

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**Evaluación de la actividad antimicótica del esmalte de uñas elaborado usando el aceite esencial del *Origanum vulgare L.* (Orégano) frente *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.**

**TESIS PRESENTADO POR:**

Br. JUAN CARLOS VELAZQUE CARRASCO

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

QUÍMICO FARMACÉUTICO

**ASESORA:**

Dra. CARLA DEL CARPIO JIMÉNEZ.

CUSCO – PERÚ

2019

# ÍNDICE

DEDICATORIA.....	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
ÍNDICE DE FLUJOGRAMAS .....	VI
ÍNDICE DE TABLAS.....	VII
ÍNDICE DE CUADROS .....	VIII
ÍNDICE DE ANEXOS .....	X
RESUMEN.....	XI
SUMMARY .....	XIII
ABREVIATURAS.....	XV
INTRODUCCIÓN.....	XVI
CAPÍTULO I.....	1
GENERALIDADES .....	1
<b>1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	1
1.1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA .....	1
1.1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	3
<b>1.2 OBJETIVOS</b> .....	3
1.2.1 OBJETIVO GENERAL.....	3
1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
<b>1.3 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA</b> .....	4
<b>1.4 HIPÓTESIS</b> .....	4
CAPÍTULO II.....	5
MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL .....	5
<b>2.1 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO</b> .....	5
2.1.1 ANTECEDENTES LOCALES.....	5
2.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES .....	7
2.1.3 ANTECEDENTES INTERNACIONALES .....	12
<b>2.2 BASE TEÓRICAS Y CIENTÍFICAS</b> .....	18
2.2.1 ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO.....	18
2.2.2 ACEITES ESENCIALES.....	19
2.2.3 DERMATOFITOS .....	25
2.2.4 AGENTE ETIOLÓGICO EN ESTUDIO .....	29
2.2.5 MEDIOS DE CULTIVO .....	31
2.2.6 CEPARIO .....	33
2.2.7 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA.....	34
2.2.8 DESCRIPCIÓN DEL ANTIMICÓTICO USADO COMO PATRÓN COMPARATIVO	36
2.2.9 PREFORMULACIÓN.....	37
2.2.10 FORMAS COSMÉTICAS .....	39
2.2.11 ESMALTE DE UÑAS.....	41

<b>CAPÍTULO III</b> .....	<b>46</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>46</b>
<b>3.1 MATERIALES</b> .....	<b>46</b>
3.1.1 MUESTRA VEGETAL .....	46
3.1.2 MUESTRA MICROBIOLÓGICA .....	46
3.1.3 PATRÓN COMPARATIVO ANTIMICÓTICO .....	46
3.1.4 MEDIO DE CULTIVO .....	46
<b>3.2 MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO</b> .....	<b>46</b>
3.2.1 MATERIALES DE CAMPO .....	46
3.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO .....	46
3.2.3 EQUIPOS DE LABORATORIO .....	47
3.2.4 INSUMOS PARA LA ELABORACIÓN DEL ESMALTE .....	47
3.2.5 OTROS MATERIALES .....	47
<b>3.3 DISEÑO METODOLÓGICO</b> .....	<b>48</b>
3.3.1 TIPO DE ESTUDIO .....	48
3.3.2 DISEÑO DE ESTUDIO .....	48
<b>3.4 IDENTIFICACIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES</b> .....	<b>50</b>
3.4.1 VARIABLES IMPLICADAS .....	50
3.4.2 VARIABLES NO IMPLICADAS .....	56
3.4.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN .....	57
<b>3.5 DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>62</b>
3.5.1 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA .....	62
3.5.2 SELECCIÓN DE LA MUESTRA .....	62
3.5.3 SECADO DE LA MUESTRA .....	62
3.5.4 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD .....	62
3.5.5 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL .....	63
3.5.6 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO .....	63
3.5.7 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD .....	64
3.5.8 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICOQUÍMICOS DEL ACEITE ESENCIAL .....	65
3.5.9 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROFOTOMETRÍA DE MASAS .....	66
<b>3.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano), SOBRE <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188, POR DIFUSIÓN EN DISCO</b> .....	<b>67</b>
3.6.1 ACTIVACIÓN DE CEPAS .....	67
3.6.2 PREPARACIÓN DEL INOCULO .....	67
3.6.3 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR .....	67
3.6.4 PREPARACIÓN DE LOS DISCOS DE SENSIBILIDAD .....	68
3.6.5 INOCULACIÓN AL MEDIO DE CULTIVO .....	70
3.6.6 INCUBACIÓN .....	72

