

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE ACEITES ESENCIALES
EXTRAIDOS DE *Lippia graveolens* (OREGANO), *Rosmarinus officinalis*
(ROMERO) y *Eucalyptus globulus* (EUCALIPTO) en *Microsporum canis*
Trichophyton rubrum y *Epidermophyton floccosum*

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

ALBA LILIAN FLORES SOLANO

ANA LILIAN HERNÁNDEZ ESCOBAR

MARTA GUADALUPE VALLADARES REYES

16 DE FEBRERO
PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIATURA EN QUÍMICA Y FARMACIA

OCTUBRE 2004

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA



©2004, DERECHOS RESERVADOS

Prohibida la reproducción total o parcial de este documento,
sin la autorización escrita de la Universidad de El Salvador

<http://virtual.ues.edu.sv/>

SISTEMA BIBLIOTECARIO, UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTORA

Dra. Maria Isabel Rodríguez

SECRETARIA GENERAL

Licda. Alicia Margarita Rivas de Recinos

FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA

DECANO

Lic. Salvador Castillo Arévalo

SECRETARIA

MSc. Miriam del Carmen Ramos de Aguilar

COMITE DE TRABAJOS DE GRADUACIÓN

COORDINADORA GENERAL

Licda. Maria C. Odette Rauda Acevedo

ASESORA DE AREA DE INSDUSTRIA FARMACEUTICA COSMÉTICA Y VETERINARIA

Licda. Mercedes Rossana Brito de Gaméz

ASESORA DE AREA DE ANÁLISIS DE ALIMENTOS

Licda. Maria Evelyn Sánchez de Ramos

DOCENTES DIRECTORAS

Licda. Rhina Antonieta Toledo Mendoza

MSc. Coralia Figueroa de Murillo

AGRADECIMIENTOS

A nuestras Directoras: Licda. Rhina Antonieta Toledo Mendoza
 MSc. Coralia Figueroa de Murillo
 Por brindarnos su buena orientación y conocimientos
 profesionales que fueron de mucha importancia para
 elaborar este trabajo.

A nuestras Asesoras: Licda. Mercedes Rossana Brito de Gaméz
 Licda. María Evelyn Sánchez de Ramos
 Licda. María C. Odette Rauda Acevedo
 Por su tiempo y dedicación en el desarrollo y
 culminación del presente Trabajo.

A los Señores: Lic. Carlos Raúl Rodríguez
 Sr. Oscar Gerardo Coreas
 Sr. Wilbert Ernesto Guzmán

Y demás personas que contribuyeron para la realización y finalización de esta meta.

Infinitas gracias y que Dios los Bendiga por siempre.

Alba Lilian, Ana Lilian y Marta.

DEDICATORIA

A DIOS TODO PODEROSO: Por haberme guiado y permitirme lograr una de mis metas.

A MIS PADRES: José Antonio y María Lilian con profundo amor y respeto; y con especial agradecimiento a su apoyo lo cual hizo posible la culminación de mí Carrera.

A MIS HERMANOS: José Antonio y Edwin por el apoyo que me brindaron en todo momento.

A MIS ASESORES: Con mucho aprecio y admiración.

Finalmente a mis Familiares, Profesores, Amigos, Compañeros y demás personas que de una u otra forma contribuyeron a la realización de este Trabajo de Graduación.

GRACIAS.

Ana Lilian Hernández Escobar.

DEDICATORIA

A Dios Todo Poderoso: por mi padre espiritual y estar conmigo todo tiempo y dar resignación ante lo perdido.

A mis Padres Maria Eva y Juan Elias: por ser los mejores padres, seres incondicionales y maravillosa compañía en mi vida.

A mi Hermano Francisco por su aporte en confianza y apoyo brindado.

A mi Hermanito Elias: por estar siempre conmigo.

A mi Hermanita Lupita: por ser mi amiga.

A mis asesoras: por brindarme su apoyo en todo momento y guiarme adecuadamente con mucho respeto y cariño.

A mis compañeras: Ana y Marta por ser el pilar de apoyo para culminar esta meta.

A mis familiares, amigos, compañeros que me brindarán de diferentes formas, una ayuda para seguir adelante.

Alba Lilian Flores Solano.

DEDICATORIA

A Dios Todo Poderoso: por ser mi guía en cada paso de mi vida, y así poder culminar mi carrera.

A mi Mamá: Teresita por el amor abnegado e incondicional que siempre me brinda, por sus consejos, apoyo, sacrificio, y comprensión.

A mi Hermana: Mily por su apoyo y amor incondicional en todo momento.

A mis compañeras: Alba y Ana por su apoyo, comprensión y sinceridad que me brindaron para poder culminar esta meta.

A mis asesoras Licda. Toledo y Licda. Murrillo por su apoyo y compartir sus conocimientos.

A mis amigas y compañeras que manifestaron su apoyo a lo largo de mi carrera.

Marta Guadalupe Valladares Reyes.

INDICE

	No. Pág.
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	xvii
II. OBJETIVOS	
III. MARCO TEORICO	22
3.1. Monografía de <i>Lippia graveolens</i>	22
3.2. Monografía de <i>Eucalyptus globulus</i>	25
3.3. Monografía de <i>Rosmarinus officinalis</i>	28
3.4. Aceites Esenciales	31
3.5. Micosis	36
3.6. Características Microscópicas y Morfológicas de los Hongos	38
3.6.1. Características Microscópicas	39
3.6.2. Características Morfológicas	40
3.7. Identificación de las Dermatomícosis	40
3.8. Método de Kirby-Bauer Modificado	42
IV. DISEÑO METODOLOGICO	
4.1 Revisión Bibliográfica	44
4.2 Investigación de Campo	44
4.3 Investigación de Laboratorio	45
4.3.1 Recolección y Preparación del Material Vegetal	45
4.3.2 Extracción de los Aceites Esenciales por el Método de Arrastre por Vapor	45

4.3.3	Identificación de los Componentes de los Aceites por Cromatografía de Capa Fina	47
4.3.4	Pruebas de Identificación Morfológica y Microscópica de los Hongos	49
4.3.4.1	Identificación Morfológica de los Hongos	49
4.3.4.2	Identificación Microscópica de los Hongos	49
4.3.5	Determinación de la Concentración Efectiva de los Aceites	51
4.3.5.1	Preparación de los Aceites	51
4.3.5.2	Preparación del control positivo de Ketoconazol al 1% y 1.2%	51
4.3.5.3	Desarrollo del Método Kirby-Bauer Modificado	52
4.3.6	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria	53
4.3.6.1	Preparación de los Aceites	53
4.3.6.2	Interpretación de Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria	55
4.3.7	Determinación de la Concentración Mínima Fungicida	56
4.3.7.1	Preparación de los Aceites	58
V .	RESULTADOS	60
VI.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	75
VII.	CONCLUSIONES	82
VIII.	RECOMENDACIONES	85
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

INDICE DE CUADROS

	No. Pág.
Cuadro No. 1	
Características de los Hongos en Estudio	50
Cuadro No. 2	
Interpretación de Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria	55
Cuadro No. 3	
Características Organolépticas de los Aceites Esenciales obtenidos por el Método de Arrastre por Vapor	60
Cuadro No. 4	
Resultados de la Identificación de los Componentes de los Aceites Esenciales por Cromatografía de Capa Fina	61
Cuadro No. 5	
Resultados del Análisis Morfológico de los hongos en Estudio	62
Cuadro No. 6	
Resultados del Análisis Microscópico de los Hongos en Estudio	63
Cuadro No. 7	
Resultados de la Concentración Efectiva de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto a 2000 ppm	64
Cuadro No. 8	
Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria a 1000 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto	65

Cuadro No. 9	
Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria a 500 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto	65
Cuadro No. 10	
Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria a 250 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto	66
Cuadro No. 11	
Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria a 125 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto	66
Cuadro No. 12	
Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria a 75 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto	67
Cuadro No. 13	
Cuadro Resumen de la Concentración Mínima Inhibitoria de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto ante los Microorganismos de Prueba	68
Cuadro No. 14	
Resultados de la Concentración Mínima Fungicida a 4000 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto	69
Cuadro No. 15	
Resultados de la Concentración Mínima Fungicida a 6000 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto	69

Cuadro No. 16	
Resultados de la Concentración Mínima Fungicida a 8000 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto	70
Cuadro No. 17	
Resultados de la Concentración Mínima Fungicida a 10,000 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto	70
Cuadro No. 18	
Resultados de la Concentración Mínima Fungicida a 12,000 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto	71
Cuadro No.19	
Cuadro Resumen de la Concentración Mínima Fungicida de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto ante los Hongos en Estudio	72
Cuadro No. 20	
Resultados de la Concentración Mínima Fungicida del Estándar Ketoconazol a 10,000 ppm y 12,000 ppm frente a los Hongos en Estudio	73

INDICE DE FIGURAS

	No. Pág.
Figura No.1 Aparato de Destilación por Arrastre de Vapor	45
Figura No.2 Fotografía de Cromatoplaca	
Figura No.3 Medición de los halos de Inhibición	
Figura No.4 Medición de la Concentración Mínima Inhibitoria	
Figura No.5 Concentración Mínima Fungicida	

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó la Actividad Fungicida y Mínima Inhibitoria de los aceites de tres especies vegetales: Orégano, Romero y Eucalipto en los hongos que producen las micosis mas frecuentes como lo son: *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum*.

La investigación se dividió en tres etapas, la primera donde se recopiló información referente a cada monografía de las plantas; incluyendo las propiedades antimicoticas de ellas, y los tipos de micosis producidas por los hongos de prueba.

En la segunda etapa se recolectaron las plantas y se le extrajeron los aceites esenciales por el Método de Arrastre de Vapor.

Posteriormente a estos aceites se le identificaron los componentes responsables de la actividad fungicida por medio de Cromatografía de Capa Fina.

En la etapa de Laboratorio se identificaron los hongos por pruebas morfológicas y microscópicas para asegurarnos de la identidad de cada uno de ellos.

A partir de una concentración efectiva de 2000 ppm, fueron utilizadas diferentes concentraciones de aceite esencial para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Fungicida por el Método Kirby -Bauer todo esto llevando como control positivo el Ketoconazol al 1 % a cuya concentración se comercializa y en vista que no inhibió tuvo que hacerse otro análisis al 1.2 % para poder lograr una concentración fungicida.

En base a los resultados se encontró que todos los aceites inhiben el crecimiento de todos los microorganismos de prueba en comparación con el control positivo.

