermedades.
- La actividad presentada por *Ambrosia arborescens* Mill. (Marco) y *Aristeguietia glutinosa* Lam. (Matico) permite continuar los estudios sobre los demás hongos patógenos causantes de enfermedades micóticas superficiales, subcutáneas y sistémicas comunes en nuestro país y el resto del mundo.
- Si se llega a elaborar un producto es necesario realizar estudios en formulación que impliquen estabilidad de producto, pruebas de irritabilidad cutánea, que permitan consolidar el desarrollo de la industria puesto que es importante obtener productos naturales de alta calidad, a partir de especies vegetales de la región, contribuyendo al fortalecimiento de la matriz productiva.

LISTA DE REFERENCIAS

- AIDSMEDS. (17 de abril de 2009). *Candidiasis (candidiasis oral; candidiasis vaginal; candidiasis esofágica)*. Recuperado el 18 de junio de 2014, de www.aidsmeds.com/articles/candidiasis
- Al-Doory, Y. (1980). *Laboratory Medical Mycology*. Filadelfia, Estados Unidos: Lea & Febiger.
- Alvarado, B. (2007). Plantas medicinales de la Cordillera Negra. *Revista Académica Perú Salud*.
- Andrews, M. (2001). Determination of Minimum Inhibitory Concentration. *Journal Antimicrobial Chemotherapy*.
- Arenas, R. (2008). *Micología Medica Ilustrada* (Tercera ed.). México D.F, México: McGraw-Hill.
- Bastidas, O. (2012). Conteo de la cámara de Neubauer. *Technical Note*, 1-5.
- Bauer, A., Kirby, W., Sherris, J., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*.
- Biggs, W., & Williams, R. (2009). Common gynecologic infections. *Prim care*.
- Bos, T., & Somers, K. (2008). *USMLE Road map: Microbiología y enfermedades infecciosas* (Primera ed.). México: McGraw-Hill.
- Bravo, L. (2014). *¿Por qué está prohibido el ajeno?* Recuperado el 16 de junio de 2014, de es.scribd.com/doc
- Brooks, G., Butel, J., & Morse, S. (2005). *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg* (Décimo octava ed.). México: Manual Moderno.
- Brooks, G., Morse, S., Carroll, K., Mietzner, T., & Butel, J. (2010). *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology* (Twenty-Fifth ed.). New York: McGraw-Hill.

- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia: Fitoquímica, Plantas medicinales* (Tercera ed.). Zaragoza, España: Acribia.
- Bruneton, J. (2004). *Fitoterapia*. Zaragoza: Acribia.
- Buestan, A., Guaraca, A.(2013). *Actividad Anti-inflamatoria de los extractos de plantas medicinales empleados en el Austro Ecuatoriano en el modelo de Danio rerio*. Tesis de Bioquímico Farmacéutico no publicada. Universidad de Cuenca. Cuenca-Ecuador.
- Centro de Investigaciones Hidráulicas. (2006). Procedimiento para la Medición de Sólidos Totales. En *Laboratorio de Sistemas Ambientales*. Panamá: Universidad Tecnológica de Panamá.
- Centro Nacional de Investigaciones para la Agroindustrialización de Especies Vegetales Aromáticas y Medicinales Tropicales. (2008). *Aplicaciones de los aceites esenciales y compuestos naturales en productos cosmecéuticos para el cuidado de la piel*. Bogotá: COLCIENCIAS.
- Cerpa, M. (2007). *Hidrodestilación de Aceites Esenciales: Modelado y Caracterización*. Tesis Doctoral de Ingeniero Químico no publicada, Universidad de Valladolid, Valladolid, España.
- Chiriboga, X. (2010). Validación de plantas medicinales del Ecuador. En P. Naranjo, & P. Naranjo (Ed.), *Etnomedicina y etnobotánica: avances en la investigación* (Primera ed., Vol. 1, Quito, Ecuador: Abya-Yala.
- Cuamácas, B., & Tipaz, G. (1995). *Árboles de los bosques interandinos del norte del Ecuador*. Quito: Casa de la Cultura Ecuatoriana.
- De la Torre, L., Navarrete, H., Muriel, P., Macía, M., & Balslev, H. (2008). *Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador*. Quito y Aarhus: Herbario QCA y Herbario de la Escuela de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Herbario AAU del Departamento de Ciencias Biológicas de la Universidad de Aarhus.

- DiSalvo, A. (1983). *Occupational Mycoses*. Filadelfia, Estados Unidos : Lea & Febiger.
- Dominguez, X. (1973). *Métodos de investigación fitoquímica* (Primera ed.). México, México: Limusa.
- Embajada del Ecuador en la República Popular China. (31 de octubre de 2012). *Clima, Flora y Fauna del Ecuador*. Recuperado el 2014 de abril de 21, de www.ecuadorenchina.org.ec/ecuador/clima-flora-y-fauna
- Escuela Politécnica de Ingeniería de Minas y Energía. (2006). Práctica N°4: Cálculo de la densidad. En *Física I*. Torrelavega: Universidad de Cantabria.
- FDA. (2011). *Clotrimazole official FDA information, side effects and uses*. . Sellersville: FDA.
- Fernández, R., Segundo, C., Arenas, R., da Silva, D., & Guzmán, A. (2002). Determinación de las variedades de Trichophyton mentagrophytes en 10 casos de dermatofitosis de Paraguay. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*.
- García, P., Fernández, M., & Paredes, F. (1997). *Microbiología clínica aplicada*. Madrid, España: Díaz de Santos, S.A.
- Gilbert, D., Moellering, R., Eliopoulos, G., Chambers, H., & Saag, M. (2010). *The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy* (Cuarentava ed.). Virginia, Estados Unidos: Antimicrobial Therapy Inc.
- Guadarrama, B., Buendía, L., Orozco, J., Estrada, M., & Cruz, F. (2012). Producción en cultivos in vitro de los componentes principales del aceite esencial de Lavandula angustifolia. *Revista Latinoamericana de Química*.
- Günther, E. (1948). History and origin in Plants Production Analysis. *The Essential Oils, I*.
- Gupta, M. (1995). *270 Plantas medicinales Iberoamericanas*. Bogotá: Convenio Andrés Bello.

- Gupta, M. (2006). *Medicinal plants originating in the andean high plateau and central valleys region of Bolivia, Ecuador, Perú*. Panamá: United Nations Industrial Development Organization.
- Hernández, R., & Gally, M. (2011). *Plantas Medicinales*. México: Árbol.
- Ibarra, M., y Paredes, E. (Julio de 2013). *Eficacia antibacteriana in vitro de Marco (Ambrosia arborescens Mill) y Paico (Chenopodium ambrosioides L.) en una formulación cosmética*. Tesis de Biotecnología de los Recursos Naturales no publicada, Universidad Politécnica Salesiana. Quito, Ecuador.
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona, España: Ediciones Omega.
- Laboratorios Sanitas. (2012). *Clotrimazol + Betamensona*. Recuperado el 17 de abril de 2014, de www.farmaciasahumada.cl
- Lass-Flörl, C., Perkhofer, S., & Mayr, A. (11 de January de 2010). In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses: Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases*.
- Lenette, E. (1989). *Manual de Microbiología Clínica* (Cuarta ed.). Buenos Aires: Médica Panamericana.
- León, A. (2001). *Métodos clásicos de análisis microbiológicos*. Recuperado el 05 de abril de 2014, de www.uva.es/guia_docente.pdf
- Lozano, J. (Julio-Agosto de 2006). Dermatomicosis. Clasificación, tratamiento y pautas preventivas. *Ámbito farmacéutica Educación sanitaria*.
- Marienfeld Laboratory Glassware. (2011). *Cámara de recuento*. Lauda-Königshofen: Marienfeld Laboratory Glassware.
- Merck, M. (2005). *Infecciones dérmicas por hongos*. Recuperado el 19 de abril de 2014, de www.msdsd.es/publicaciones/mmerck