3.6.7	LECTURA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN.....	72
3.6.8	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL ACEITE ESENCIAL.....	73
<b>3.7</b>	<b>PREFORMULACIÓN DEL ESMALTE DE UÑAS .....</b>	<b>74</b>
<b>3.8</b>	<b>FORMULACIÓN DEL ESMALTE DE UÑAS .....</b>	<b>75</b>
<b>3.9</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ESMALTE DE UÑAS .....</b>	<b>77</b>
3.9.1	EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICOS .....	77
3.9.2	MODELO DE PENETRACIÓN DE UÑA .....	78
3.9.3	TIEMPO DE SECADO.....	78
3.9.4	SUAVIDAD PARA FLUIR.....	78
3.9.5	DETERMINACIÓN DEL pH.....	78
3.9.6	ESTUDIO DE ESTABILIDAD .....	79
3.9.7	CONTROL MICROBIOLÓGICO.....	79
<b>3.10</b>	<b>TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS .....</b>	<b>79</b>
<b>3.11</b>	<b>TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN .....</b>	<b>79</b>
<b>CAPÍTULO IV.....</b>		<b>81</b>
<b>ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....</b>		<b>81</b>
<b>4.1</b>	<b>DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD <i>Origanum vulgare L.</i> (ORÉGANO).....</b>	<b>81</b>
<b>4.2</b>	<b>DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL DE <i>Origanum vulgare L.</i> (ORÉGANO) .....</b>	<b>82</b>
<b>4.3</b>	<b>CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Origanum vulgare L.</i>(orégano) .....</b>	<b>83</b>
<b>4.4</b>	<b>DETERMINACIÓN DE LA PRUEBA DE SOLUBILIDAD .....</b>	<b>84</b>
<b>4.5</b>	<b>ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL ACEITE ESENCIAL .....</b>	<b>85</b>
<b>4.6</b>	<b>DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROFOTOMETRÍA DE MASAS ..</b>	<b>87</b>
<b>4.7</b>	<b>DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL FRENTE A <i>Trichophyton rubrum ATCC 28188</i>.....</b>	<b>91</b>
4.7.1	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL ACEITE ESENCIAL.....	91
<b>4.8</b>	<b>FORMULACIONES DEL ESMALTE DE UÑAS ELABORADO A BASE DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO.....</b>	<b>97</b>
<b>4.9</b>	<b>EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DE LA FORMA COSMÉTICA ELABORADA.....</b>	<b>103</b>
<b>4.10</b>	<b>EVALUACIONES DEL ESMALTE DE UÑAS TERMINADA .....</b>	<b>108</b>
4.10.1	ESTUDIO DE ESTABILIDAD .....	117
4.10.2	CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL ESMALTE DE UÑAS.....	118
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>120</b>
<b>6</b>	<b>RECOMENDACIONES .....</b>	<b>122</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>123</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>130</b>

## DEDICATORIA

A Dios por brindarme todo lo necesario y por la fortaleza en los momentos más difíciles y poder llegar hasta aquí.

A mis padres MARCELINO y MARÍA por todo el inmenso amor que dan, porque ellos han dado razón a mi vida, por sus consejos, paciencia, su apoyo incondicional en la parte moral y económica, todo lo que hoy soy es gracias a ellos.

A mis hermanos RUTH, HEGEL, LAURE, MARY CARMEN y LINO, por el apoyo que siempre me brindaron día a día en el transcurso de cada año de mi carrera universitaria.

Juan Carlos Velazque Carrasco

## **AGRADECIMIENTOS**

A nuestra alma mater Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco y a la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica, por haberme acogido y cumplir con mi meta.

A la Dra. Carla del Carpio Jiménez asesora de tesis, por la confianza depositada y por ser guía en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

A los dictaminantes por todo el tiempo y esfuerzo invertido para que este trabajo mejore.

## ÍNDICE DE FLUJOGRAMAS

<b>FLUJOGRAMA 1.</b> Inoculación del <i>Trichophyton rubrum</i> al Medio de Cultivo...	71
<b>FLUJOGRAMA 2.</b> Formulación del Esmalte de Uñas .....	76
<b>FLUJOGRAMA 3.</b> Procedimiento de la Investigación.....	80

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>TABLA 1.</b> Composición de los Aceites Esenciales .....	20
<b>TABLA 2.</b> Operacionalización de Variables.....	58
<b>TABLA 3.</b> Variables Intervinientes .....	61
<b>TABLA 4.</b> Pruebas de Solubilidad.....	64
<b>TABLA 5.</b> Método de Difusión en Agar Sabouraud.....	68
<b>TABLA 6.</b> Concentración de los Discos del Aceite Esencial de <i>origanum vulgare</i> L. (orégano).....	69
<b>TABLA 7.</b> Interpretación de los Halos de Inhibición.....	72
<b>TABLA 8.</b> Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del Aceite Esencial .....	73
<b>TABLA 9.</b> Formulaciones del Esmalte con Quitosano al 1% y Diferentes Concentraciones de Aceite Esencial 70,75 y 80%.....	74
<b>TABLA 10.</b> Formulaciones del Esmalte de Quitosano al 2% y Diferentes Concentraciones del Aceite Esencial 70,75 y 80%.....	75