Se puede decir que de los tres aceites el que presentó mejores resultados como fungicida fue el de Orégano en especial para *Epidermophyton floccosum* y *Trichophyton rubrum* ya que solamente necesitó una concentración de 4000 ppm la cual constituye, la tercera parte de lo que se utilizó con el control positivo de Ketoconazol.

Con este trabajo se determinó que los aceites poseen actividad fungicida.

I. INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCIÓN

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se utiliza desde tiempos inmemorables, de ahí que el uso medicinal de las plantas nunca ha dejado de tener vigencia ya que presentan una inmensa ventaja con respecto a los tratamientos químicos¹⁸.

En las plantas los principios activos se encuentran siempre biológicamente equilibrados por la presencia de sustancias complementarias, que van ha potenciarse entre sí de forma que en general no se acumulan en el organismo y sus efectos indeseables están limitados¹⁸.

Sin embargo a pesar que han aumentado las investigaciones y estudios científicos de las plantas medicinales, todavía no se conocen muchos de los principios activos a los que deben las plantas sus extraordinarias cualidades.

Con el presente estudio se determinó la actividad antifúngica que poseen los aceites esenciales obtenidos de las hojas de *Lippia graveolens* (Orégano), *Rosmarinus officinales* (Romero) y *Eucaliptus globulus* (Eucalipto).

La investigación fué realizada ante tres hongos patógenos dermatofitos: *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum* capaces de afectar tejidos ricos en queratina como la piel, pelos y uñas causando dermatomicosis o tiña.

Además existe una afección muy contagiosa que recibe el nombre de pie de atleta, producida especialmente por especies antropófilas de dermatofitos siendo *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum* los géneros que se aíslan con mayor frecuencia¹⁹.

La mayoría de las dermatomícosis responden al tratamiento químico pero muchas veces es conveniente prolongar el tratamiento durante una o dos semanas después que se ha conseguido mejoría clínica, esto junto con la adopción de una serie de medidas higiénicas las cuales aceleran el proceso de curación y previenen re-infecciones.

En muchos casos no solo se requiere un tratamiento dermatológico sino también uno por vía oral, esto da como resultado que las personas abandonen dicho tratamiento por lo tedioso y por que implica una mayor inversión de dinero.

Por medio del método Kirby-Bauer Modificado se comprobará la actividad antifúngica y la Concentración Mínima Inhibitoria de los aceites esenciales en los hongos anteriormente mencionados.

Tratando de colaborar con la investigación de principios activos con propiedades antifúngicas se desarrollará el presente estudio que conduzca a determinar si pueden o no ser utilizados en contra de enfermedades dermatomícosas.

II. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.0 Objetivo General:

Determinar las propiedades antifúngicas de los aceites esenciales extraídos de *Lippia graveolens* (Orégano), *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Eucaliptus globulus* (Eucalipto) frente a los hongos *Microsporum canis*, *Ttrichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum*.

2.1 Objetivos Específicos:

- 3** Presentar las monografías de las especies vegetales en estudio.
- 4** Extracción de los aceites esenciales a partir de las hojas por el Método de Arrastre de Vapor.
- 5** Investigar por lo menos uno de los componentes principales de cada aceite en estudio mediante la técnica de Cromatografía de Capa Fina.
- 6** Establecer la Concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales en estudio a partir de una concentración de 2000 ppm en tres especies de hongos.
- 7** Encontrar la Concentración a la que los aceites esenciales en estudio ejercen la acción fungicida.
- 8** Dar a conocer los resultados sobre la utilización de estas especies vegetales.

III. MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 Monografía de *Lippia graveolens*^(1,3,8)

Familia: Verbenaceae.

Nombres comunes: Orégano,

Orégano del monte, Oreganito,

Mejorana



Descripción botánica:

Arbusto delgado de hasta 2 metros de altura. Se propaga por semillas o estacas de madera suave. Las hojas son densamente pilosas, suaves al tacto y poseen pecíolos de oblongos a elípticos 5-10 cm. Presentan flores de sub-globosas a oblongas y corola blanca.

Hábitat y distribución:

Es un arbusto nativo del Sur de Texas hasta Nicaragua. Se le encuentra en bosques secos y montes espinosos subtropicales, en pendientes pedregosas, en matorrales húmedos o secos. En el Salvador no se conoce ninguna plantación de este arbusto pero crece en forma silvestre a lo largo y ancho de todo el territorio nacional.

Historia:

Con el nombre de Orégano se conoce mas de 53 plantas de diferentes especies e incluso familias, que por sus aceites esenciales de aromas parecidos, en tiempos griegos y romanos; Plinio recomendaba las cataplasmas para tratar picaduras de

escorpiones. Según Pulpepe su actividad esta regida por mercurio, presenta flores de subglobosas a oblongadas y corola blanca.

Composición química:

La planta completa contiene aceite esencial (1.8%), glicosidos saponinicos, taninos, triterpenos, celulosa, pigmentos y elementos minerales. La corteza y la raíz contienen glicósidos saponinicos, aceite esencial y taninos. Las hojas contienen, además flavonas y lapachenol.

El aceite esencial de *Lippia graveolens* tiene una densidad de 0.890-0.922, índice de refracción 1.479-1498. Contiene: Timol (40-60%), p- Cimeno (7.7-9.2%), 1.8 Cineol (4.5-4.8%), Carvacrol (3.1–3.9%), metil timol (2.4–3.8%), Mirceno (0.9-1.5%), Cariofileno (0.8–1.2%), Linalool (0.7-1.3%), Terpeneol (3.1-3.9%) y al menos 34 elementos en menores cantidades.

Actividad biológica:

Se le atribuyen propiedades de tónico general, digestivo, emenagogo, espasmolítico, carminativo, expectorante y antiséptico de las vías respiratorias. Tópicamente es analgésico, cicatrizante y antiséptico.

Estudios antifungicos demuestran que los extractos con diclorometano y etanol son activos contra *Candida albicans*, *Epidermophyton floccosum* y *Tichophyton rubrum*.

Usos medicinales tradicionales:

La decocción o infusión de las hojas se usa para tratar afecciones gastrointestinales (amebiasis, cólico, diarrea, disentería, dispepsia, estreñimiento

e indigestión), afecciones respiratorias (asma, bronquitis, catarro, influenza, laringitis, resfrío, tos, tos-ferina y tuberculosis), anemia, hidropesía, amenorrea, dismenorrea y reumatismo.

Tópicamente la decocción se aplica para la cicatrización de heridas, llagas e inflamaciones de la garganta; en baños se usa para fortalecer niños y niñas en estado de debilidad, combatir la gripe y para aliviar el prurito y sarna; en cataplasma para madurar absceso, calmar neuralgia y aliviar induraciones, cáncer y tumores; infracciones y baños se usan como calmantes. La planta fresca macerada en aceite se aplica para combatir los dolores reumáticos; la maceración alcohólica se usa contra ataques epilépticos.

No se tiene información bibliográfica sobre la farmacología de esta especie vegetal.

Toxicología:

Los extractos acuosos y etanólicos de las hojas de *Lippia graveolens* (500 ppm) presentan cierta toxicidad contra peces del género *Mollinesia*. Su administración durante el embarazo esta contraindicada, ya que puede producir aborto. La dosis letal del carbacrol por vía oral en conejos es de 100 mg/Kg algunas especies del género *Origanum* pueden interrumpir los embarazos en cobayos e inhibir la implantación en ratas ratones y hámster.



3.2 Monografía de *Eucalyptus globulus*^(3,9,11)

Familia: Mirtáceas

Nombre común: Eucalipto



Descripción botánica:

Este árbol crece hasta 30 metros de altura, su madera es dura, consistente, corteza rugosa, follaje abundante y de color verde, al estrujar las hojas desprende un fuerte olor aromático, parecido al del alcanfor.

El tamaño y la forma de las hojas varía con la edad: cuando tiernas son opuestas y oblongadas; cuando maduras son lanceoladas, estrechas, encorvadas, con numerosas glándulas oleíferas, las flores son globosas y las semillas negras redondeadas.

Hábitat y distribución:

Eucalyptus globulus es originario de Tasmania y del este de Australia. En América se cultiva en climas tropicales y templados. *Eucalyptus* deriva del griego que significa “bien cubierto”, por el opérculo que cubre a las flores y *globulus*, indica la forma del fruto.

Historia:

Descubierto en Australia a fines del siglo XVII, se conocen más de 500 especies. Se cultiva en regiones secas donde se ha introducido con fines de reforestación por su rápido crecimiento, resistencia a la sequía y buena calidad de madera.

Composición química:

El tallo, el fruto y las hojas contienen aceites esenciales, glicósidos saponinicos, flavonoides, taninos, triterpenos y sesquiterpenlactonas. El aceite esencial posee una densidad de 0.905–0.925 a 25° C, y un índice de refracción de 1.4580-1.4700 a 20 °C.

Las hojas contienen del 1 al 3 % de aceite esencial. La esencia de eucalipto contiene de 3-6% de un aceite volátil del cual un 70% es eucaliptol ($C_{10}H_{18}O$), el resto consiste en alfa pineno (eucalipteno), beta pineno, canfeno y fenqueno, aldehído valeral-butílico y capronaldehido, alcohol etílico, amílico, isoamílico, felandreno, p-cimeno, d-limoneno, Eucalipteno, Terpineno, Aromadendreno, ácidos grasos, sesquiterpenal mas tarde denominado globutol ($C_{15}H_{12}O_{13}$) Además del aceite volátil contiene numerosas resinas, un principio neutro y amargo ácido tánico.

Farmacología:

Estudios antimicrobianos demuestran que la tintura de hojas de *E. Globulus* es activa contra *C. Albicans*, *E. Coli*, *S. Aureus* y *S. Pyogenes*.

El aceite esencial es activo contra *E. Coli* y *S. Aureus* y repelente de mosquitos. Una de las especies botánicas que de alguna manera a manifestado algunas propiedades antibióticas, es el *E. Globulus*, especialmente en las hojas.

Del eucalipto utilizado en terapéutica: se usan las hojas, la esencia, el eucaliptol en estado puro. Su poder antiséptico es tres veces mayor que el fenol. Las hojas también pueden utilizarse como astringente por el tánino, han sido utilizadas las hojas como antifebrifugo.

La esencia o aceite de eucalipto, se obtiene por destilación con vapor de las hojas frescas de *E. Globulus* o de cualquier especie de eucalipto. Se recolecta de preferencia las hojas no demasiado jóvenes que contienen menos esencia, cuando se observan a trasluz se aprecian abundantes estructuras traslúcidas que son glándulas de esencia.