- Microbiología! Outside. (2010). *Bacteriología: Fisiología bacteriana, Medida del crecimiento*. Recuperado el 23 de junio de 2014, de www.microbiologia.com.ar
- MicroBioLogics. (2011). *Kwik-Stik*. Saint Cloud: Microbiologics Retail Catalog.
- Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2006). *Reglamento para el registro y control de productos naturales procesados de uso medicinal y de establecimientos en donde se fabrican, almacenan y comercializan*. Quito: Ministerio de Salud Pública del Ecuador.
- Miñana, M., & Goncalves, E. (2011). *Aplicaciones cosméticas y farmacéuticas de los surfactantes*. Mérida - Venezuela: Laboratorio FIRP - Escuela de Ingeniería Química - Universidad de los Andes.
- Mosquera, T., & Veloz, T. (2011). Eficacia in vitro de un colutorio elaborado con aceite esencial de la hoja de ishpingo *Ocotea quixos* (Lam.) Kostern. ex. O.C.Schmidt y clavo de olor *Syzygium aromaticum* (L.) Merr.& L.M. Perry. *La Granja*.
- Moss, E., & McQuown, A. (1960). *Atlas of Medical Mycology* (Segunda ed.). Baltimore, Estados Unidos: Waverly Press Inc.
- Murray, P., Baron, E., Jorgensen, J., Landry, M., & Pfaller, M. (2007). *Manual of Clinical Microbiology* (Ninth ed., Vol. 2). Washington: ASM PRESS.
- Naranjo, B. (2010). Composición del aceite esencial de *Ambrosia arborescens* y sus propiedades. En P. Naranjo, & P. Naranjo (Ed.), *Etnomedicina y etnobotánica: avances en la investigación*. Quito, Ecuador: Abya-Yala.
- Naranjo, M., Dávalos, M., Batallas, B., Granja, J., Velarde, E., Rosales, O., y otros. (2013). *Proyecto análisis de vulnerabilidades a nivel municipal: perfil territorial cantón San Miguel de Ibarra*. Cotopaxi: Universidad Técnica del Norte.
- Naranjo, P. (2010). La Etnomedicina en el Ecuador. En P. Naranjo, & P. Naranjo (Ed.), *Etnomedicina y etnobotánica: avances en la investigación*. Quito, Ecuador: Abya-Yala.

- Narro, V. (2009). *Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos*. México D.F.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1997). "Prueba de susceptibilidad antimicrobiana por difusión en agar.
- Navarrete, F. (2003). Histología de la piel. *Revista Facultad De Medicina*.
- Ochoa, A., Marín, J., Fernández, D., Vinet, J., & García, Y. (2006). Estandarización preliminar de parámetros de calidad del extracto blando de las hojas de *Petiveria alliacea* L. *Revista Cubana de Química*.
- OMS. (1999). *Modelo OMS de información sobre prescripción de medicamentos: Medicamentos utilizados en las enfermedades cutáneas*. Newark: WHO.
- Ortiz, Y., López, T., Padró, L., & Velásquez, Y. (2009). Estabilidad de dos tinturas de *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit. (ítamo real). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*.
- Osorio, E. (2009). *Aspectos básicos de farmacognosia*. Antioquia: Universidad de Antioquia.
- Pontón, J., Moragues, M., Gené, J., Guarro, J., & Quindós, G. (2002). Hongos y actinomicetos alergénicos. *Revista Iberoamericana de Micología*.
- Quiroz, M. (2012). *Manual de procedimiento de laboratorio docente de microbiología clínica en base a la normativa ISO 9001:2008*. 107. Tesis de Bioquímico clínico no publicada, Universidad Central del Ecuador, Quito, Ecuador.
- Ramírez, L., & Marín, D. (2009). Metodología para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*.
- Ramírez, L., & Marín, D. (2012). Evaluación de la actividad antibacteriana de aceites esenciales y extractos etanólicos utilizando métodos de difusión en agar y dilución en pozo. *Scientia Et Technica*.

- Reynaud, J. (2003). *La Flora del farmacéutico*. (M. Mendiola, Trad.) Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Ríos, M., Kosiol, M., Borgtoft, H., & Granda, G. (2007). *Plantas Útiles del Ecuador: Aplicaciones, retos y perspectivas*. Quito: Abya-Yala.
- Rippon, J. (1990). *Micología Médica: Hongos y Actinomicetos Patógenos* (Tercera ed.). (L. Castañeda, Trad.) México, México: Nueva Editorial Interamericana.
- Roussos, S., Aquiahuatl, M., Brizuela, M., Olmos, A., Rodríguez, W., & Viniegra, G. (1989). Producción, Conservación y Viabilidad de Inóculo de hongos filamentosos para las fermentaciones sólidas. *Micologia neotropical aplicada*.
- Sánchez, L., Matos, R., & Kumakawa, H. (2009). Infecciones micóticas superficiales. *Dermatología Peruana* .
- Sarmiento, C. y Trujillo, M. (2006). *Estandarización e implementación de las técnicas en el diagnóstico clínico de micosis cutáneas en el laboratorio de micología de la Pontificia Universidad Javeriana*. Tesis de Bacteriólogo no publicada, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
- Sharapin, N. (2000). *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos* (Primera ed.). (R. Pínzon, Ed.) Bogotá, Colombia: Convenio Andrés Bello.
- Silva, J. (2013). *Evaluación de la actividad insecticida y/o repelente "in vivo" de extracto acuoso de Artemisia absinthium y aceites esenciales de Tagetes minuta y Tagetes zipaquirensis sobre Lasius niger*. Tesis de Bioquímico farmacéutico no publicada, Escuela Politécnica del Chimborazo, Chimborazo, Ecuador.
- Supe, C.A. (2008). *Utilización de plantas desparasitantes tradicionales: paico, ajenojo, ruda y marco en el control de parásitos gastrointestinales en cuyes*. Tesis de Ingeniero en Zootecnia no publicada, Escuela Superior Politécnica De Chimborazo, Riobamba, Ecuador
- Torfe, M., Sylvestre, J., Morante, A., & Mendoza, S. (2009). *Ley de plantas medicinales, drogas vegetales, preparados de drogas vegetales y medicamentos fitoterápicos*. Buenos Aires: Imprenta del Congreso de la Nación .

- University of Georgia. (1998). *Kirby-Bauer Method*. Recuperado el 26 de junio de 2014, de aminj.myweb.uga.edu/KIRBY-BAUER.html
- Valle, P., & Florentino, L. (2000). *Toxicología de los alimentos*. México: Instituto Nacional de Salud Pública.
- Varela, J., Lavaggi ML., Cabrera M., Rodríguez A., Miño P., Chiriboga X., Cerecetto H., González M. (2011). *Fraccionamiento bioguiado del extracto hidroetanólico de Aristeguietia glutinosa Lam. y elucidación estructural de los principios activos anti-Trypanosoma cruzi*. Tesis de Bioquímica y farmacia no publicada, Universidad de la Republica, Montevideo, Uruguay.
- Vera, M. (2008). *Estudio Fitoquímico de una planta de la flora del Ecuador: Ambrosia arborescens*. Tesis de Ingeniera en Biotecnología no publicada, Escuela Politécnica del Ejercito, Sangolqui, Ecuador.
- Villagomez, R., Rodrigo, G., Collado, I., Calzado, M., Muñoz, E., Åkesson, B., y otros. (2013). Multiple anticancer effects of dampsin and coronopilin isolated from *Ambrosia arborescens* on cell cultures. *Anticancer Research*.
- Villares, M. P. (2012). *Identificación de hongos asociados a infecciones dérmicas en pacientes diabéticos tipo II, que acuden al Hospital Provincial Docente Ambato Junio-Noviembre 2010*, Universidad Técnica de Ambato, Ambato, Ecuador.
- Yáñez, G., & Velasteguí, R. (2014). *Investigación de la actividad antimicrobiana y fitoquímica de extractos de plantas medicinales frente a los microorganismos patógenos Escherichia coli y Candida albicans*. Recuperado el 16 de julio de 2014, de www.buscagro.com
- Yáñez, P. (2010). *Biometría y Bioestadística Fundamentales* (Primera ed.). Quito, Ecuador.
- Zapata, B., Duran, C., Stashenko, E., Betancur-Galvis, L., & Mesa, A. (2010). Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. *Revista Iberoamericana de Micología*.