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 1.</b> Porcentaje de Humedad de <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano).....	81
<b>CUADRO 2.</b> Determinación del Porcentaje de Rendimiento de Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano) .....	82
<b>CUADRO 3.</b> Características Organolépticas del Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano). .....	83
<b>CUADRO 4.</b> Pruebas de Solubilidad del Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano).....	84
<b>CUADRO 5.</b> Propiedades Fisicoquímicos del Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano) .....	85
<b>CUADRO 6.</b> Composición Química Cuantitativa del Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano) .....	87
<b>CUADRO 7.</b> Lectura de los Halos de Inhibición Obtenidos del Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano) frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.....	91
<b>CUADRO 8.</b> Resultados Descriptivos de los Diámetros de los Halos de Inhibición de la Actividad Antimicótica del Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano) frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188. ....	93
<b>CUADRO 9.</b> Análisis de Varianza Anova del Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano) frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188. ....	95
<b>CUADRO 10.</b> Prueba de Tukey para Estudio Comparativo de la Actividad Antimicótica del Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano) frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188. ....	96
<b>CUADRO 11.</b> Formulación del Esmalte de Uñas con Quitosano al 1% y Diferentes Concentraciones de Aceite Esencial 70,75 y 80%. ....	97
<b>CUADRO 12.</b> Formulación del Esmalte de Uñas con Quitosano al 2% y Diferentes Concentraciones de Aceite Esencial 70,75 y 80%. ....	98
<b>CUADRO 13.</b> Formulación del Esmalte al 1% y 2% de Quitosano con Aceite Esencial al 70%.....	99
<b>CUADRO 14.</b> Características Organolépticos y Fisicoquímicos de las Formulaciones .....	101

<b>CUADRO 15.</b> Lectura de Halos de Inhibición Obtenidos del Esmalte de Uñas de Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano) frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.....	103
<b>CUADRO 16.</b> Resultados Descriptivos de los Diámetros de los Halos de Inhibición del Esmalte de Uñas de Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano) frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.....	104
<b>CUADRO 17.</b> Análisis de Varianza Anova del Esmalte de Uñas de Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano) frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 20188.....	105
<b>CUADRO 18.</b> Prueba de Tukey para el Estudio Comparativo de la Actividad Antimicótica del Esmalte de Uñas de Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano) frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.....	106
<b>CUADRO 19.</b> Características Organolépticas del Esmalte de Uñas.....	108
<b>CUADRO 20.</b> Tiempo de Secado del Esmalte de Uñas .....	108
<b>CUADRO 21.</b> Suavidad para Fluir del Esmalte de Uñas.....	109
<b>CUADRO 22.</b> Determinación del ph del Esmalte de Uñas.....	110
<b>CUADRO 23.</b> Modelo de Penetración de Uña.....	111
<b>CUADRO 24.</b> Resultados Descriptivos de los Diámetros de los Halos de Inhibición del Esmalte de Uñas de Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano) frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188. Modelo de Penetración de Uña.....	113
<b>CUADRO 25.</b> Analisis de Varianza Anova del Esmalte de Uñas de Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano) frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188. Modelo de Penetración de Uña.....	114
<b>CUADRO 26.</b> Prueba de Tukey para Estudio Comparativo del Actividad Antimicótica del Esmalte de Uñas de Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano) frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188. Modelo de Penetración de Uña.....	115
<b>CUADRO 27.</b> Estudio de Estabilidad Físicoquímicos y Organolépticos.....	117
<b>CUADRO 28.</b> Resultados del Control Microbiológico del Esmalte de Uñas....	118

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b> Identificación Botánica de <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano) Herbario Vargas - UNSAAC .....	130
<b>ANEXO 2.</b> Análisis Cromatográfico del Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano).....	131
<b>ANEXO 3.</b> Certificado de Análisis de <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.....	132
<b>ANEXO 4.</b> Cromatografía de Gases Acoplado a Espectrofotometría de Masas (CG - SM) de <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano).....	134
<b>ANEXO 5.</b> Cálculos de las Propiedades Físicoquímicas del Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano).....	137
<b>ANEXO 6.</b> Control Microbiológico del Esmalte de Uñas Antimicótico.....	138
<b>ANEXO 7.</b> Ficha de Recolección de Datos de la Especie Vegetal. ....	139
<b>ANEXO 8.</b> Porcentaje de Rendimiento del Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano) .....	140
<b>ANEXO 9.</b> Características Organolépticas del Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano) .....	140
<b>ANEXO 10.</b> Pruebas de Solubilidad del Aceite Esencial de <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano).....	141
<b>ANEXO 11.</b> Ficha de Recolección de Datos para Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	142
<b>ANEXO 12.</b> Ficha de Recolección del Estudio de Estabilidad Físicoquímicas y Organolépticas .....	142
<b>ANEXO 13.</b> Archivo Fotográfico.....	143

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar la actividad antimicótica *in-vitro* del esmalte de uñas usando el aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano" frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

El proceso se inició con la obtención del aceite esencial, mediante el método de destilación por arrastre de vapor, se determinó la composición química del aceite esencial por cromatografía de gases acoplado a espectro de masas, luego se realizó las pruebas de análisis organoléptico y fisicoquímico del aceite esencial. Se determinó la actividad antimicótica del aceite esencial de *Origanum vulgare* frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 y la Concentración Mínima Inhibitoria, por el método de difusión en discos.