La esencia es un líquido incoloro o color amarillo pálido, neutro, transparente con olor fuerte aromático, sabor a especies, dejando sensación a frescura en la lengua.

Usos medicinales tradicionales:

Se emplean las hojas en infusiones o decocciones contra resfriados y afecciones bronquiales, en inhalaciones en caso de sinusitis, gripe, tos, asma, amigdalitis, faringitis, laringitis y hasta tuberculosis. Es también utilizado para tratar afecciones digestivas, así como para artritis, reumatismo, diabetes, estomatitis entre otras. Tópicamente se usa en heridas, llagas, quemaduras, úlceras, etc.

Las hojas son remedio popular contra el paludismo y como expectorantes.

3.3 Monografía de *Rosmarinus officinalis*^(2,3,8,9)

Familia: Lamiaceae

Nombre Común: Romero

Descripción Botánica:

Arbusto aromático, siempre verde, hasta 1.2 m de alto, tallo erecto, ramas numerosas, corteza exfoliante, finamente pulverulenta. Hojas sesiles, opuestas, verdes, numerosas, lanosas, obtusas, glandulares, 1-3 cm de largo casi cilíndricas dobladas hacia adentro. Flores fragantes de 10-12 mm de largo en pequeños grupos terminales; cáliz bilabiado color violeta, estilo largo. Fruto ovalado dividido en cuatro secciones.

Hábitat y Distribución:

Nativo de la cuenca mediterránea del sur de Europa, introducido en toda América en clima templado y seco; en alturas variables.

Composición Química:

Las hojas contienen aceite esencial, polifenoles, pigmentos flavónicos (apigenina, luteolina), ácidos orgánicos (cafeico, clorogenico, fenolico, neoclorogenico, rosmarinico), alcaloides diterpenicos (isorosmaricina, metilrosmaricina, rosmaricina), flavona (repriteína), diterpenoides (picrosalvina, rosmadiol, rosmanol, rosmarinol, rosmariquinona), ácido ursólico, taninos, salvigenina, hispidulina, nepetina y genkwareno

El aceite esencial posee una densidad de 0.894–0.913 y un índice de refracción 1.466–1.468; contiene alfa-pineno (7-25%), camfreno (2-9%), 1,8 cineol (14-32%), alcanfor (10-15%), borneol (18%), acetato de bornilo, mirceno, alfa-felandreno, limoneno, γ -termineno, p-cimeno, linalool (1.4-1.7%) cariofileno y alfa-terpineol.

Actividad Biológica:

Al romero se le atribuyen propiedades antioxidante, antiséptica, aperitiva, astringente, carminativa, colagoga, digestiva, diurética, amenagogo, espasmolítica, estomacica, febrífuga, insecticida secretolitica, sedante, sudorífica y tónica.

Farmacología:

Estudios antimicrobianos demuestran que las hojas son antibacterianas, la tintura de hojas es activa contra *C. albicans*.

El aceite esencial inhibe las contracciones del músculo liso de traquea de conejo y cobayo.

En un estudio clínico de 120 pacientes con bronquitis crónica al que se administró el extracto, demostró que la mayoría tuvo resultados buenos (77%), mejorando su expectoración significativamente.

Usos medicinales tradicionales:

La infusión de hojas se utiliza para tratamiento oral de amigdalitis, anemia, bronquitis, cefalea, cólicos, debilidad, depresión, desordenes circulatorios, diarrea,

dispepsia, dolores diversos, edema, hipotensión, indigestión, influenza, náusea, neuralgia, parasitismo y vértigo; la decocción en vino se usa para combatir afecciones respiratorias y nerviosas.

Las hojas maceradas en alcohol se usan tópicamente para fricciones y evitar la caída del cabello.

Toxicología:

El aceite esencial está contra indicado en el embarazo, enteritis y prostatitis. Se debe tener prudencia al usar las hojas y el aceite esencial ya que puede causar irritación renal, gastroenteritis, nefritis, convulsiones y rubefacción dérmica.

3.4 Aceites Esenciales^(15,22)

3.4.1 Definición

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes y medicamentos).

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser:

- Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos)
- Monoterpenos
- Sesquiterpenos
- Fenilpropanos

En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados.

3.4.2 Clasificación

Los aceites esenciales se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios.

De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en esencias fluidas, bálsamos y oleorresinas. Las Esencias fluidas son líquidos volátiles a temperatura ambiente. Los Bálsamos son de consistencia más espesa, son poco volátiles y propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, Estoraque, etc. Las Oleorresinas tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, balata, oleorresina de paprika, de pimienta negra, de clavero, etc.).

De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como naturales, artificiales y sintéticas. Los naturales se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas. Los artificiales se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecida con linalool, o la esencia de anís enriquecida con anetol. Los aceites esenciales sintéticos como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.).

Desde el punto de vista químico y a pesar de su composición compleja con diferentes tipos de sustancias, los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de sustancias que son los componentes mayoritarios. Según esto los aceites esenciales ricos en monoterpenos se denominan aceites esenciales

monoterpenoides (p.ej. hierbabuena, albahaca, salvia, etc.). Los ricos en sesquiterpenos son los aceites esenciales sesquiterpenoides (p. ej. copaiba, pino, junípero, etc.). Los ricos en fenilpropanos son los aceites esenciales fenilpropanoides (p. ej. clavo, canela, anís, etc.).

Aunque esta clasificación es muy general nos resultará útil para propósitos de estudiar algunos aspectos fotoquímicos de los monoterpenos, los sesquiterpenos y los fenilpropanos.

3.4.3 Distribución y Estado Natural

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas, etc. Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas (ajenjo, albahaca, buchú, cidrón, eucalipto, hierbabuena, limoncillo, mejorana, menta, pachulí, quenopodio, romero, salvia, toronjil, etc.), en las raíces (angélica, asaro, azafrán, cálamo, cúrcuma, galanga, sándalo, sasafrás, valeriana, vetiver, etc.), en el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.), en las semillas (anís, cardamomo, eneldo, hinojo, comino, etc.), en el tallo (canela, caparrapí 3, etc.), en las flores (arnica, lavanda, manzanilla, piretro, tomillo, clavo de olor, rosa, etc.) y en los frutos (alcaravea, cilantro, laurel, nuez moscada, perejil, pimienta, etc.). Aunque en los aceites esenciales tanto los mono, sesquiterpenos y los fenilpropanos se les encuentra en forma libre, más recientemente se han investigado los que están ligados a carbohidratos 5, ya que se considera que son los precursores inmediatos del aceite como tal.

3.4.4 Extracción y Aislamiento

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles, enfleurage y con fluidos supercríticos.

En la expresión el material vegetal es exprimido para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de la esencia de cítricos.

En la destilación por arrastre con vapor de agua, la muestra vegetal generalmente fresca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluidas, especialmente las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada.

En el método de extracción con solventes volátiles, la muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, porque se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos solventes orgánicos volátiles.

En el método de enflorado o enfleurage, el material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con un aceite vegetal.

La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y aceite vegetal la cual es separada posteriormente por otros medios físico-químicos. Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa.

El método de extracción con fluidos supercríticos, es de desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico (por ejemplo dióxido de carbono líquido), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor y se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia pura. Aunque presenta varias ventajas como rendimiento alto, es ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar, y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes de la esencia, sin embargo el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones.

3.5 Micosis⁽¹⁹⁾

Se engloban con el nombre genérico de Micosis las infecciones producidas por las especies de hongos considerados patógenos para el Hombre.

Los hongos son organismos vivos que por sus características biológicas se clasifican aparte de vegetales y animales; la mayoría de ellos son saprofitos es decir, viven a expensas de un huésped sin causarle ningún perjuicio y en determinadas ocasiones cuando se dan las condiciones apropiadas para ello, se comportan como patógenos, es decir son capaces de producir enfermedad.

Se han descrito más de 100,000 especies de hongos en la naturaleza, de los cuales 100 han demostrado ser patógenos para el ser humano.

Las micosis o dermatomícosis se pueden transmitir de forma directa, de persona a persona o indirecta a través de objetos contaminados, generalmente de uso personal o compartido por muchas personas y en especial en ambientes en los que haya abundante humedad, agua o temperatura elevada.

Los dermatofitos son hongos filamentosos que afectan a la epidermis y anejos cutáneos invaden las capas queratinizadas de la piel, pelos y uñas; producen manifestaciones clínicas muy variables desde síntomas leves hasta lesiones supuradas e inflamatorias intensas que reciben el nombre genérico de dermatomícosis o tiña.

Las dermatomícosis son infecciones de carácter benigno que ha diferencia de las micosis profundas no implican riesgo alguno para la vida del paciente. Los principales hongos implicados son los Dermatofitos, Emmons en 1934 los clasifico

en: *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton* todos ellos tienen una predilección por afectar tejidos ricos en queratina como la piel, pelo y uñas.

Los dermatofitos se clasifican en Antropofílicos, Zoofílico y Geofílicos según sea su fuente de contagio: Hombre, Animal o Suelo.

Los Antropofílicos afectan únicamente al hombre entre ellos: *Microsporum audinii*, *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* etc. y aparecen como brotes epidérmicos en comunidades cerradas.

Los Zoofílicos afectan a los animales y el contagio se adquiere a partir de animales contaminados y son los más frecuentes en las estadísticas de prevalencia, entre ellos se pueden citar: *Microsporum canis*, *Trichophyton verrucosum* etc.

Mientras que los Geofílicos forman parte del suelo y se encuentran como saprofitos nutriéndose de la queratina existente en el pelo, escamas y plumas; por quienes tanto el hombre como los animales los adquieren por contacto directo.

De las distintas especies antes citadas *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum* son de distribución universal, siendo las que se aíslan con más frecuencia en nuestro medio. La localización y aspecto de la lesión nos orientará sobre la posible implicación de un determinado dermatófito. Así las especies pertenecientes al género *Microsporum* afectan el pelo y la piel; *Epidermophyton floccosum* invaden la piel y las uñas y *Trichophyton* infectan tanto el pelo como la piel y las uñas.

3.6 Características Microscópicas y Morfológicas de los Hongos⁽⁶⁾

Antes de comentar las características específicas de las diversas especies de hongos, deben considerarse algunos de los aspectos microscópicos generales.

La unidad microscópica fundamental de un hongo es una estructura semejante a hilos llamada hifa. Varias hifas se combinan para formar un micelio. Las hifas que están subdivididas en células individuales por paredes transversales denominadas tabiques son tabicadas; aquellas sin paredes no lo son. La porción del micelio que se extiende en el sustrato o medio de cultivo es el micelio vegetativo; la porción que se proyecta por encima del sustrato es el micelio aéreo o reproductivo, en el que a menudo se reproducen esporas.