ANEXOS

Anexo 1.

Recolección del material vegetal



Fuente: Investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Anexo 2.

Certificado del Herbario Nacional de *Ambrosia arborescens* Mill. (Marco)

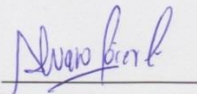
Quito, 22 de Julio del 2014

CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN

El espécimen examinado corresponden a:

***Ambrosia arborescens* Mill.**

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: : Asteranae Takht.
- Orden: Asterales Link
- Familia: Asteraceae Bercht. & J. Presl
- Género: *Ambrosia* L.
- Especie: *arborescens* Mill.
- Nombre común: Marco


Álvaro J. Pérez Castañeda

Curador de Angiospermas Herbario QCA



Fuente: Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Anexo 3.

Certificado del Herbario Nacional de *Aristeguietia glutinosa* (Matico)

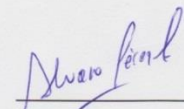
Quito, 22 de Julio del 2014

CERTIFICADO DE IDENTIFICACIÓN

El espécimen examinado corresponden a:

***Aristeguietia glutinosa* (Lam.) R.M. King & H. Rob.**

- Clase: Equisetopsida C. Agardh
- Subclase: Magnoliidae Novák ex Takht.
- Superorden: Asteranae Takht.
- Orden: Asterales Link
- Familia: Asteraceae Bercht. & J. Presl
- Género: *Aristeguietia* R.M. King & H. Rob.
- Especie: *glutinosa* (Lam.) R.M. King & H. Rob.
- Nombre común: Matico



Álvaro J. Pérez Castañeda

Curador de Angiospermas Herbario QCA



Fuente: Herbario Pontificia Universidad Católica del Ecuador, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Anexo 4.

Proceso de desinfección, limpieza y secado del material vegetal



Fuente: Investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Anexo 5.

Extracto de *Ambrosia arborescens* Mill (Marco)



Fuente: Investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Anexo 6.




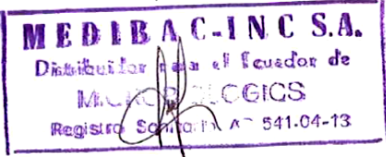
Aceite esencial de *Aristeguietia glutinosa* (Matico)



Fuente: Investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Anexo 7.




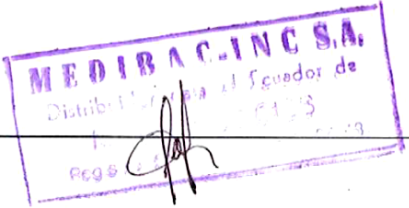
Certificado de Análisis de *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533

					
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release					
Specifications Microorganism Name: <i>Trichophyton mentagrophytes</i> Catalog Number: 0442 Lot Number: 442-68 Reference Number: ATCC® 9533™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 100 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4	Expiration Date: 2015/01 Release Information: Quality Control Technologist: Megan Murn Release Date: 2013/4/30				
Performance					
Macroscopic Features: Large, white colonies with "fuzzy" appearance.	Medium: Malt Extract Agar				
Microscopic Features: Many microconidia (very small and clavate-borne in clusters from laterally projecting conidiophores). Spirals, nodular bodies, chlamydospores, and racquet hyphae may be present. Macroconidia sparse, if present-elongated, pencil shaped, 6-9 septations.	Method: Lactophenol Blue (1)				
Vitek None <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%;">Phenotypic Features</th> <th style="width: 50%;">Results</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="height: 100px;"></td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Phenotypic Features	Results			Other Features/ Challenges: Results Urea Slant: positive Dermatophyte Test Medium: positive (good growth at 7 days with agar turning deep pink)
Phenotypic Features	Results				
 Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE					
Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number. Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods. Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information. Individual products are traceable to a recognized culture collection. (1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.					
 TESTING CERT #2655.01					
					
© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303					
Page 1 of 1					
DOC.286					

Fuente: Microbiologics, 2014, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Anexo 8.


Certificado de Análisis de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

	
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release	
Specifications Microorganism Name: <i>Trichophyton rubrum</i> Catalog Number: 0444 Lot Number: 444-76 Reference Number: ATCC® 28188™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 100 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4	Expiration Date: 2015/02 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2013/4/23
Performance	
Macroscopic Features: Large, white colonies with "fuzzy" appearance and smaller, dark wine-red colonies which turn white with dark wine-red reverse as culture ages.	Medium: Malt Extract Agar
Microscopic Features: Microconidia are abundant, macroconidia are rare. Microconidia are thin, clavate, borne laterally on undifferentiated hyphae or on short stalks. Macroconidia are typically long, narrow, cylindrical with rounded apices, 3-8 celled with thin smooth walls.	Method: Lactophenol Blue (1)
Vitek None Phenotypic Features	Other Features/ Challenges: Results Dermatophyte Test Medium: positive (good growth at 7 days with agar turning deep pink)
Results	 Brad Goskovicz, President AUTHORIZED SIGNATURE
Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.	
Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.	
Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.	
Individual products are traceable to a recognized culture collection.	
(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.	
 ACCREDITED TESTING CERT #2655.01	
© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303	
Page 1 of 1	
DOC.286	

Fuente: Microbiologics, 2014, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Anexo 9.

Certificado de Análisis de *Microsporium canis* ATCC 36299

					
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release					
Specifications Microorganism Name: <i>Microsporium canis</i> Catalog Number: 0894 Lot Number: 894-50 Reference Number: ATCC® 36299™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 100 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4	Expiration Date: 2015/10 Release Information: Quality Control Technologist: Carol J Stanoch Release Date: 2013/12/18				
Performance					
Macroscopic Features: White to pale buff, wooly, reverse is yellow-orange to orange-brown. Microscopic Features: Numerous, large fusiform macroconidia with thick walls, up to 15 septa with asymmetric knobbed apex, few microconidia.	Medium: PDA Method: Lactophenol Blue (1)				
Vitek None <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="width: 50%;">Phenotypic Features</th> <th style="width: 50%;">Results</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="height: 100px;"> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table>	Phenotypic Features	Results			Other Features/ Challenges: Results Dermatophyte Test Medium: positive (good growth, agar turning deep pink)
Phenotypic Features	Results				
 Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE					
Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.					
Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.					
⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.					
Individual products are traceable to a recognized culture collection.					
(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.					
 TESTING CERT #2655.01					
© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303					
Page 1 of 1					
DOC.286					

Fuente: Microbiologics, 2014, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

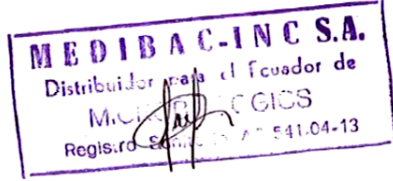
Anexo 10.