Posteriormente se diseñó y elaboró el esmalte de uñas usando aceite esencial de *Origanum vulgare* L. y se evaluó la actividad antimicótica frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, mediante el método de difusión en discos. Se evaluaron las características fisicoquímicas, organolépticas, control microbiológico, tiempo de secado, suavidad para fluir y penetración de uñas del esmalte elaborado.

Los resultados que se obtuvieron fueron, rendimiento del aceite esencial 0.82%, los componentes mayoritarios del aceite esencial mediante (CG -SM) fueron: Terpineol, cis-a 18.46 %, Timol 12.38 %, Ácido antranílico, Éster 1,5-dimetil-1-vinil-4-hexenílico 9.38 % y Carvacrol 0.98%, los resultados de las características fisicoquímicas fueron: densidad 0.8454 g/mL, índice de refracción 1.3872, índice de saponificación 0.0102, índice de acidez 0.8265 g y rotación óptica – 0.542. Se determinó la actividad antimicótica del aceite esencial de orégano por difusión de discos, el resultado fue una CMI de 70% mostrando un halo de 9.75 mm frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

Luego se realizó seis formulaciones y se evaluó la actividad antimicótica, el esmalte de quitosano al 2% con aceite esencial al 70% fue el que presentó mayor halo de inhibición 12.5 mm, mejores características organolépticas, fisicoquímicas y estudios de estabilidad, penetración de uña que presento un

halo de 11.95 mm, suavidad de fluir 14 segundos, tiempo de secado 4 minutos, comparados con el esmalte comercial de ácido undecilénico.

En conclusión, el esmalte en base al aceite esencial de *Origanum vulgare L.* “orégano” con quitosano al 2% y aceite esencial al 70% fue el que mostró mayor actividad antimicótica frente a *Trichophyton rubrum*, por lo cual puede ser considerada como un complemento natural para el tratamiento de la Onicomicosis.

**Palabras clave:** Aceite esencial, actividad antimicótica, *Trichophyton rubrum*, esmalte de uñas, quitosano, biopolímero, pared celular, hongos.

## SUMMARY

The objective of this research work was to evaluate the in vitro antifungal activity of nail polish using the essential oil of *Origanum vulgare* L. "oregano" against *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

The process began with the obtaining of the essential oil, by means of the steam entrainment distillation method, the chemical composition of the essential oil was determined by gas chromatography coupled to mass spectrum, then the organoleptic and physicochemical analysis tests of the essential oil. The antifungal activity of the essential oil of *Origanum vulgare* against *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 and the Minimum Inhibitory Concentration was determined by the disk diffusion method.

Subsequently, the nail polish was designed and made using *Origanum vulgare* L. essential oil and the antifungal activity against *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 was evaluated, using the disc diffusion method. The physicochemical, organoleptic, microbiological control, drying time, smoothness to flow and nail penetration of the elaborated enamel were evaluated.

The results that were obtained were, yield of the essential oil 0.82%, the main components of the essential oil by (CG-SM) were: Terpineol, cis-a 18.46%, Thymol 12.38%, Anthranilic acid, 1,5-dimethyl ester- 1-vinyl-4-hexenyl 9.38% and Carvacrol 0.98%, the results of the physicochemical characteristics were: density 0.8454 g / mL, refractive index 1.3872, saponification index 0.0102, acid number 0.8265 g and optical rotation - 0.542. The antifungal activity of oregano essential oil was determined by diffusion of discs, the result was a MIC of 70% showing a halo of 9.75 mm against *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

Then six formulations were made and the antifungal activity was evaluated, the 2% chitosan enamel with 70% essential oil was the one with the greatest 12.5 mm inhibition halo, better organoleptic, physicochemical characteristics and stability studies, nail penetration that I present a halo of 11.95 mm, smooth flow 14 seconds, drying time 4 minutes, compared to the commercial enamel of undecylenic acid.

In conclusion, the enamel based on the essential oil of *Origanum vulgare* L. "oregano" with 2% chitosan and 70% essential oil was the one that showed the highest antifungal activity against *Trichophyton rubrum*, so it can be considered as a complement Natural for the treatment of Onychomycosis.