La identificación y clasificación de los hongos se basa sobre todo en las diferencias morfológicas y sus estructuras reproductivas. Los hongos se reproducen formando esporas que son vehiculizadas por una variedad de estructuras especializadas denominadas *cuerpos de fructificación*. Pueden observarse los tres tipos generales de reproducción o formación de esporas que figuran a continuación:

- Esporulación vegetativa. Pueden formarse tres tipos de esporas directamente del micelio vegetativo: blastoconidios, clamidosporas y artroconidios.
- Esporulación aérea. La esporulación aérea en general es más elaborada que la esporulación vegetativa y las esporas son vehiculizadas dentro de una variedad de cuerpos de fructificación, o sobre ellos.

La formación de estructuras cerradas, semejantes a sacos, llamados *esporangios* de los cuales se producen las *esporangiospora* es característica de los cigomicetos. Las esporas producidas directamente en la superficie de una

variedad de estructuras de fructificación se denomina conidios (palabra latina para “polvo”). Los conidios pueden ser vehiculizados individualmente, en cadenas o en cúmulos, de segmentos hifales especiales denominados conidioforos.

Los conidios diminutos (1 a 2 unidades), por lo general de una sola célula, se denominan preferentemente *Microconidios*, aunque también se ha usado el término microaleuriosporas. Las esporas más grandes, multicelulares se denominan macroconidios ó macroaleuriosporas.

- Esporulación sexuada. La esporulación sexuada no es una característica común de los hongos de importancia médica que suelen encontrarse en los laboratorios clínicos.

3.6.1 Características Microscópicas⁽⁶⁾

- *Microsporum*

El rango distintivo principal es la presencia de macroconidios multicelulares que tienen paredes gruesas y rugosas. *Microsporum canis* produce macroconidios en forma de barril, puntiagudos en el extremo el cual tiene tendencia a inclinarse hacia a un lado.

- *Trichophyton*

Los macroconidios están típicamente ausentes o se encuentran presentes solo en pequeño número, si están presentes son alongados y con forma de lápiz, son multicelulares y tienen paredes lisas y delgadas. Los microconidios *Trichophyton rubrum* tienden a la forma de lagrima y habitualmente se distribuyen en cualquiera de los lados de las hebras hifales, presentando el aspecto de “pájaros en la cerca”.

- *Epidermophyton*

No presenta microconidios una observación clave para la identificación presuntiva, por lo general presentan macroconidios con forma de clava; tiene de tres a cinco células de paredes lisas y delgadas.

3.6.2 Características Morfológicas⁽⁶⁾

Cualquier hongo recuperado de cultivos de muestra de piel, uñas o pelos debe ser sospechoso de pertenecer a una de las especies dermatófitas. Debido a que las colonias varían considerablemente en sus índices de crecimiento, morfología y pigmentación las designaciones de género y especie dependen de características microscópicas.

Las colonias de *Epidermophyton floccosum* que crecen en agar dextrosa saboraud son de color caqui o verde-amarillo y tienen micelio aéreo bajo, dando una consistencia de gamuza a la superficie de crecimiento, por lo general se ven pliegues suaves.

Microsporum canis es algodonoso o lanoso y puede sospecharse que los bordes de la colonia presenten una franja amarillo-limón en el reverso de la colonia.

El *Trichophyton rubrum* produce un pigmento rojo borgoña, soluble en agua que difunden en el agar en particular cuando crece en agar dextrosa-papa.

3.7 Identificación de las Dermatosis⁽¹⁹⁾

Clínicamente, las dermatosis se manifiestan en forma de lesiones cutáneas redondeadas u ovaladas, generalmente enrojecidas, que se descaman y con borde activo ligeramente elevado. La piel suele estar seca y se descama con facilidad, observándose además fisuras y lesiones más profundas en las infecciones del pie.

El síntoma principal que caracteriza a estas infecciones es el picor o prurito. En la inmensa mayoría de ocasiones la lesión aumenta de tamaño o en número y es preciso el tratamiento específico de las micosis con antifúngicos.

Casi todas estas infecciones se diagnostican con facilidad dado su aspecto clínico característico y su evolución y sólo es necesaria la confirmación por laboratorio y microscopía óptica de los casos dudosos y cuando no responde tratamiento.

Las tiñas se suelen denominar en función de la parte del cuerpo que afecten y así existe la tiña de la cabeza o de la barba, la tiña del cuerpo, la tiña de la ingle, la tiña de la mano o la tiña del pie. De todas ellas, la más frecuente y que afecta a un elevado porcentaje de personas, especialmente a gente joven, es la tiña del pie conocida desde finales del siglo pasado y denominada popularmente como “pie de atleta”.

El “pie de atleta” es una infección muy contagiosa producida especialmente por especies antropofílicas de dermatofitos siendo *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* los géneros que se aíslan con mayor frecuencia. Generalmente, la infección se adquiere de forma indirecta a través de objetos de uso personal contaminados como toallas, zapatos, calcetines, etc. y a partir de lugares de uso público contaminados como piscinas, duchas públicas, vestuarios, etc. motivo por el cual afecta con frecuencia a gente joven y sobre todo a deportistas (atletas). Las lesiones pueden extenderse a los pulpejos de los dedos, zona interior de la planta y dorso del pie.

3.8 Método de Kirby- Bauer Modificado^(6,20,21)

Este Método, que es el más frecuentemente usado, es también llamado Difusión en Agar o Kirby–Bauer. En este caso el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de Agar, completamente sin dejar ninguna zona libre. Esto se consigue deslizando el hisopo por la superficie del agar tres veces rotando la placa unos 60° cada vez, sobre el cual se colocan cilindros de acero inoxidable con una concentración conocida del antibiótico, se recomienda que los cilindros sean colocados antes de que transcurran 15 minutos de haber inoculado la placa. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35 °C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el cilindro a través del agar, por lo que su concentración va disminuyendo a medida que se aleja del disco. En un punto determinado, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir el microorganismo en estudio. Las áreas de inhibición grandes alrededor del cilindro indican una actividad antimicrobiana más efectiva.

IV. DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

Metodología

Tipo de Estudio: Experimental y Deductivo

4.1 Revisión Bibliográfica

Se visitaron aquellas Instituciones Públicas y Privadas para recolección de Información referente al tema tales como:

- Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador
- Biblioteca de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador
- Universidad Alberto Másferrer
- Universidad Nueva San Salvador
- Dirección General de Estadística y Censo
- Jardín Botánico Nacional

4.2 Investigación de Campo

Universo:

Plantas Medicinales

Muestreo dirigido a: las hojas secas de *Lippia graveolens* (Orégano), y *Rosmarinus officinalis* (Romero) y hojas frescas de *Eucalyptus globulus* (Eucalipto).

Hongos Patógenos

Muestreo dirigido a los Hongos: *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton Floccosum*.

4.3 Investigación de Laboratorio

4.3.1 Recolección y Preparación del Material Vegetal

La recolección del Material Vegetal se realizó en diferentes lugares, cuidando que éste no estuviera dañado ni afectado por plagas.

- Las hojas de Orégano procedían del Departamento de La Paz y se utilizaron secas y previamente fraccionadas.
- Las hojas de Romero se obtuvieron en el Comercio y se utilizaron secas
- Las hojas de Eucalipto se recolectaron en el Campus Universitario y se utilizaron frescas.

Todo el Material Vegetal se lavó con abundante agua potable y desmineralizada.

4.3.2 Extracción de los Aceites esenciales^(5,7)



Figura No. 1

Aparato de Destilación de Arrastre por Vapor

Descripción del equipo:

Balón A: Agua destilada

Balón B: Material Vegetal

Procedimiento

1. Pesar 600 g del Material Vegetal
2. Colocar el Material Vegetal en el balón B y agregar una pequeña cantidad de agua desmineralizada
3. Colocar en el balón A agua a la mitad de su capacidad
4. Armar el equipo
5. Someter a temperatura de 100 oC el balón A permitiendo de esta manera que el agua pase a estado de vapor y se disperse por las varillas conectadas hasta el balón B
6. Mantener la temperatura del balón B a 80o C aproximadamente, este vapor extrae el aceite esencial del material vegetal; de esta forma sigue el recorrido en la varilla de vidrio la cual y el vapor es condensado en el refrigerante
7. Recolectar la mezcla obtenida de aceite esencial y agua en un erlenmeyer previamente colocado en baño de hielo para evitar que el aceite se evapore
8. La mezcla obtenida se coloca en una ampolla de separación y se deja por 2 días en reposo para poder separar el aceite esencial.

9. Identificación de los Componentes de los Aceites por Cromatografía de Capa Fina

Se detectarán los componentes de los aceites por la coloración que presenten las manchas generadas luego de ser rociadas por un detector químico.

- Muestras: Aceites obtenidos por arrastre por vapor
- Estándar: Muestras comerciales de aceite de Orégano, Romero y Eucalipto
- Fase Estacionaria: Cromatóplacas de Sílica Gel GF-254 y Placas Cromatográficas de Sílica Gel-60 F-254 Prefabricadas (MERK)
- Fase Móvil: Tolueno-Acetato de Etilo (93:7)
- Soluciones Reveladoras:
 - A. Ácido Sulfúrico 5% en Etanol
 - B. Vainillina 1% en etanol

Preparación de las Soluciones Reveladoras:

- Solución A: Ácido Sulfúrico al 5 %
Colocar 5 mL de Ácido Sulfúrico en un balón de 100 mL
Diluir con Etanol 95°
Llevar a volumen.
- Solución B: Vainillina al 1 %
Pesar 1.0 g de Vainillina
Disolverla en Etanol a 95°
Llevar a volumen en un balón de 100 mL.

Rociar las placas primero con la solución A y luego con la solución B. Colocar las placas en una estufa a 105 °C por 5 minutos y observar las coloraciones formadas.

Resultado positivo: Manchas de color Azul-Violeta.

CROMATOGRAFÍA DE CAPA FINA^(5,14)

Colocar 5 μ l de una dilución 1 en 10 de cada aceite en tolueno a 2.5 cm del borde inferior de la placa cromatográfica, dejando 4 cm entre cada muestra y 3 cm a ambos lados.



Introducir la placa dentro de la cámara cromatográfica saturada con la fase móvil.



Dejar que la fase móvil corra dos terceras partes de la placa y retirar la placa de la cámara cromatográfica.