Certificado de Análisis de *Candida albicans* ATCC 10231



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release



Specifications Microorganism Name: <i>Candida albicans</i> Catalog Number: 0443 Lot Number: 443-277 Reference Number: ATCC® 10231™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4		Expiration Date: 2015/02 Release Information: Quality Control Technologist: Megan Murn Release Date: 2013/4/11	
Performance			
Macroscopic Features: Small to medium, white, circular, convex, dull colonies.		Medium: Nutrient	
Microscopic Features: Gram positive, ovoidal, budding yeast cells.		Method: Gram Stain (1)	
Vitek YST (1) Phenotypic Features		Other Features/ Challenges: Results (1) Germ Tube Test: positive (1) Chlamydospore production: positive	
	Results		
L-Lysine-ARYLAMIDASE	-		
L-MALATE assimilation	+		
Leucine ARYLAMIDASE	+		
ARGININE GP	+		
ERYTHRITOL assimilation	-		
GLYCEROL assimilation	+		
Tyrosine ARYLAMIDASE	+		
BETA-N-ACETYL-GLUCOSAMINIDASE	+		
ARBUTINE assimilation	-		
AMYGDALINE assimilation	-		
D-GALACTOSE assimilation	+		
GENTIOBIOSE assimilation	-		
D-GLUCOSE assimilation	+		
LACTOSE assimilation	+		
METHYL-A-D-GLUCOPYRANOSIDE assimilation	+		
D-CELLOBIOSE assimilation	-		
GAMMA-GLUTAMYL-TRANSFERASE	+		
D-MALTOSE assimilation	+		
D-RAFFINOSE assimilation	+		
PNP-N-acetyl-BD-galactosaminidase 1	+		
D-MANNOSE assimilation	+		
D-MELIBIOSE assimilation	-		
D-MELEZITOSE assimilation	-		
L-SORBOSE assimilation	-		
L-RHAMNOSE assimilation	-		
XYLITOL assimilation	+		
D-SORBITOL assimilation	+		
SACCHAROSE/SUCROSE assimilation	+		
UREASE	-		
ALPHA-GLUCOSIDASE	+		
D-TURANOSE assimilation	+		
D-TREHALOSE assimilation	+		
NITRATE assimilation	-		
L-ARABINOSE assimilation	-		
D-GALACTURONATE assimilation	+		
ESCULIN hydrolyse	-		
L-GLUTAMATE assimilation	+		
D-XYLOSE assimilation	-		
DL-LACTATE assimilation	+		
ACETATE assimilation	+		
CITRATE (SODIUM) assimilation	+		
GLUCURONATE assimilation	-		
L-PROLINE assimilation	+		
2-KETO-D-GLUCONATE assimilation	+		
N-ACETYL-GLUCOSAMINE assimilation	+		
D-GLUCONATE assimilation	+		



Brad Goskowitz, President
 AUTHORIZED SIGNATURE



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Candida albicans</i> Catalog Number: 0443 Lot Number: 443-277 Reference Number: ATCC® 10231™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 4	Expiration Date: 2015/02 Release Information: Quality Control Technologist: Megan Murn Release Date: 2013/4/11
<p>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</p> <p>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p> <p>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <p> (*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</p> <p> (†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</p> <p>ACCREDITED TESTING CERT #2655.01</p>	

Anexo 11.

Ficha técnica/ datos de seguridad del Polisorbato 80 (Tween 80)



Fisher Scientific

Part of Thermo Fisher Scientific

Material Safety Data Sheet

Creation Date 12-Apr-2010

Revision Date 12-Apr-2010

Revision Number 1

1. PRODUCT AND COMPANY IDENTIFICATION

Product Name	Tween® 80
Cat No.	BP338-500; T164-500
Synonyms	Polyoxyethylene(20)sorbitan monooleate
Recommended Use	Laboratory chemicals
Company Fisher Scientific One Reagent Lane Fair Lawn, NJ 07410 Tel: (201) 796-7100	Emergency Telephone Number CHEMTREC®, Inside the USA: 800- 424-9300 CHEMTREC®, Outside the USA: 703- 527-3887

2. HAZARDS IDENTIFICATION

CAUTION!

Emergency Overview

May cause skin, eye, and respiratory tract irritation. The toxicological properties have not been fully investigated.

Appearance Amber

Physical State Liquid

odor No information available

Target Organs None known.

Potential Health Effects

Acute Effects

Principle Routes of Exposure

Eyes

May cause irritation.

Skin

May cause irritation. May be harmful in contact with skin.

Inhalation

May cause irritation of respiratory tract. May be harmful if inhaled.

Ingestion

May be harmful if swallowed. Ingestion may cause gastrointestinal irritation, nausea, vomiting and diarrhea.

Chronic Effects None known.

See Section 11 for additional Toxicological information.

Aggravated Medical Conditions No information available.

3. COMPOSITION/INFORMATION ON INGREDIENTS

Haz/Non-haz

Component	CAS-No	Weight %
Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate	9005-65-6	>95

4. FIRST AID MEASURES

Eye Contact	Rinse immediately with plenty of water, also under the eyelids, for at least 15 minutes. Obtain medical attention.
Skin Contact	Wash off immediately with plenty of water for at least 15 minutes. Get medical attention immediately if symptoms occur.
Inhalation	Move to fresh air. If breathing is difficult, give oxygen. Get medical attention immediately if symptoms occur.
Ingestion	Do not induce vomiting. Obtain medical attention.
Notes to Physician	Treat symptomatically.

5. FIRE-FIGHTING MEASURES

Flash Point	> 110°C
Method	No information available.
Autoignition Temperature	No information available.
Explosion Limits	
Upper	No data available
Lower	No data available
Suitable Extinguishing Media	Use water spray, alcohol-resistant foam, dry chemical or carbon dioxide.
Unsuitable Extinguishing Media	No information available.
Hazardous Combustion Products	No information available.
Sensitivity to mechanical impact	No information available.
Sensitivity to static discharge	No information available.

Specific Hazards Arising from the Chemical

Keep product and empty container away from heat and sources of ignition

Protective Equipment and Precautions for Firefighters

As in any fire, wear self-contained breathing apparatus pressure-demand, MSHA/NIOSH (approved or equivalent) and full protective gear.

NFPA Health 1 Flammability 1 Instability 0 Physical hazards N/A

6. ACCIDENTAL RELEASE MEASURES

Personal Precautions	Ensure adequate ventilation. Use personal protective equipment.
-----------------------------	---

Environmental Precautions Should not be released into the environment.

Methods for Containment and Clean Up Soak up with inert absorbent material. Keep in suitable and closed containers for disposal.

7. HANDLING AND STORAGE

Handling Wear personal protective equipment. Ensure adequate ventilation. Avoid contact with skin, eyes and clothing. Avoid ingestion and inhalation.

Storage Keep container tightly closed in a dry and well-ventilated place. Store indoors.

8. EXPOSURE CONTROLS / PERSONAL PROTECTION

Engineering Measures Ensure that eyewash stations and safety showers are close to the workstation location. Ensure adequate ventilation, especially in confined areas.

Exposure Guidelines This product does not contain any hazardous materials with occupational exposure limits established by the region specific regulatory bodies.

NIOSH IDLH: Immediately Dangerous to Life or Health

Personal Protective Equipment

Eye/face Protection

Wear appropriate protective eyeglasses or chemical safety goggles as described by OSHA's eye and face protection regulations in 29 CFR 1910.133 or European Standard EN166.

Skin and body protection

Wear appropriate protective gloves and clothing to prevent skin exposure.