Keywords: Essential oil, antifungal activity, *Trichophyton rubrum*, nail polish, chitosan, biopolymer, cell wall, fungi.

## ABREVIATURAS

<b>ATCC</b>	: American Type Culture Collection
<b>ANOVA</b>	: Análisis de varianza.
<b>CMI</b>	: Concentración mínima inhibitoria
<b>FDA</b>	: Food and Drug Administration
<b>GC – MS</b>	: Cromatografía de gases acoplado a espectrofotometría de masas.
<b>G</b>	: Gramo
<b>µL</b>	: Microlitros
<b>mL</b>	: Mililitro
<b>mm</b>	: Milímetro
<b>m.s.n.m</b>	: Metros Sobre el Nivel del Mar
<b>NCCLS</b>	: National Committe for Clinical Laboratory Standars.
<b>DMSO</b>	: Dimetilsulfoxido
<b>UFC</b>	: Unidades Formadoras de Colonias
<b>ICH</b>	: International Conference on Harmonisation

## INTRODUCCIÓN

La dermatofitosis son un conjunto de micosis superficiales que afectan la piel y sus anexos (uñas y pelos), llamadas también tiñas de manera común, la incidencia es muy variable en todo el mundo, dependiendo mucho de las condiciones ambientales y de los agentes causales presentes en los ecosistemas, son causadas por un grupo de hongos parásitos de la queratina denominados dermatofitos y que, de manera excepcional, invaden tejidos profundos. Están comprendidos dentro de tres géneros: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*. (1)

Las infecciones por dermatofitos son usuales afectando cualquier edad, raza, sexo se consideran como las más frecuentes en enfermedades causadas por hongos, siendo uno de los primeros motivos de consulta dermatológica. (2)

Nuestro país presenta una gran riqueza y diversidad de plantas, que son utilizadas por sus bondades terapéuticas en el cuidado de la salud. Dentro de este contexto, los aceites esenciales que son productos naturales de gran valor e importancia económica, hoy en día son utilizadas como materias primas en áreas como: perfumería, aromaterapia, fitoterapia y nutrición. (3)

El *Origanum vulgare* L. "orégano" es cultivado en varias regiones del Perú. Las hojas y sumidades floridas se aplican en el campo farmacéutico, debido a propiedades como: antibacterianos, antifúngicos, antisépticas, diuréticas y antiespasmódicas. (4)

En los últimos años, hay un incremento en la incidencia de enfermedades fúngicas, debido al aumento considerable de pacientes inmunocomprometidos, quimioterapia, nutrición parenteral, cirugía de trasplante y el uso de agentes microbianos de amplio espectro, agregados a presencia de SIDA, quienes son altamente susceptibles a las infecciones oportunistas. Las infecciones fúngicas sistémicas y dérmicas son la causa de gran morbi – mortalidad en este tipo de pacientes, siendo las micosis superficiales un problema serio para niños de las naciones del tercer mundo como una consecuencia del deficiente cuidado sanitario. (5)

Se observa una continua y urgente necesidad de descubrir nuevos compuestos antimicóticos con diversas estructuras químicas y nuevos mecanismos de acción que sean aplicables a formas farmacéuticas para poder dar a conocer las bondades de la naturaleza y así tener productos de calidad a bajo costo y fácil acceso para toda la población.

Mediante el presente trabajo se intenta fundamentar el uso del aceite esencial del orégano contenido en un esmalte de uñas en el tratamiento de las dermatofitosis para ello se determina su composición química y su actividad antimicótica sobre *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, hongo responsable de dermatofitosis en personas y de esta manera contribuir a validar su uso.

# CAPÍTULO I

## GENERALIDADES

### 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 1.1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

La piel es el órgano principal de localización de las infecciones micóticas en el hombre, siendo estas infecciones clasificadas en superficiales y profundas, estos hongos se denominan “dermatofitos” y la patología que ellos producen se llama dermatofitosis, la incidencia de la dermatofitosis aumenta desde hace años en todo el mundo y muchas veces la adquisición de conocimientos imprescindibles sobre el tema se dificultan por la existencia de diversas tendencias para su estudio. Hay profesionales que plantean su estudio por el organismo causante trazando luego su espectro patógeno, al igual que se hace en el resto de enfermedades infecciosas, mas no tiene mucho éxito, pues cada especie tiende a producir su rasgo clínico propio, muy a menudo varias de ellas provocan erupciones idénticas, complicando aún más el estudio de esta patología. (6)

La incidencia y aislamiento de las distintas especies de dermatofitos varía mucho de unas regiones a otras del mundo siendo influidas por múltiples factores como: edad, raza y sexo, etc. (7)