Colocar la placa cromatográfica a temperatura ambiente hasta secar y observar bajo una fuente de luz ultravioleta a una longitud de onda corta de 254 nm y onda larga de 366 nm



Observar la coloración de las manchas producidas por la muestra y estándar.



Rociar la placa anterior con solución reveladora A, secar, luego rociar la solución reveladora B. Dejar secar y observar manchas a simple vista y luego calentar a temperatura de 110 °C en estufa. Prueba positiva: aparecimiento de manchas color violeta-azul



Medir las distancias desde el punto de inyección hasta el centro de cada una de las manchas generadas por las muestras



Medir la distancia desde el punto de inyección hasta la línea producida por el recorrido de la fase móvil



Obtener el Factor de Referencia (Rf).

4.3.3 Pruebas de identificación Morfológicas y Microscópica de los hongos.
Las tres especies de Hongos *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum*, fueron proporcionados por la Facultad de Ingeniería Agronomía de la Universidad de El Salvador.

4.3.3.1 Identificación Morfológica de los Hongos⁽⁶⁾

Para el examen morfológico se sembró cada hongo en Agar Sabouraud utilizando la técnica del hisopo. Se incubó por 5-7 días a temperatura ambiente y se observó las características de las colonias*.

4.3.3.2 Identificación Microscópica de los Hongos⁽⁶⁾

La identificación se efectúa, en primer lugar, por examen microscópico directo para lo cual se coloca una gota de KOH (Hidróxido de Potasio) del 10 % en un portaobjetos y se mezcla con una pequeña cantidad del microorganismo a examinar. A continuación se pasa el portaobjeto a través de una llama baja de un mechero Bunsen para facilitar la aclaración pero evitando que hierva*.

* Se comprobaron las características por comparación del Cuadro No.1

CUADRO No. 1 CARACTERÍSTICAS DE LOS HONGOS ⁽⁶⁾

Especie	Morfología de las colonias	Características microscópicas	Otras características
<i>Microsporum canis</i>	Las colonias producen una superficie blanca, a tostada granular a vellosa. En la periferia del margen de crecimiento es típico observar un manto amarillo limón. Por lo general, el reverso de las colonias es Amarillo - naranja.	Rara vez produce microaleuriosporas; si están presentes, tienen formas raras. Por lo general abundan clamidosporas terminales y cuerpos pectiniformes.	No crecen en medios con granos de arroz.
<i>Trichophyton rubrum</i>	Las colonias son generalmente blancas y de consistencia blanda, pero pueden ser rosadas o rojizas. Las cepas con esporulación densa presentan variantes coloniales granulares. El reverso a menudo es rojo vino a rojo- amarillo, en particular en agar-harina de maíz.	Las microaleuriosporas por lo común son producidas en profusión, tienen forma de lagrima y nacen lateral e individualmente de las hifas. Por lo general no hay macroaleuriosporas y si las hay, son de paredes delgadas, lisas y con forma de cigarro.	La prueba de ureasa no es rápidamente positiva (puede verse un resultado débilmente positivo en siete días).
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Las colonias son generalmente blancas y vellosas. Con la edad tienden al color caqui-marrón. Los centros de las colonias suelen estar plegados. El reverso es amarillo-marrón con pliegues visibles.	No producen microaleuriosporas. Las macroaleuriosporas son grandes de paredes lisas con forma de clava y divididas en dos a cinco células. Nacen individualmente o en cúmulos de dos a tres elementos	No presentan características especiales; pueden ser confundido con <i>M. Nanum</i> ; sin embargo, las macroaleuriosporas de esta especie son de paredes gruesas y erizadas.

4.3.4 Determinación de la Concentración Efectiva de los Aceites a 2000 ppm por el Método de Kirby-Bauer Modificado sobre los Hongos de prueba⁽¹²⁾

4.3.4.1 Preparación de los Aceites

Pesar 20 mg de cada uno de los aceites



Disolver en 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO)



Colocar en un balón volumétrico de 10 mL



Llevar a volumen.
(Concentración final = 2000 ppm)

4.3.4.2 Preparación del control positivo de Ketoconazol al 1% y 1.2% Ketoconazol Materia Prima

Pureza: 100.5 %

Cálculos para obtener Ketoconazol al 100%

100 g de Ketoconazol ----- 100.5 g

X ----- 1.0 g

X = 0.995 g de Ketoconazol para preparar una solución al 1%

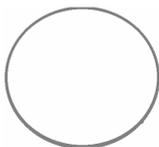
X = 1.194 g de Ketoconazol para preparar una solución al 1.2 %

Pesar 0.995 g de Ketoconazol en Balanza Analítica y transferir a un balón volumétrico de 100 mL

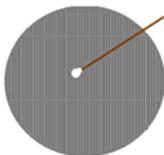


disolver con 20 mL de Dimetilsulfóxido y llevar a volumen

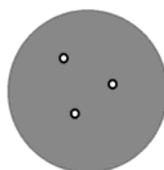
4.3.5.3 Desarrollo del Método Kirby-Bauer Modificado^(6, 3, 20, 21)



Tocar la superficie de cuatro o cinco colonias aisladas de la placa (hongos dermatofitos patrones) con un hisopo.



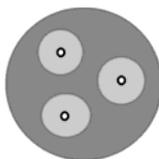
Colocar por el método de hisopado o extendido en las placas con el medio agar Sabouraud



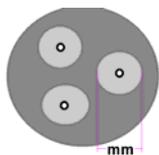
Colocar cilindros de acero inoxidable estériles sobre las placas que ha sido inoculados con los dermatofitos en estudio.

Colocar el aceite esencial de cada planta en estudio y el patrón de comparación (ketoconazol 1 %) respectivamente. Realizar el análisis por triplicado.

Incubar a temperatura ambiente por 8-15 días.



Observar la nitidez de las zonas de inhibición alrededor de los cilindros que contienen el aceite y el patrón de comparación.



Las zonas de inhibición alrededor de los cilindros se deben medir con una regla graduada en milímetros.

4.3.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria^(6,21,22)

La Concentración Mínima Inhibitoria es la medida de la concentración más baja del aceite, necesaria para inhibir el crecimiento visible de los microorganismos.

4.3.5.1 Preparación de los Aceites

Concentración 2000 ppm:

Pesar 20 mg de cada uno de los aceites



Disolver en 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO)



Colocar en un balón volumétrico de 10 mL



Llevar a volumen.
(Concentración final =2000 ppm)

Concentración de 1000 ppm:

Pesar 10 mg de cada uno de los aceites



Disolver en 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO)



Colocar en un balón volumétrico de 10 mL



Llevar a volumen.
(Concentración final =1000 ppm)

Concentración de 500 ppm:

Tomar 5 mL de la solución de 1000 ppm



Colocar en un balón volumétrico de 10 mL



Llevar a volumen con dimetilsulfóxido
(Concentración final = 500 ppm)

Concentración 250 ppm:

Tomar 5 mL de la solución de 500 ppm



Colocar en un balón volumétrico de 10 mL



Llevar a volumen con DimetilSulfóxido
(Concentración final =250 ppm)

Concentración de 125 ppm:

Tomar 5 mL de la solución de 250 ppm



Colocar en un balón volumétrico de 10 mL



Llevar a volumen con DimetilSulfóxido
(Concentración final = 125 ppm)

Concentración 75 ppm:

Tomar 0.75 mL de la solución de 1000 ppm



Colocar en un balón volumétrico de 10 mL



Llevar a volumen con DimetilSulfóxido
(Concentración final =75 ppm)

4.3.5.2 Interpretación de Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria

Cuadro No.2 Especificaciones según la Asociación Argentina de Fitomedicina sobre los Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria.

Clasificación de Interpretación	Interpretación
Positivo	Si el radio del halo es mayor a 9 mm (diámetro mayor a 18 mm)
Actividad Intermedia	Si el radio del halo es de 6-9 mm (diámetro entre 12 –18 mm)
Negativo (Sin Actividad)	Si el radio del halo es inferior a 6 mm (diámetro inferior a 12 mm)

4.3.6 Determinación de la Concentración Mínima Fungicida^(21,22)

La Concentración Fungicida es la concentración que reduce el crecimiento del hongo en un 99.99%.

4.3.6.1 Preparación de los Aceites

Concentración de 2000 ppm:

Pesar 20 mg de cada uno de los aceites

Disolver en 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO)



Colocar en un balón volumétrico de 10 mL



Llevar a volumen.
(Concentración final =2000 ppm)

Concentración de 4000 ppm:

Pesar 40 mg de cada aceite esencial



Disolver en 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO)



Colocar en un balón volumétrico de 10 mL



Llevar a volumen. (Concentración final = 4000 ppm)

Concentración de 6000 ppm:

Pesar 60 mg de cada aceite esencial



Disolver en 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO)



Colocar en un balón volumétrico de 10 mL



Llevar a volumen.

(Concentración final = 6000 ppm)

Concentración 8000 ppm:

Pesar 80 mg de cada aceite esencial



Disolver en 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO)



Colocar en un balón volumétrico de 10 mL



Llevar a volumen.

(Concentración final = 8000 ppm)

Concentración 10000 ppm:

Pesar 100 mg de cada aceite esencial



Disolver en 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO)



Colocar en un balón volumétrico de 10 mL



Llevar a volumen.
(Concentración final = 10000 ppm)

Concentración 12000 ppm:

Pesar 120 mg de cada aceite esencial



Disolver en 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO)



Colocar en un balón volumétrico de 10 mL



Llevar a volumen.
(Concentración final = 12000 ppm)

V. RESULTADOS

5.0 RESULTADOS

Los aceites seleccionados presentan las siguientes características

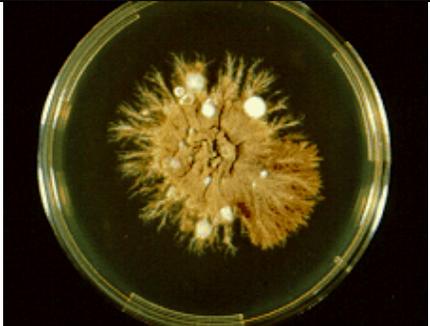
CUADRO No.3 Características Organolépticas de los Aceites Esenciales
Obtenidos por el Método de Arrastre por Vapor.

ACEITE	CARACTERÍSTICA
<i>Lippia graveolens</i> (Orégano)	Líquido color amarillo, olor aromático agradable, pero fuerte y sabor amargo.
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero)	Líquido incoloro con olor a alcanfor similar al obtenido al triturar las hojas.
<i>Eucalyptus globulus</i> (Eucalipto)	Líquido incoloro con olor característico al eucalipto, similar al obtenido al triturar las hojas.