Respiratory Protection

Follow the OSHA respirator regulations found in 29 CFR 1910.134 or European Standard EN 149. Use a NIOSH/MSHA or European Standard EN 149 approved respirator if exposure limits are exceeded or if irritation or other symptoms are experienced.

9. PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

Physical State	Liquid
Appearance	Amber
odor	No information available
Odor Threshold	No information available.
pH	6-10 % aq. solution
Vapor Pressure	<1 hPa @ 20 °C
Vapor Density	> 1.0
Viscosity	No information available.
Boiling Point/Range	No information available.
Melting Point/Range	No information available.
Decomposition temperature	No information available.
Flash Point	> 110°C
Evaporation Rate	(Ether = 1.0)
Specific Gravity	1.080
Solubility	Partly soluble in water
log Pow	No data available

10. STABILITY AND REACTIVITY

Stability No information available.

Conditions to Avoid	Incompatible products. Excess heat.
Incompatible Materials	Strong oxidizing agents, Bases, Heavy metals
Hazardous Decomposition Products	Carbon monoxide (CO), Carbon dioxide (CO ₂)
Hazardous Polymerization	No information available.
Hazardous Reactions .	None under normal processing..

11. TOXICOLOGICAL INFORMATION

Acute Toxicity

Component Information

Component	LD50 Oral	LD50 Dermal	LC50 Inhalation
Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate	34500 µL/kg (Rat)	Not listed	Not listed

Irritation No information available.

Toxicologically Synergistic Products No information available.

Chronic Toxicity

Carcinogenicity There are no known carcinogenic chemicals in this product

Sensitization No information available.

Mutagenic Effects No information available.

Reproductive Effects No information available.

Developmental Effects No information available.

Teratogenicity No information available.

Other Adverse Effects The toxicological properties have not been fully investigated.. See actual entry in RTECS for complete information.

Endocrine Disruptor Information No information available

12. ECOLOGICAL INFORMATION

Ecotoxicity

Do not empty into drains.

Component	Freshwater Algae	Freshwater Fish	Microtox	Water Flea

Component	Freshwater Algae	Freshwater Fish	Microtox	Water Flea
Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate	Not listed	LC50: 471 mg/L/96h (Rainbow trout)	Not listed	Not listed

Persistence and Degradability Not readily biodegradable. Biodegradation. 52%.

Bioaccumulation/ Accumulation No information available

Mobility No information available

13. DISPOSAL CONSIDERATIONS

Waste Disposal Methods Chemical waste generators must determine whether a discarded chemical is classified as a hazardous waste. Chemical waste generators must also consult local, regional, and national hazardous waste regulations to ensure complete and accurate classification.

14. TRANSPORT INFORMATION

DOT Not regulated

TDG Not regulated

IATA Not regulated

IMDG/IMO Not regulated

15. REGULATORY INFORMATION

International Inventories

Component	TSCA	DSL	NDSL	EINECS	ELINCS	NLP	PICCS	ENCS	AICS	CHINA	KECL
Polyoxyethylene 20 sorbitan monooleate	XU	X	-	-	-	>1<6.5 mol ethoxylat ed units	X	X	X	X	KE- 25511 X

Legend:

X - Listed

E - Indicates a substance that is the subject of a Section 5(e) Consent order under TSCA.

F - Indicates a substance that is the subject of a Section 5(f) Rule under TSCA.

N - Indicates a polymeric substance containing no free-radical initiator in its inventory name but is considered to cover the designated polymer made with any free-radical initiator regardless of the amount used.

P - Indicates a commenced PMN substance

R - Indicates a substance that is the subject of a Section 6 risk management rule under TSCA.

S - Indicates a substance that is identified in a proposed or final Significant New Use Rule

T - Indicates a substance that is the subject of a Section 4 test rule under TSCA.

XU - Indicates a substance exempt from reporting under the Inventory Update Rule, i.e. Partial Updating of the TSCA Inventory Data Base Production and Site Reports (40 CFR 710(B)).

Y1 - Indicates an exempt polymer that has a number-average molecular weight of 1,000 or greater.

Y2 - Indicates an exempt polymer that is a polyester and is made only from reactants included in a specified list of low concern reactants that comprises one of the eligibility criteria for the exemption rule.

U.S. Federal Regulations

TSCA 12(b) Not applicable

SARA 313
Not applicable

SARA 311/312 Hazardous Categorization

Acute Health Hazard	No
Chronic Health Hazard	No
Fire Hazard	No
Sudden Release of Pressure Hazard	No
Reactive Hazard	No

Clean Water Act
Not applicable

Clean Air Act
Not applicable

OSHA
Not applicable

CERCLA
Not Applicable

California Proposition 65
This product does not contain any Proposition 65 chemicals.

State Right-to-Know
Not applicable

U.S. Department of Transportation

Reportable Quantity (RQ):	N
DOT Marine Pollutant	N
DOT Severe Marine Pollutant	N

U.S. Department of Homeland Security
This product does not contain any DHS chemicals.

Other International Regulations

Mexico - Grade No information available

Canada

This product has been classified in accordance with the hazard criteria of the Controlled Products Regulations (CPR) and the MSDS contains all the information required by the CPR.

WHMIS Hazard Class
Non-controlled

16. OTHER INFORMATION

Prepared By Regulatory Affairs
Thermo Fisher Scientific
Tel: (412) 490-8929

Creation Date 12-Apr-2010

Print Date 12-Apr-2010

Revision Summary "****", and red text indicates revision

Disclaimer

The information provided on this Safety Data Sheet is correct to the best of our knowledge, information and belief at the date of its publication. The information given is designed only as a guide for safe handling, use, processing, storage, transportation, disposal and release and is not to be considered as a warranty or quality specification. The information relates only to the specific material designated and may not be valid for such material used in combination with any other material or in any process, unless specified in the text.

End of MSDS

Anexo 12.

Ficha técnica de Dimethyl Sulfoxide ACS reagent 99.9% (DMSO)

SIGMA-ALDRICH sigma-aldrich.com

3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA
Website: www.sigmaaldrich.com
Email USA: techserv@sial.com
Outside USA: eurtechserv@sial.com

Product Specification

Product Name:
Dimethyl sulfoxide - ACS reagent, ≥99.9%

Product Number: 472301
CAS Number: 67-68-5
MDL: MFCD00002089
Formula: C₂H₆OS
Formula Weight: 78.13 g/mol

CSC(=O)C

TEST	Specification
Appearance (Color)	Colorless
Appearance (Form)	Liquid
Infrared spectrum	Conforms to Structure
Purity (GC)	≥ 99.90 %
Water (by Karl Fischer)	≤ 0.1 %
Residue on Evaporation	≤ 0.01 %
Titration Acid (meq/g)	≤ 0.001
Meets ACS Requirements 10th Edition	Current ACS Specification

Specification: PRD.0.ZQ5.10000016710

Sigma-Aldrich warrants, that at the time of the quality release or subsequent retest date this product conformed to the information contained in this publication. The current Specification sheet may be available at Sigma-Aldrich.com. For further inquiries, please contact Technical Service. Purchaser must determine the suitability of the product for its particular use. See reverse side of invoice or packing slip for additional terms and conditions of sale.

1 of 1

Fuente: Sigma Aldrich, 2014, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Anexo 13.

Ficha técnica del Clotrimazol 1% tubo 20 g

94181-CLOTRIMAZOL

Ficha Técnica

Fecha de revisión: 10/04/2014

Versión: 03

Página 1 de 2



1. IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA O EL PREPARADO.

1.1 Identificación de la sustancia o el preparado.

Nombre: Clotrimazol

Código granel: 94181

Código interno: 43204

1.2 Sinónimos.

Clotrimazolium; Clorotritiloimidazol; 1-(o-Clorotritil)imidazol

2. DESCRIPCIÓN

Aspecto: Polvo cristalino

Color: Blanco o amarillo pálido

Termolábil.

3. COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN DE LOS COMPONENTES.

Fórmula: C₂₂H₁₇ClN₂

CAS: 23593-75-1

Peso molecular: 344,8

4. DATOS FÍSICO-QUÍMICOS.

Ver especificación detallada en el boletín de análisis.

Solubilidad: Prácticamente insoluble en agua; soluble en 10 p. de alcohol, 10 p. de cloroformo y 100 p. de éter. Soluble en cloruro de metileno; fácilmente soluble en acetona y metanol.

Punto de fusión: 141 – 145 °C.

5. PROPIEDADES/USOS.

Se trata de un derivado imidazólico con acción antimicótica de amplio espectro, que actúa alterando la permeabilidad de la membrana fúngica, al inhibir la síntesis de ergosterol. Presenta un amplio espectro antifúngico, incluyendo dermatofitos y levaduras. Se usa tópicamente en el tratamiento de la candidiasis mucocutánea, pitiriasis versicolor y dermatomicosis. Ocasionalmente se utiliza en trichomoniasis resistentes a otros fármacos o cuando éstos están contraindicados.

6. DOSIFICACIÓN.

Se aplica tópicamente en forma de crema, loción o solución al 1%, en infecciones fúngicas cutáneas, 2 o 3 veces al día durante 2 o 4 semanas. Para prevenir la reinfección se puede emplear polvos al 1% junto con la crema o solución.

Las soluciones al 1% se usan para la otitis fúngica externa.

Para tratar la candidiasis vulvovaginal se usa una crema vaginal al 2% aplicándose 5 g diarios, durante 6 días, o bien en forma de pesarios en un régimen de dosificación de 100 mg durante 6 – 7 días, 200 mg durante 3 días o en una sola dosis de 500 mg.

En la terapia o profilaxis de candidiasis oral se emplean comprimidos de 10 mg, desleídos en la boca, administrados 5 veces al día durante 2 semanas. También se usa por vía oral y en gotas oculares al 1%.

7. OBSERVACIONES.

Almacenamiento: Almacenar en recipientes herméticamente cerrados, a una temperatura inferior a 30 °C y protegido de la luz.

94181-CLOTRIMAZOL

Ficha Técnica

Fecha de revisión: 10/04/2014

Versión: 03

Página 2 de 2



Efectos secundarios: Los efectos adversos que pueden aparecer cuando se utiliza por vía oral son alteraciones gastrointestinales, aumento de la tasa de las enzimas hepáticas y depresión mental.

Por vía tópica, puede desarrollar reacciones alérgicas o dermatológicas con irritación, urticaria, prurito, erupciones exantemáticas, eritema y sequedad de la piel. El tratamiento se debe suspender inmediatamente en el caso de que el individuo experimente algún episodio de irritación o erupción cutánea.

Por vía vaginal, puede ocasionar sensación de quemazón uretral y raramente, prurito vaginal, vaginitis, continencia urinaria y cistitis. Además se ha observado erupciones exantemáticas, prurito y alteraciones digestivas y sexuales (dispareunia). La terapia debe ser suprimida inmediatamente en el caso de que la persona tenga la sensación de quemazón vulvar, irritación o erupciones cutáneas. En el supuesto de que la paciente mantenga relaciones sexuales durante el tratamiento, es conveniente el empleo de preservativos por parte del varón, a fin de evitar una posible irritación sexual.

Precauciones: contraindicado en alergia a los derivados azólicos. Evitar el contacto con los ojos. Lavar y secar minuciosamente la zona a tratar.

No usar vendajes oclusivos o de no dejen transpirar, ya que podrían favorecer el desarrollo de levaduras y la consiguiente irritación cutánea.

Cuando se utilice por vía vaginal, es preferible la administración a la hora de acostarse, a fin de favorecer la acción local y la absorción vaginal. Se recomienda proteger la ropa íntima, debido a la posibilidad de que se produzca drenaje vaginal.

8. BIBLIOGRAFÍA.


Monografías Farmacéuticas. COF Alicante, 1998.

"Martindale. The Extra Pharmacopoeia". 30th Edition. Ed. The Pharmaceutical Press. London. (1993).

Fuente: Guinama, 2014, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Anexo 14.

Certificado de análisis de Clotrimazol 1% tubo de 20g

 GUINAMA ABSOLUTA CALIDAD		Certificado de Análisis		
Clotrimazol				
CÓDIGO ARTÍCULO: 94182		LOTE: 0036287		
FECHA ANÁLISIS: 02/04/2014		ANÁLISIS: QC-00145287		
FECHA CADUCIDAD: 28/02/2017		PM: 344,84		
CAS:		FÓRMULA: C22H17ClN2		
SINÓNIMOS / NOMBRE BOTÁNICO: CHLORTRIMAZOL; [1-(4-2-Clorotriil)imidazol];				
CONSERVACIÓN: Conservar en contenedores bien cerrados en lugar fresco y seco.				


ENSAYOS	RESULTADOS	MIN	MAX	MÉTODO
RIQUEZA	99,9 %	98,5	100,5	PH.EUR
PUNTO FUSION	144 °C	141	145	PH.EUR
PERDIDA POR DESECACION	0 %	0,0	0,5	PH.EUR
CENIZAS SULFURICAS	0 %	0,0	0,1	PH.EUR
TOLUENO	0 PPM	0,0	890	Normas fabricante
TOTAL IMPUREZAS	0,3 %	0,0	0,5	PH.EUR
IMPUREZAS INESPECIFICAS	0,09 %	0,0	0,1	PH.EUR
IMPUREZA A	0,07 %	0,0	0,2	PH.EUR
IMPUREZA B	0,05 %	0,0	0,2	PH.EUR
IMPUREZA D	0,06 %	0,0	0,2	PH.EUR
IMPUREZA E	0 %	0,0	0,2	PH.EUR
IMPUREZA F	0,03 %	0,0	0,1	PH.EUR
BENCENO	0 PPM	0,0	2	Normas fabricante
ACETONA	990 PPM	0,0	5.000	Normas fabricante
ETER DE PETROLEO	0 PPM	0,0	200	Normas fabricante
TAMAÑO PARTICULA 95%	10 MICRAS	0,0	10	Normas fabricante
SOLUBLE	ALCOHOL			PH.EUR*
INSOLUBLE	EN AGUA			PH.EUR*
IDENTIFICACION	CONFORME			PH.EUR
ESPECIFICACION	PH.EUR.7			Normas fabricante
COLOR	BLANCO			PH.EUR*
ASPECTO	POLVO CRISTAL			PH.EUR*
LOTE CORRECTO	SI			Normas fabricante
TOMA DE MUESTRA	SI RECOGEMOS			Normas fabricante
IDENTIFICACION POR IR	SI			PH.EUR*
MATERIAL ENVASE ORIGEN	PEBD natural			Normas fabricante
SOLUBLE	CLORURO DE METILENO			PH.EUR
TLC	CONFORME			PH.EUR
SUST.RELACIONADAS	CONFORME			PH.EUR

Alicia NM

Alicia Navarro Marín
Directora Técnica.

Los datos expresados en este certificado de análisis, reproducen los facilitados por nuestro proveedor y/o los obtenidos en nuestro laboratorio de control, sin que en ningún caso eximan de los controles exigidos en cada sector. Las pruebas marcadas con (*) son verificadas por Guinama.

Manufacturer: JIANGSU YUNYANG GROUP PHARMACEUTICAL CO., LTD Batch: 20130312
 GUINAMA S.L.U. C/ Praga s/n (Pol.Ind. Gutenberg) 46185 La Pobla de Vallbona (VALENCIA) España
 Tfno: +34 96 186 90 90 / 902 11 98 16 Fax: 96 185 03 52 E-mail: ventas@guinama.com www.guinama.com



Fuente: Guinama, 2014, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Anexo 15.