Los dermatofitos destruyen y utilizan la queratina como fuente de nitrógeno, las formas profundas son poco frecuentes, casi exclusivas en personas inmunocomprometidas. El género *Trichophyton* puede invadir pelo, piel y uñas, mientras que *Microsporum* solo puede invadir pelo y piel; *Epidermophyton* afecta piel y uñas. En muestras clínicas el orden de frecuencia en forma decreciente es: *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum*, *T. tonsurans*, *M. canis* y *T. verrucosum*. (7)

En el Perú en un estudio realizado por, Béjar, Villanueva y Guevara en la ciudad de Lima los principales agentes infecciosos encontrados con mayor frecuencia fueron: *Trichophyton rubrum* (33,2%), *Cándida albicans* (15,3%), *Cándida no albicans* (11,8%), *Trichophyton mentagrophytes* (9,4%), *Malassezia spp* (9,1%) y las infecciones mixtas (casos en donde hubieron dos patógenos responsables) (7,2%). (8)

En la actualidad, el uso de especies vegetales constituye un sistema curativo de carácter universal. La utilización de diversas especies permite producir una serie de compuestos. Una planta puede ser considerada un sistema biodinámico capaz de modificar o alterar en forma transitoria o permanente las funciones fisiológicas de los organismos. (9)

Los aceites esenciales, son productos volátiles, aromáticos de amplia distribución en el reino vegetal, constituido por una mezcla de moléculas de una o varias sustancias derivadas, generalmente, del terpeno, que predominan por cantidad o intensidad de su perfume, que se pueden ubicar en las flores, las hojas, el fruto, el tallo o las raíces de la planta. (9)

El aceite esencial del *Origanum Vulgare L*, es un líquido de color amarillo de agradable aroma, que se puede encontrar en el interior de las flores y en las hojas y cuya composición química es bastante compleja: timol, carvacrol, pineno, cymol, selineno, dipenteno,  $\alpha$ -terpineno, Sin duda que el componente mayoritario es el timol (23,9%). Relevante es la importancia que se le ha encontrado en industria cosmética, industria farmacéutica por su actividad antibacteriana, antimicótica, antiviral, y diurética. (9)

Tomando en cuenta todo lo anterior mencionado buscamos alternativas terapéuticas eficaces que puedan brindar mejores opciones como las plantas medicinales por su fácil acceso y bajo costo, el propósito de esta investigación es evaluar la actividad antimicótica del esmalte de uñas elaborado usando el aceite esencial de *Origanum vulgare L*. (Orégano) frente a *Trichophyton rubrum ATCC 28188*.

## 1.1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Presentará actividad antimicótica el esmalte de uñas elaborado usando el aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (Orégano), frente a *Trichophyton rubrum ATCC 28188*?

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antimicótica in vitro del esmalte de uñas elaborado usando del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (Orégano) frente a *Trichophyton rubrum ATCC 28188*.

### 1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener el aceite esencial de las hojas *Origanum vulgare L.* (Orégano), mediante el método de arrastre por vapor y determinar el porcentaje de rendimiento.
2. Determinar la composición química del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (Orégano) utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrofotometría de masas.
3. Evaluar las características organolépticas y fisicoquímicas del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (Orégano)
4. Determinar la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (Orégano) por el método de difusión de discos frente a cepas de *Trichophyton rubrum ATCC 28188* y comparar con terbinafina como control positivo.
5. Determinar la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (Orégano) sobre *Trichophyton rubrum ATCC 28188*.
6. Diseñar y elaborar el esmalte de uñas usando aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (Orégano) y evaluar su actividad antimicótica frente a *Trichophyton rubrum ATCC 28188*.

7. Evaluar las características fisicoquímicas, organolépticas, control microbiológico, tiempo de secado, suavidad para fluir, penetración de uñas del esmalte elaborado.

### 1.3 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

**CONOCIMIENTO:** El aporte de este estudio demostrara científicamente la actividad antimicótica del esmalte de uñas elaborado usando el aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano) frente *Trichophyton rubrum ATCC 28188*, así poder contribuir en el conocimiento científico de plantas naturales y también revalorar el uso de plantas naturales en la región sur, que pueden ser utilizadas como un tratamiento alternativo eficaz contra la onicomicosis.

**APLICABILIDAD:** El presente estudio busca promover y revalorar el uso de nuestros recursos naturales que tenemos en la región que existe una gran biodiversidad, debido que en la actualidad se buscan terapias alternativas eficaces que pueden ser una mejor opción a las terapias actuales.

Se busca formular un esmalte de uñas como una alternativa terapéutica más económica contra la onicomicosis, con menos efectos adversos que conlleven al uso racional de este recurso que tenemos en la región.

**PRIORIDAD:** El presente estudio está enfocado en la búsqueda de antimicóticos naturales que sean usados como una alternativa eficaz, ya que el aumento de las infecciones por hongos y la resistencia a los antimicóticos en el mercado, no están siendo eficaces en la erradicación de la onicomicosis.