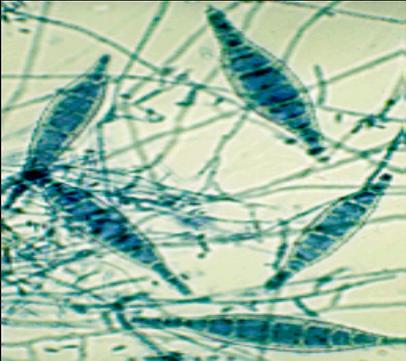
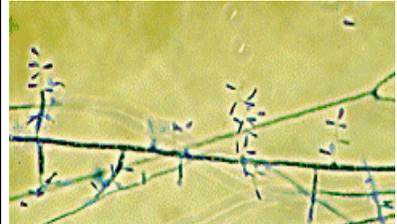
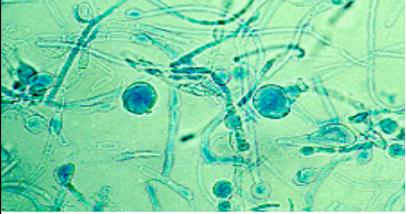
CUADRO No. 4 Resultados de la Identificación de los Componentes de los Aceites Esenciales por Cromatografía de Capa Fina.

Nombre del Aceite Esencial	Rf Teórico	Rf Practico	Color con Vainilla-Ácido Sulfúrico 5%	Posibles Componentes
<i>Lippia graveolens</i> (Orégano)	0.52	0.57	Violeta	Timol
	0.30	0.34	Azul	Linalool
<i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero)	0.24	0.19	Azul	Borneol
	0.30	0.30	Azul	Linalool
	0.40	0.40	Azul	1,8 Cineol
<i>Eucalyptus globulus</i> (Eucalipto)	0.40	0.36	Azul	1,8 Cineol
	No reportado	0.44	Azul - violeta	No reportado
	No reportado	0.58	Violeta	No reportado

CUADRO No. 5 Resultados del Análisis Morfológico de los Hongos en Estudio.

HONGO	CARACTERÍSTICA Según referencia ⁶	RESULTADO
<i>Microsporium canis</i>	Colonias con superficie blanca vellosa, reverso de las colonias es amarillo-naranja	 <p>Corresponde a la especificación</p>
<i>Trichophyton rubrum</i>	Colonias son blancas y con tiempo rosadas a rojizas. El reverso es rojo vino a rojo amarillo.	 <p>Corresponde a la especificación</p>
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Colonias blancas y vellosas, con la edad se vuelve caqui.	 <p>Corresponde a la especificación</p>

CUADRO No. 6 Resultados del Análisis Microscópico de los Hongos en Estudio.

HONGO	CARACTERÍSTICA Según referencia ⁶	RESULTADO
<i>Microsporium canis</i>	Macroconidios en forma de barril con extremo inclinado hacia un lado.	 <p>Corresponde a la especificación</p>
<i>Trichophyton rubrum</i>	Microaleuriosporas con forma de lagrima.	 <p>Corresponde a la especificación</p>
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Macroaleuriosporas con forma de clava, divididas en 2 a 5 células.	 <p>Corresponde a la especificación</p>

CUADRO No. 7 Resultados de la Concentración Efectiva de los Aceites 2000 ppm . *

Microorganismo de Prueba	Especie Vegetal (Diámetro de Halo de Inhibición mm)		
	<i>L. graveolens</i> (Oregano)	<i>R. officinalis</i> (Romero)	<i>E. globulus</i> (Eucalipto)
<i>Microsporum canis</i>	30	31	38
<i>Trichophyton rubrum</i>	40	33	36
<i>Epidermophyton floccosum</i>	42	32	39

Se realizó blanco de dimetilsulfóxido el cual no fué efectivo.

* Los resultados son la media aritmética de 2 experimentos, en los cuales cada dilución fue realizada por triplicado.

CUADRO No.8 Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria a 1000 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto.*

Microorganismo de Prueba	Especie Vegetal (Diámetro de Halo de Inhibición mm)		
	<i>L. graveolens</i> (Oregano)	<i>R. officinalis</i> (Romero)	<i>E. globulus</i> (Eucalipto)
<i>Microsporum canis</i>	25	28	25
<i>Trichophyton rubrum</i>	35	31	30
<i>Epidermophyton floccosum</i>	39	26	32

CUADRO No.9 Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria a 500 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto.*

Microorganismo de Prueba	Especie Vegetal (Diámetro de Halo de Inhibición mm)		
	<i>L. graveolens</i> (Oregano)	<i>R. officinalis</i> (Romero)	<i>E. globulus</i> (Eucalipto)
<i>Microsporum canis</i>	21	20	22
<i>Trichophyton rubrum</i>	20	20	21
<i>Epidermophyton floccosum</i>	35	22	25

* Los resultados son la media aritmética de 2 experimentos, en los cuales cada dilución fue realizada por triplicado.

CUADRO No.10 Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria a 250 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto.*

Microorganismo de Prueba	Especie Vegetal (Diámetro de Halo de Inhibición mm)		
	<i>L. graveolens</i> (Oregano)	<i>R. officinalis</i> (Romero)	<i>E. globulus</i> (Eucalipto)
<i>Microsporum canis</i>	12	12	20
<i>Trichophyton rubrum</i>	12	12	15
<i>Epidermophyton floccosum</i>	30	19	20

CUADRO No.11 Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria a 125 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto.*

Microorganismo de Prueba	Especie Vegetal (Diámetro de Halo de Inhibición mm)		
	<i>L. graveolens</i> (Oregano)	<i>R. officinalis</i> (Romero)	<i>E. globulus</i> (Eucalipto)
<i>Microsporum canis</i>	8	8	12
<i>Trichophyton rubrum</i>	8	8	12
<i>Epidermophyton floccosum</i>	20	12	12

 Concentración Inhibitoria

* Los resultados son la media aritmética de 2 experimentos, en los cuales cada dilución fue realizada por triplicado.

CUADRO No.12 Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria a 75 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto.*

Microorganismo de Prueba	Especie Vegetal (Diámetro de Halo de Inhibición mm)		
	<i>L. graveolens</i> (Oregano)	<i>R. officinalis</i> (Romero)	<i>E. globulus</i> (Eucalipto)
<i>Microsporium canis</i>	No hubo inhibición	No hubo inhibición	8
<i>Trichophyton rubrum</i>	No hubo inhibición	No hubo inhibición	8
<i>Epidermophyton floccosum</i>	12	8	8



Concentración Inhibitoria

* Los resultados son la media aritmética de 2 experimentos, en los cuales cada dilución fue realizada por triplicado.

CUADRO No.13 Resumen de la Concentración Mínima inhibitoria de los Aceites Esenciales de Orégano, Romero y Eucalipto ante los Microorganismos de Prueba.*

Microorganismo de Prueba	Especie Vegetal		
	<i>L. graveolens</i> (Orégano)	<i>R. officinalis</i> (Romero)	<i>E. globulus</i> (Eucalipto)
<i>Microsporium canis</i>	250 ppm	250 ppm	125 ppm
<i>Trichophyton rubrum</i>	250 ppm	250 ppm	125 ppm
<i>Epidermophyton floccosum</i>	75 ppm	125 ppm	125 ppm

De los tres hongos el que mostró mayor sensibilidad fue *Epidermophyton floccosum* encontrándose que con Orégano la concentración fue de 75 ppm, seguido de Romero y Eucalipto a 125 ppm.

En el caso de *Microsporium canis* y *Trichophyton rubrum* presentaron mayor sensibilidad al aceite de Eucalipto.

CUADRO No.14 Resultados de la Concentración Mínima Fungicida a 4000 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto.*

Microorganismo de Prueba	Especie Vegetal (Diámetro de Halo de Inhibición mm)		
	<i>L. graveolens</i> (Oregano)	<i>R. officinalis</i> (Romero)	<i>E. globulus</i> (Eucalipto)
<i>Microsporium canis</i>	33	33	38
<i>Trichophyton rubrum</i>	Inhibición del 99.99 %	36	40
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Inhibición del 99.99 %	36	42

CUADRO No.15 Resultados de la Concentración Mínima Fungicida a 6000 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto.*

Microorganismo de Prueba	Especie Vegetal (Diámetro de Halo de Inhibición mm)		
	<i>L. graveolens</i> (Oregano)	<i>R. officinalis</i> (Romero)	<i>E. globulus</i> (Eucalipto)
<i>Microsporium canis</i>	38	35	40
<i>Trichophyton rubrum</i>	Inhibición del 99.99 %	38	43
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Inhibición del 99.99 %	37	43

CUADRO No.16 Resultados de la Concentración Mínima Fungicida a 8000 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto.*

Microorganismo de Prueba	Especie Vegetal (Diámetro de Halo de Inhibición mm)		
	<i>L. graveolens</i> (Oregano)	<i>R. officinalis</i> (Romero)	<i>E. globulus</i> (Eucalipto)
<i>Microsporum canis</i>	41	37	43
<i>Trichophyton rubrum</i>	Inhibición del 99.99 %	40	44
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Inhibición del 99.99 %	39	45

CUADRO No.17 Resultados de la Concentración Mínima Fungicida a 10000 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto.*

Microorganismo de Prueba	Especie Vegetal (Diámetro de Halo de Inhibición mm)		
	<i>L. graveolens</i> (ganoOre)	<i>R. officinalis</i> (Romero)	<i>E. globulus</i> (Eucalipto)
<i>Microsporum canis</i>	Inhibición del 99.99 %	40	45
<i>Trichophyton rubrum</i>	Inhibición del 99.99 %	Inhibición del 99.99 %	45
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Inhibición del 99.99 %	40	Inhibición del 99.99 %

CUADRO No.18 Resultados de la Concentración Mínima Fungicida a 12000 ppm de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto.*

Microorganismo de Prueba	Especie Vegetal (Diámetro de Halo de Inhibición mm)		
	L. graveolens (Oregano)	R. officinalis (Romero)	E. globulus (Eucalipto)
<i>Microsporium canis</i>	Inhibición del 99.99 %	Inhibición del 99.99 %	Inhibición del 99.99 %
<i>Trichophyton rubrum</i>	Inhibición del 99.99 %	Inhibición del 99.99 %	Inhibición del 99.99 %
<i>Epidermophyton floccosum</i>	Inhibición del 99.99 %	Inhibición del 99.99 %	Inhibición del 99.99 %

A una concentración de 12000ppm se observó una inhibición del 99.99% para *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum* y *Microsporium canis*.