Diámetros de halos de inhibición (mm) del Extracto de *Ambrosia arborescens*, blanco positivo (Clz +), blanco negativo (DMSO -) sobre *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Candida albicans*.

Hongos dermatófitos	R E P	100 ppm	200 ppm	300 ppm	400 ppm	500 Ppm	600 ppm	700 ppm	Clz +	DMSO -
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	1	13,7	14,9	22,7	25,9	27,2	31,4	32,3	49,1	6,0
	2	14,0	14,7	22,3	26,0	26,9	30,0	32,1	48,8	6,0
	3	13,3	14,6	22,6	25,9	26,7	30,9	31,9	48,5	6,0
	X	13,7	14,7	22,5	25,9	26,9	30,8	32,1	48,8	6,0
<i>Trichophyton rubrum</i>	1	13,4	22,2	25,0	27,5	28,9	32,8	35,3	52,7	6,0
	2	14,2	21,9	24,7	28	29,6	32,9	36,1	53,8	6,0
	3	12,8	22,0	24,9	27,4	30,5	33,0	35,4	53,2	6,0
	X	13,5	22,0	24,9	27,6	29,7	32,9	35,6	53,2	6,0
<i>Microsporum canis</i>	1	18,1	19,5	28,0	32,0	39,8	43,9	39,7	30,5	6,0
	2	17,1	19,4	28,5	28,0	40,1	42,9	41,1	30,6	6,0
	3	17,2	19,2	28,2	27,3	40,5	43,6	41,0	30,7	6,0
	X	17,5	19,4	28,2	29,1	40,1	43,5	40,6	30,6	6,0
<i>Candida albicans</i>	1	11,4	11,3	10,6	11,0	11,4	12,9	9,8	24,7	6,0
	2	11,3	11,0	10,7	11,0	11,2	13,4	11,0	25,1	6,0
	3	11,0	11,0	11,0	10,7	11,4	13,1	10,4	24,8	6,0
	X	11,2	11,1	10,8	10,9	11,3	13,1	10,4	24,9	6,0

Fuente: Investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Anexo 16.

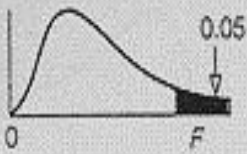
Diámetros de halos de inhibición (mm) del AE de *Aristeguietia glutinosa*, blanco positivo (Clz +), blanco negativo (DMSO -) sobre *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Microsporium canis*, *Candida albicans*.

AE %	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>				<i>Trichophyton rubrum</i>				<i>Microsporium canis</i>				<i>Candida albicans</i>			
	1	2	3	\bar{X}	1	2	3	\bar{X}	1	2	3	\bar{X}	1	2	3	\bar{X}
0,5%	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	9,0	9,4	9,2	9,2
1%	6,2	6,0	6,0	6,1	10,8	10,7	10,6	10,7	7,0	6,0	7,8	6,9	10,1	10,1	10,4	10,2
1,5%	9,1	8,8	9,4	9,1	12,5	12,0	12,3	12,3	11,4	11,7	11,4	11,5	11,1	10,3	10,0	10,5
2%	9,5	10,3	9,9	9,9	12,8	12,6	12,3	12,6	13,9	13,6	14,0	13,8	11,9	11,8	12,0	11,9
2,5%	11,0	11,3	11,6	11,3	14,0	14,5	13,5	14,0	13,9	14,0	13,6	13,8	10,6	10,8	10,8	10,7
3%	12,3	12,6	11,9	12,3	14,5	13,8	12,8	13,7	18,1	17,4	18,1	17,9	10,9	10,9	10,9	10,9
3,5%	14,5	13,9	14,2	14,2	15,5	15,5	15,8	15,6	30,9	30,5	30,6	30,7	10,5	10,8	10,9	10,7
4%	12,1	10,5	11,4	11,3	15,2	15,3	15,1	15,2	34,1	33,5	33,0	33,5	10,4	10,3	10,5	10,4
4,5%	12,6	12,5	12,9	12,7	17,9	17,7	17,5	17,7	37,0	36,7	37,4	37,0	11,1	10,9	10,7	10,9
5%	13,7	13,2	12,7	13,2	18,5	19,3	19,3	19,0	38,1	37,7	37,7	37,8	10,3	10,7	11,1	10,7
Clz+	49,7	50,2	49,9	49,9	51,5	51,7	52,8	52,0	37,5	37,0	38,1	37,5	24,7	25,1	23,8	24,5
DMSO-	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0

Fuente: Investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Anexo 17.