Se comparó la efectividad del esmalte de uñas elaborado en base al aceite esencial de orégano con otro esmalte comercial existente en el mercado, con la finalidad de evaluar si existían diferencias en cuanto a la efectividad sobre *Trichophyton rubrum*.

### 1.4 HIPÓTESIS

El esmalte de uñas elaborado usando el aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (Orégano) tiene actividad antimicótica in vitro frente a *Trichophyton rubrum ATCC 28188*.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL

#### 2.1 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

##### 2.1.1 ANTECEDENTES LOCALES

Ibarra Castillo B, Tunqui Neira GH, “**ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE AJENJO (*Artemisia Absinthium* L.) FRENTE A *Trichophyton rubrum* y *Cándida albicans*, DERMATOXICIDAD Y ELABORACIÓN DE UNA FORMA FARMACÉUTICA**” Carrera profesional de Farmacia y Bioquímica, Universidad de San Antonio Abad, Cusco – Perú. (2009)

El **objetivo** principal fue demostrar la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de Ajenjo (*Artemisia absinthium*. L) frente a *Trichophyton rubrum* y *Cándida albicans*, Dermatoxicidad y elaboración de una forma farmacéutica.

**Método**, el aceite esencial se obtuvo mediante destilación por arrastre de vapor de agua de las partes aéreas de la planta. Este fue sometido a análisis fitoquímico determinándose los siguientes compuestos: taninos, lactonas y esteroides. Mediante el método de agar en placa excavada se determinó la actividad antimicótica frente a cepas de. *Trichophyton rubrum* y *Candida albicans*.

**Resultado**, los diámetros de la prueba de agar en placa excavada para *Candida albicans*, fue de 22 mm a un volumen de 50 µL del aceite esencial y para. *Trichophyton rubrum* fue de 24 mm a un volumen de 25 µL del aceite esencial de *Artemisia absinthium*, se determinó la concentración mínima inhibitoria que fue de 75 mg/500 µL, la concentración estándar para el aceite que fue de 128.06mg/500 µL obteniéndose halos de inhibición de 18.36 y 19.24 mm para *Trichophyton rubrum* y *Candida albicans*.

**Conclusión**, se realizó la elaboración de la forma farmacéutica donde se probó diferentes tipos de bases, eligiéndose la base que presento mejor homogeneidad y mejores características, la base elegida fue la emulsión W/O, se formularon y prepararon cremas a diferentes concentraciones y la formulación elegida fue la crema al 2% del aceite esencial de *Artemisia absinthium*. (10).

Huancachoque Usca B, “**ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA IN VITRO DEL ZUMO DE LIMÓN FRENTE A *Trichophyton rubrum***”. Carrera profesional de Farmacia y Bioquímica, Universidad de San Antonio Abad, Cusco – Perú. (2007)

**Objetivo**, comprobar la actividad antimicótica in vitro del zumo de limón frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

**Método**, se procesó el fruto hasta la obtención del zumo, con este se realizó las pruebas de solubilidad para obtener el solvente adecuado, la determinación de metabolitos secundarios mediante el análisis fitoquímico cualitativo. La determinación de la actividad antimicótica se ejecutó por el método de difusión en agar excavado-placa (Método de Hufford)

**Resultados**, se demostró la presencia de flavonoides, alcaloides y quinonas en mayor proporción, en la estandarización de la concentración antimicótica se obtuvo que el zumo de limón, posee una concentración mínima de 200mg/500 uL con un halo de inhibición de 7.2 mm y una concentración máxima de 249.74mg/500uL con un halo de inhibición de 11.8 mm frente a cepas de *Trichophyton rubrum*.

**Conclusión**, de la comparación con el antimicótico patrón, el fluconazol resultó tener una mayor actividad antimicótica frente a cepas de *Trichophyton rubrum*.  
(11)

Lovon Salcedo M, Delgado Ramos S, “**ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA IN VITRO DE LOS ACEITES ESENCIALES de *Rosmarinus officinalis* L.(romero) Y *Cinnamomun zeylanicum* b.(canela) FRENTE A CEPAS DE *Cándida albicans*, EVALUADOS POR SEPARADO Y EN COMBINACIÓN**” Carrera profesional de Farmacia y Bioquímica, Universidad de San Antonio Abad, Cusco – Perú. (2011)

El **objetivo** del trabajo fue determinar la actividad de los aceites esenciales de romero y canela por separado y en combinación, frente a cepas de *Cándida albicans*

Se determinó la actividad antimicótica mediante el **método** de excavación en placa, se realizó la prueba piloto para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la posterior estandarización.

**Resultados**, el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) se observó una concentración óptima de 304mg/500uL con un halo de 24.08mm. con el aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* B. (canela) se observó una concentración optima de 200mg/500uL, con un halo de inhibición de 71.67mm.