* Los resultados son la media aritmética de 2 experimentos, en los cuales cada dilución fue realizada por triplicado.

CUADRO No.19 Cuadro Resumen de la Concentración Mínima Fungicida de los Aceites Esenciales de Hojas de Orégano, Romero y Eucalipto ante los Microorganismos de Prueba.*

Microorganismo de Prueba	Especie Vegetal		
	<i>L. graveolens</i> (Oregano)	<i>R. officinalis</i> (Romero)	<i>E. globulus</i> (Eucalipto)
<i>Microsporium canis</i>	10000 ppm	12000 ppm	12000ppm
<i>Trichophyton rubrum</i>	4000 ppm	10000 ppm	12000 ppm
<i>Epidermophyton floccosum</i>	4000 ppm	12000 ppm	10000 ppm

Con respecto a los tres aceites ensayados el de Orégano presentó inhibición total. a concentraciones tan bajas como 0.4% frente a *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum*.

* Los resultados son la media aritmética de 2 experimentos, en los cuales cada dilución fue realizada por triplicado.

CUADRO No.20 Resultados de la Concentración Mínima Fungicida del Estándar Ketoconazol a 10,000 ppm y 12,000 ppm frente a los Hongos en Estudio.*

Microorganismo de Prueba	Diámetro de Halo de Inhibición (mm)	
	10000 ppm 1 %	12000 ppm 1.2 %
<i>Microsporium canis</i>	43	Inhibición del 99.9%
<i>Trichophyton rubrum</i>	Inhibición del 99.9%	Inhibición del 99.9%
<i>Epidermophyton floccosum</i>	38	Inhibición del 99.9%

10,000 ppm = 10 mg/ mL = 1 %

12,000 ppm = 12 mg/ mL = 1.2%

* Los resultados son la media aritmética de 2 experimentos, en los cuales cada dilución fue realizada por triplicado.

VI. ANÁLISIS DE RESULTADOS

6.0 Análisis de Resultados

Debido a la incidencia de enfermedades causadas por dermatofitos especialmente por: *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum* y dado que se conoce según la teoría que los aceites esenciales tienen propiedades antifúngicas, se estudiaron los aceites esenciales extraídos de las hojas de *Lippia graveolens* (Orégano), *Rosmarinus officinalis* (Romero), y *Eucalyptus globulus* (Eucalipto) por ser plantas comunes en el país.

En el Cuadro No. 3 se muestran las características organolépticas de los aceites obtenidos en el Laboratorio por el Método de Arrastre de Vapor en donde se observa que dichas características corresponden a lo especificado en la teoría. Además cada uno de los aceites presenta características especiales por lo cual aun por el olor se puede decir de que aceite se trata ya que estos presentan un olor similar al que se obtiene cuando se trituran las hojas.

Con el fin de verificar la identificación de algunos de los componentes de los aceites esenciales se realizó la Técnica de Cromatografía de Capa Fina (Ver cuadro No. 4) en donde se presentan algunos datos teóricos y los posibles componentes del aceite comparándolos con los Factores de Referencia (Rf) prácticos y el color de referencia que se obtiene con el revelador de vainillina y ácido sulfúrico 5%, para el caso de *Lippia graveolens* (Orégano) se identificaron 2 componentes del aceite como lo son el Timol y el Linalool, en el caso de *Rosmarinus officinalis* (Romero) se identificaron el Borneol, Linalool y el 1,8-cineol y en *Eucalyptus globulus* (Eucalipto) el 1,8-cineol.

Algunas diferencias numéricas entre el Factor de Referencia (Rf) teórico y el práctico, se debe a las condiciones de Laboratorio por lo cual se escogieron los valores más cercanos al teórico. Los posibles componentes del aceite se han tomado de la monografía de la planta en lo referente a la composición química de cada uno de los aceites.

Para iniciar la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Fungicida por el Método Kirby-Bauer Modificado se verificaron las características morfológicas de las colonias por observación visual de los hongos de prueba para tener la seguridad de que se trataba de ellos.

En el cuadro No.5 se presentan las características Morfológicas de cada hongo según la referencia teórica y los resultados experimentales observándose que corresponde a lo especificado.

Se observaron además Microscópicamente (ver cuadro No.6) comparando las características encontradas experimentalmente en los hongos con las reportadas por bibliografías, resultando semejantes por lo cual con ambos resultados morfológico y microscópico se comprueban que se trata de *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum*.

Se determinó la Concentración Efectiva de cada uno de los aceites a 2000 ppm, la cual representa el punto de partida para poder realizar luego la Concentración Mínima Inhibitoria y la Actividad Antifúngica.

Llevando como control positivo el Ketoconazol 1% (10000 ppm), se desarrolló la Concentración Efectiva, estos resultados se muestran en el cuadro No. 7 y el que mayor halo de inhibición presentó para los tres hongos fue el aceite de Orégano seguido del aceite de Eucalipto y por ultimo el aceite de Romero; se puede observar que en el caso de *Epidermophyton floccosum* tanto el Orégano como el Eucalipto mostraron mayores halos de inhibición que el control positivo (cuadro No. 20), se puede decir que estos hongos presentan una mayor sensibilidad con los aceites antes mencionados que el Ketoconazol.

En los cuadros 8, 9, 10,11 y 12 se presentan los resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria de los tres aceites y en el 13 el cuadro resumen de la Concentración Mínima Inhibitoria.

Tomando en consideración las especificaciones dadas por la Asociación Argentina de Fitomedicina, en el caso de *Microsporum canis* y *Trichophyton rubrum* para el Orégano y Romero las CMI fueron de 250 ppm equivalentes a 0.025% y en el caso de Eucalipto fue de 125 ppm ó sea 0.0125%.

De los tres hongos el que mostró mayor sensibilidad fué *Epidermophyton floccosum* encontrándose que con Orégano la concentración fue de 75 ppm equivalente a 0.0075% seguido de Romero y Eucalipto a 125 ppm equivalente a 0.0125% lo que indica que a concentraciones pequeñas se logro inhibirlo.

En el caso de *Microsporum canis* y *Trichophyton rubrum* presentaron mayor sensibilidad al aceite de Eucalipto.

Según la bibliografía los aceites esenciales poseen una actividad Inhibitoria tal como se demuestra con los resultados obtenidos.

En los cuadros 14, 15, 16 17 y 18 se observan los resultados de la Concentración Mínima Fungicida y el cuadro No. 19 presenta el resumen de estas Concentraciones frente a los tres aceites.

Según el concepto de Concentración Mínima Fungicida, es la concentración que reduce el crecimiento del hongo en un 99.99%, por tal razón en el caso del Orégano con el *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum* se logró la Concentración Mínima Fungicida a 4000 ppm equivale a 0.4%, y en el caso de *Microsporum canis* la Concentración Mínima Fungicida fue 10000 ppm equivalente a 1%, la diferencia en concentraciones mostradas por *M. canis* se debió a que este hongo presenta un mayor crecimiento, mayor resistencia y tiempo de vida mayor; además esto se observa también en el resultado del control positivo, el Ketoconazol al 1% al cual no lo inhibió completamente. Esto condujo a que se debía aumentar la concentración de este a 12000 ppm equivale a 1.2% en la cual si se observó inhibición por lo que podemos decir que el Orégano resultó ser mejor que el control positivo al inhibir el crecimiento de los tres hongos a concentraciones mucho menores.

El aceite de Romero inhibió el crecimiento de *Trichophyton rubrum* a 10,000 ppm al igual que lo hizo el control positivo a la misma concentración y en el caso de *Microsporum canis* y el *Epidermophyton Floccosum* el comportamiento fue similar al control positivo, o sea a 12000 ppm.

El aceite de Eucalipto a 10,000 ppm inhibió el crecimiento de *Epidermophyton floccosum* no así el control positivo que lo hizo a 12,000 ppm, y en el caso de

Microsporum Canis y *Trichophyton Rubrum* tanto el control positivo como el aceite de eucalipto la inhibición se logró por igual a 120000 ppm.

En general se puede decir que ha 12,000 ppm tanto los aceites como el control positivo de Ketoconazol inhibieron el crecimiento total de los hongos a excepción del aceite de Orégano.

Según el cuadro No.20 que corresponde a los resultados del Ketoconazol se observa que según lo planteado en los objetivos el control positivo al 1% (10,000 ppm) no logró la inhibición total de todos los hongos, por lo cual se tuvo que realizar ensayos de inhibición a concentraciones de 12000 ppm.

Estos resultados experimentales reafirman él porque los Laboratorios Farmacéuticos que elaboran preparados antifungicos con Ketoconazol los están realizando a una concentración del 2% debido a que los hongos han creado una mayor resistencia a este.

Con respecto a los tres aceites ensayados el de Orégano es el que mejores resultados a dado a concentraciones tan bajas como 0.4% que significa la tercera parte de la concentración del control positivo para obtener inhibición total.

Con estos resultados se abre un panorama de desarrollo para una planta que es tan común en el país y cuyo precio es también bajo. Además se puede fomentar cultivos para obtener cantidades grandes de materia vegetal con el fin de obtener los aceites esenciales como una alternativa natural de actividad fungicida.

No se puede dejar de lado que los resultados obtenidos con el Romero y Eucalipto similares a los resultados del control positivo, estos aceites pueden ser utilizados también como sustitutos de Ketoconazol, no solo en los casos patológicos causados

por estos hongos sino que también en la realización de ensayos microbiológicos ya que estos pueden ser utilizados como control positivo en lugar de Ketoconazol.

Los hongos como *Microsporum canis*, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum* siempre están creando sus propios mecanismos de defensa contra los antifúngicos empleados comúnmente, esto se observó con los resultados obtenidos con Ketoconazol 1% el cual se tomó como control positivo debido a que es de los principios activos que tiene mayor efectividad fungicida; sin embargo se puede decir que los resultados obtenidos con los aceites esenciales estos muestran una mayor sensibilidad para con los hongos de prueba, posiblemente se deba a que los hongos no identifican todavía a estas moléculas químicas de los componentes de cada aceite (Cuadro No. 4) y por lo tanto los resultados obtenidos son mejores.

Además se comprobó lo reportado en la bibliografía, referente a que estas plantas les atribuye la población propiedades antifúngicas.