Valores Críticos de la Distribución F para un Nivel de Significancia=0,05

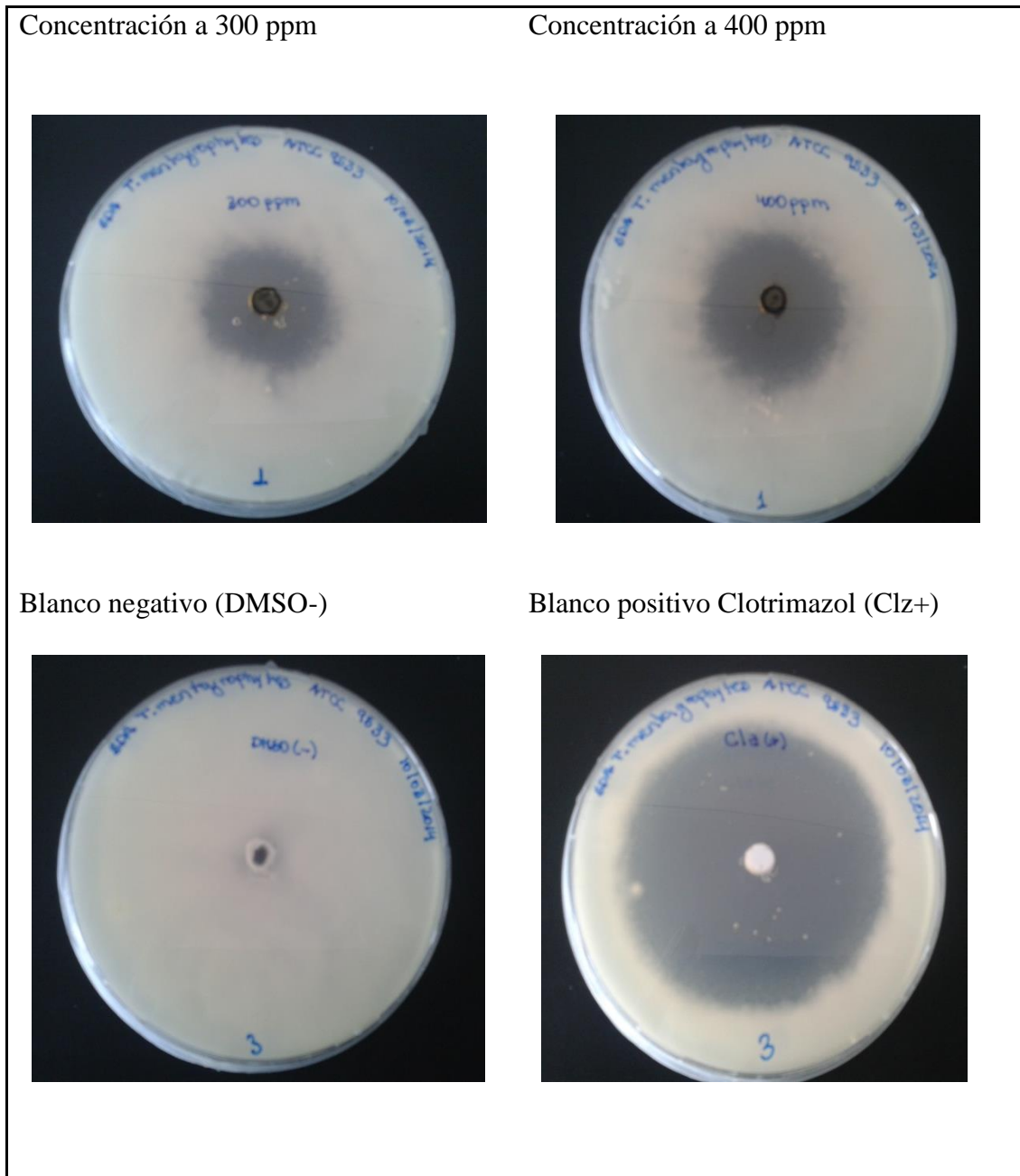


		Grados de libertad para el numerador															
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	15	20	24	30	40
Grados de libertad para el denominador	1	161	200	216	225	230	234	237	239	241	242	244	246	248	249	250	251
	2	18.5	19.0	19.2	19.2	19.3	19.3	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.4	19.5	19.5
	3	10.1	9.55	9.28	9.12	9.01	8.94	8.89	8.85	8.81	8.79	8.74	8.70	8.66	8.64	8.62	8.59
	4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.26	6.16	6.09	6.04	6.00	5.96	5.91	5.86	5.80	5.77	5.75	5.72
	5	6.61	5.79	5.41	5.19	5.05	4.95	4.88	4.82	4.77	4.74	4.68	4.62	4.56	4.53	4.50	4.46
	6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.39	4.28	4.21	4.15	4.10	4.06	4.00	3.94	3.87	3.84	3.81	3.77
	7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.97	3.87	3.79	3.73	3.68	3.64	3.57	3.51	3.44	3.41	3.38	3.34
	8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.69	3.58	3.50	3.44	3.39	3.35	3.28	3.22	3.15	3.12	3.08	3.04
	9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.48	3.37	3.29	3.23	3.18	3.14	3.07	3.01	2.94	2.90	2.86	2.83
	10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.33	3.22	3.14	3.07	3.02	2.98	2.91	2.85	2.77	2.74	2.70	2.66
	11	4.84	3.98	3.59	3.36	3.20	3.09	3.01	2.95	2.90	2.85	2.79	2.72	2.65	2.61	2.57	2.53
	12	4.75	3.89	3.49	3.26	3.11	3.00	2.91	2.85	2.80	2.75	2.69	2.62	2.54	2.51	2.47	2.43
	13	4.67	3.81	3.41	3.18	3.03	2.92	2.83	2.77	2.71	2.67	2.60	2.53	2.46	2.42	2.38	2.34
	14	4.60	3.74	3.34	3.11	2.96	2.85	2.76	2.70	2.65	2.60	2.53	2.46	2.39	2.35	2.31	2.27
	15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.90	2.79	2.71	2.64	2.59	2.54	2.48	2.40	2.33	2.29	2.25	2.20
	16	4.49	3.63	3.24	3.01	2.85	2.74	2.66	2.59	2.54	2.49	2.42	2.35	2.28	2.24	2.19	2.15
	17	4.45	3.59	3.20	2.96	2.81	2.70	2.61	2.55	2.49	2.45	2.38	2.31	2.23	2.19	2.15	2.10
	18	4.41	3.55	3.16	2.93	2.77	2.66	2.58	2.51	2.46	2.41	2.34	2.27	2.19	2.15	2.11	2.06
	19	4.38	3.52	3.13	2.90	2.74	2.63	2.54	2.48	2.42	2.38	2.31	2.23	2.16	2.11	2.07	2.03
	20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.71	2.60	2.51	2.45	2.39	2.35	2.28	2.20	2.12	2.08	2.04	1.99
	21	4.32	3.47	3.07	2.84	2.68	2.57	2.49	2.42	2.37	2.32	2.25	2.18	2.10	2.05	2.01	1.96
	22	4.30	3.44	3.05	2.82	2.66	2.55	2.46	2.40	2.34	2.30	2.23	2.15	2.07	2.03	1.98	1.94
	23	4.28	3.42	3.03	2.80	2.64	2.53	2.44	2.37	2.32	2.27	2.20	2.13	2.05	2.01	1.96	1.91
	24	4.26	3.40	3.01	2.78	2.62	2.51	2.42	2.36	2.30	2.25	2.18	2.11	2.03	1.99	1.94	1.89
	25	4.24	3.39	2.99	2.76	2.60	2.49	2.40	2.34	2.28	2.24	2.16	2.09	2.01	1.96	1.92	1.87
30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.53	2.42	2.33	2.27	2.21	2.16	2.09	2.01	1.93	1.89	1.84	1.79	
40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.45	2.34	2.25	2.18	2.12	2.08	2.00	1.92	1.84	1.79	1.74	1.69	
60	4.00	3.15	2.76	2.53	2.37	2.25	2.17	2.10	2.04	1.99	1.92	1.84	1.75	1.70	1.65	1.59	
120	3.92	3.07	2.68	2.45	2.29	2.18	2.09	2.02	1.96	1.91	1.83	1.75	1.66	1.61	1.55	1.50	
∞	3.84	3.00	2.60	2.37	2.21	2.10	2.01	1.94	1.88	1.83	1.75	1.67	1.57	1.52	1.46	1.39	

Fuente: Yáñez, 2010, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Anexo 18.

Fotografías de Halos de Inhibición del extracto de *Ambrosia arborescens* (Marco) a 300 y 400 ppm y clotrimazol frente a *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28188

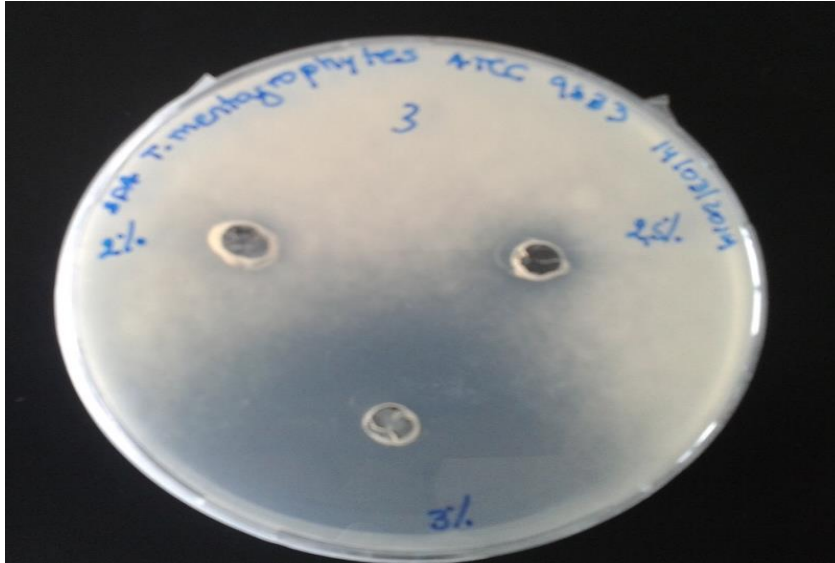


Fuente: Investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014

Anexo 19.

Fotografías de Halos de Inhibición del AE de *Aristeguietia glutinosa* (Matico) a 2; 2,5; 3% y clotrimazol frente a *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 28188

Concentración a 2; 2,5 y 3%



Blanco positivo Clotrimazol (Clz+)



Fuente: Investigación, por S. Ayala & T. Vásquez, 2014