VII. CONCLUSIONES

7.0 Conclusiones

1. Se identifico mediante Cromatografía de Capa Fina los componentes de cada uno de los aceites por comparación del Factor de Referencia (Rf) teóricos y prácticos obtenidos.
2. Los aceites esenciales de las hojas de Orégano, Romero y Eucalipto presentan actividad fungicida contra: *Microsporium canis*, *Trichophyton rubrum* y *Epidermophyton floccosum* in Vitro, esto se debe a los componentes químicos de los aceites esenciales.
3. La sensibilidad mostrada por los hongos fue muy variada frente a las diferentes concentraciones utilizadas de aceite esencial tal como lo muestra la Concentración Mínima Fungicida pero siempre se mantiene la proporcionalidad de que a mayor concentración mayor inhibición y viceversa.
4. En base al análisis realizado se concluye que el aceite de Orégano tiene mayor poder antimicótico especialmente para *Epidermophyton floccosum* y *Trichophyton rubrum* porque se necesito la tercera parte de la concentración del control positivo de Ketoconazol para matarlos en un 99.99 %.
5. *Microsporium canis* fue el Hongo que presentó un crecimiento más rápido, tiempo de vida mayor y por ende mayor resistencia para los aceites que *Epidermophyton floccosum* y *Trichophyton rubrum*.

6. Se comprobó que el Ketoconazol al 1% no logro inhibir totalmente a los hongos de prueba por lo cual se tuvo que realizar ensayos a 1.2% obteniéndose la inhibición total.
7. El aceite de Eucalipto a 12,000 ppm inhibió al *Microsporum canis* y *Trichophyton rubrum*, igual que el control positivo a la misma concentración no así para el *Epidermophyton floccosum* para el cual el aceite de Eucalipto a 10,000 ppm consiguió inhibirlo totalmente pero el control positivo no.
8. El aceite de Romero a 12,000 ppm mostró igual efectividad que el Ketoconazol a la misma concentración contra los hongos *Microsporum canis* y *Trichophyton rubrum* y con *Epidermophyton floccosum* fue más efectivo el aceite de Romero que con el control positivo.
9. La sensibilidad mostrada por los hongos de prueba ante los aceites deduce que estos no reconocen las moléculas químicas que se encuentran en los aceites.
10. Se comprobó la Actividad Antifungica reportada en las Monografías del Orégano, Eucalipto y Romero.

VIII. RECOMENDACIONES

8.0 Recomendaciones

1. Se recomienda promover el cultivo de estas plantas, generando así fuente de trabajo a personas que se dedican a la agroindustria.
2. Para realizar la prueba de susceptibilidad deben emplearse cepas puras por lo que se recomienda hacer los respectivos análisis microscópico y morfológico para confirmar la pureza de las mismas.
3. Promover el estudio de plantas de las cuales se tengan antecedentes de propiedades antifúngicas por ser una alternativa para la salud de la población.
4. De acuerdo a los resultados obtenidos, se recomienda posteriores investigaciones para desarrollar productos fitofarmacéuticos con estos aceites, a los cuales se le realicen la etapa clínica así como la estabilidad de ellos.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFIA

1. Bautista Murcia R.A. 2002. Evaluación Antimicrobiana de un Desinfectante a base de Orégano (*Lippia graveolens*) en la Sanitización del equipo de terapia respiratoria en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital Bloom, Trabajo de Graduación. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador. 74p.
2. Berrios Vides S.E. 2001. Determinación por el Método Mitscher de la Actividad antimicrobiana de quince aceites esenciales extraídos de la flora Salvadoreña. Trabajo de Graduación. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador p. 66
3. Cáceres, A .1966. "Plantas de uso medicinal en Guatemala".1 ed Guatemala. Editorial Universitaria. p.170-172, 287-289, 319-321.
4. DIGESTYC (Dirección General de Estadísticas y Censos). 2001. Principales resultados de la encuesta de Hogares de Propósitos Múltiples. El Salvador. p.1
5. Durst. H. D. y otros 1985 Química Orgánica Experimental. Barcelona. Editorial Reverté, S.A. p.51-55, 79,83, 89-90.
6. Elmer W. y Otros. 1992 Diagnostico Microbiológico. 3 ed. Argentina. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana. P. 657 – 715.
7. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador Manual de practica de Laboratorio de Química Orgánica.2002.

8. Germosen.ROBINEAU, L. Farmacopea Vegetal Caribeña. 1ª ed. Ediciones Emite Desormeaux, Santo Domingo. 1997.p 145
9. Gupta, M. P.1995. "270 Plantas Medicinales Iberoamericanas. Primera Edición. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED. Sta. Fe de Bogota. Colombia.
- 10.López, J.F. 2001. Boletín sobre Indicadores de Salud. Vol.3 San Salvador. El Salvador. p. 1-13.
- 11.Mena Z. M. 1997. Estudios sobre las propiedades antifungicas de Aceite de *Eucalyptus sp. en Candida albicans*. Trabajo de graduación. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador.
12. Toledo Mendoza R.A. Búsqueda de la Actividad Biológica mediante ensayos simples. Proyecto de Investigación. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador.1997.
- 13.Tortora, G. Introducción a la Microbiología. 3 ed. Zaragoza España.1993.
14. Underwood A.L. Química Analítica Cuantitativa 5 ed. México. Prentice-Hall Hispanoamericana S.A. p 665.
15. www.plantasmedicinales.org/farmacognosia/sep2002/aceites_esenciales.htm.
16. www.plantasmedicinales.orgTecnicas de Comprobación de la Actividad Terapeutica/farmacognosia.htm
17. www.reviberoammicol.com/2002

18. personal. Redestb. Es /martín/ pFito.htm

19. www.medy.com/lavanguardia/hongos.htm1/3

20. www,A:/Desarrollo.htm

21. www. Boletín Laboratorio de Enfermedades Infecciosas. Interpretación de los estudios de susceptibilidad antimicrobiana_htm

22. www. Validación del uso tradicional de plantas medicinales cultivadas en Cuba_archivos

ANEXOS

ANEXO No. 1

RECURSOS MATERIALES

- Especies Vegetales:

<i>Nombre Científico</i>	<i>Nombre Común</i>
--------------------------	---------------------

<i>Lippia graveolens</i>	Orégano
---------------------------------	---------

<i>Eucalyptus globulus</i>	Eucalipto
-----------------------------------	-----------

<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero
--------------------------------------	--------

- Microorganismos de prueba

Microsporum canis

Trichophyton rubrum

Epidermophyton floccosum

- Reactivos y Solventes

Acetato de Etilo

Ácido Sulfúrico 5% en Etanol

Agua Desmineralizada

Alcohol Etílico 95°

Dimetilsulfóxido (DMSO)

Hidróxido de Potasio 10%

Tolueno

Vainillina 1% en etanol

- Medio de Cultivo

Agar Sabouraud

- Material

Aros metálicos

Asas bacteriológicas

Baño de María

Cámaras cromatográficas

Cilindros de acero inoxidable de 8 mm de diámetro

Espátulas

Gradillas

Hisopos estériles

Laminas porta y cubre objeto

Mallas de asbesto

Mangueras

Papel glasin

Papel Kraft

Pinzas de sostén

Pinzas de extensión

Placas cromatográficas de sílica gel GF-254

Placas cromatográficas de sílica gel-60 F-254 prefabricadas (MERCK)

Soportes

Termómetros

Torundas de algodón

- Cristalería

Agitadores de vidrio

Ampollas de separación

Beakers de 10 mL, 600 mL

Balón volumétrico 10.0 mL, 100.0 mL

Cajas petri

Erlenmeyers de 250 mL y 1000 mL

Micro pipetas de punta delgada

Pipetas volumétricas 5.0 mL

Probetas de 100 mL, 25 mL, y 10 mL

- EQUIPO

Autoclave Webeco.com Schwartau tipo C

Balanza Analítica

Balanza Gran atarúa Ohaus, modelo 3201

Balanza Semianalítica

Cámara UVPinc Chromato – VUC c-70G UV Beijing System

Estufa Precisión, modelo 25 EG

Mechero Bunsen marca: Fisher

Microscopio Nikok YS2 –T, modelo 181040

Refrigeradora Cetron, modelo 2907

Stirring –Hot–plate Fisher, modelo 11-500–75H

ANEXO No.2



Figura No. 2 Fotografía de Cromatóplaca

ANEXO No. 3

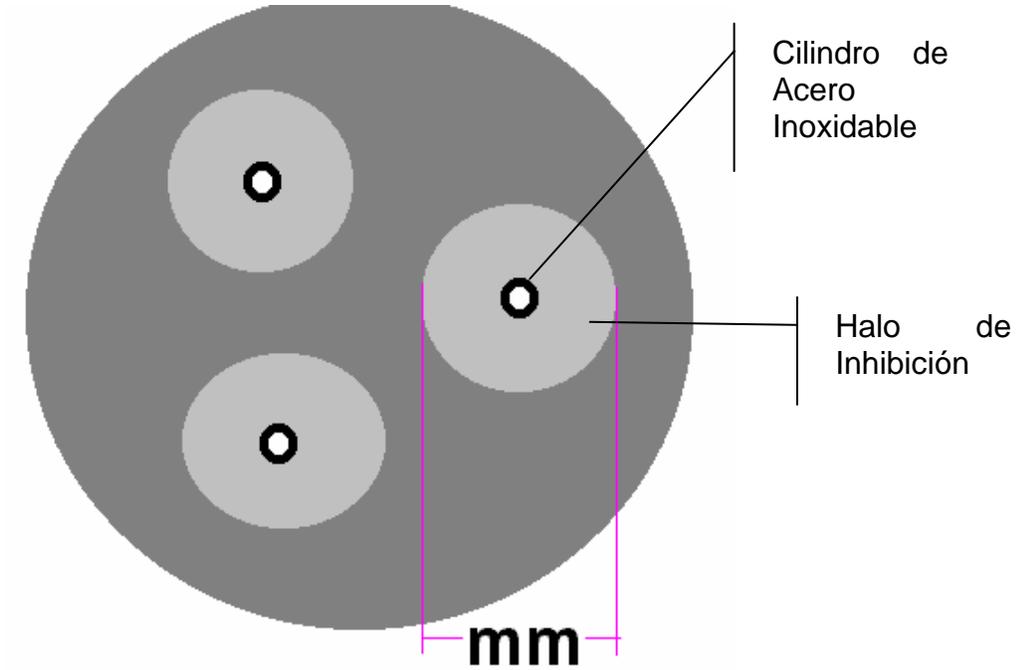


Figura No. 3 Medición de los halos de Inhibición

ANEXO No. 4



Figura No. 4 Medición de la Concentración Mínima Inhibitoria



Figura No. 5 Concentración Mínima Fungicida