**Conclusiones**, los aceites esenciales de *Cinnamomun zeylanicum* B. (canela) y *Rosmarinus officinalis* L. (romero) presentan actividad antimicótica in vitro frente a cultivos de *Candida Albicans*, y el aceite esencial de *Cinnamomun zeylanicum* B. (canela) presenta mayor actividad antimicótica que el fluconazol y que la actividad antimicótica de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) frente al mismo fármaco es menor. (12)

### 2.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES

Albado Plaus E, Grabiél Ataucusi S, “**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* (OREGANO)**” Revista Médica Herediana. Lima – Perú. (2001)

**Objetivo:** Determinar la actividad antimicrobiano en el aceite esencial (Carvacrol) del *Origanum vulgare*. **Material y métodos:** El aceite esencial se obtuvo por destilación por arrastre con vapor de agua, a partir de las hojas y flores desecadas de *O. vulgare*; se determinó la gravedad específica con un pinnómetro y el índice de refracción con refractómetro de Abbc; la composición química se evaluó mediante cromatografía de gas con detector de masa (GL-SM). La actividad antimicrobiana del aceite de *O. vulgare* se realizó por el método semicuantitativo de incorporación y de disco difusión en agar. **Resultados:** La densidad específica del producto resultó 0.9234 a 20°C y el índice de refracción 1.4774; el cromatograma mostró un contenido de 9% de carvacrol, 12.19%, Terpeneol y 6.86% de P-cimeno y la presencia de otros compuestos relacionados metabólicamente con los tres antes citados. Las bacterias gram-negativas: *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella tiphymurium*, *Salmonella cholerae suis* y *Vibrio cholerae* y las bacterias gram-positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*, mostraron diferentes grados de sensibilidad. De los microorganismos evaluados solo *pseudomonas aeruginosa* mostró resistencia. **Conclusión:** El aceite esencial posee actividad microbiana contra todas las bacterias evaluadas, excepto antes para *P. aeruginosa*. (4)

Maravi Inga GG, “**EFFECTO ANTIBACTERIANO Y ANTIFÚNGICO DEL ACEITE ESENCIAL DE: Menta piperita (MENTA), *Origanum vulgare* (ORÉGANO) y *Cymbopogon citratus* (HIERBA LUISA) SOBRE *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Cándida albicans* ATCC 90028**”. Escuela Académica Profesional de Odontología, Universidad Privado Norbert Wiener, Lima- Perú (2012)

El **objetivo** de la presente investigación fue determinar el efecto antibacteriano y antifúngico in vitro del aceite esencial de: *Menta piperita* (Menta), *Origanum vulgare* (Orégano) y *Cymbopogon citratus* (Hierba Luisa)

**Método**, difusión en agar con disco, sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Lactobacillus acidophilus* ATCC 10746 y *Cándida albicans* ATCC 90028”

**Resultados**, para realizar el análisis microbiológico, se utilizó el aceite esencial de Menta al 50 y 100%, Orégano al 50 y 100% y Hierba Luisa al 50% y 90%.

Estos aceites esenciales, fueron comparados con Nistatina como control positivo (para los hongos) y Gluconato de Clorhexidina al 0.12% (para las bacterias).

**Conclusión**, el aceite esencial de Orégano y Hierba Luisa tienen mayor efectividad antibacteriana y antifúngica que los controles positivos: Clorhexidina al 0.12% y Nistatina, a excepción de la Menta piperita (Menta) al 50% que su acción fue menor que los controles positivos. (13)

Quintanilla Bocangel JJ, “**EFFECTO ANTIFUNGICO IN VITRO DEL CARVACROL (ACEITE DE ORÉGANO) SOBRE *Candida albicans***”. Escuela Académica Profesional de Odontología, Universidad Privado Norbert Wiener, Lima- Perú (2016)

**Objetivo**, determinar el efecto antifungico in vitro del extracto de aceite de orégano, carvacrol, sobre cepas de *Candida albicans*. Se preparó el extracto de aceite de orégano, carvacrol, al 0,1 % in vitro, empleando el **método** de Kirby Bauer (difusión en disco) y la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Para la evaluación, se expuso a *Candida albicans* a cuatro concentraciones del extracto de aceite de orégano; asimismo, se consideró un grupo control con fluconazol y otro con inóculo microbiano, para luego realizar diez repeticiones en cada caso. **Resultados**, se determinó que existe diferencia

estadísticamente significativa entre el efecto antifúngico de las diferentes concentraciones de extracto de aceite de orégano sobre el crecimiento de *Candida albicans* ( $P < 0.05$ ), y fue sensible a las cuatro concentraciones al comparar los halos de inhibición según la escala de Durafour. La CMI para la acción antifúngica fue de 100 %, (1000 mg/ml). **Conclusión**, el carvacrol, como extracto de aceite de orégano, sí tiene efecto inhibitorio in vitro contra *Candida albicans*. (14)

Lachos Miguel EV, Laurente Pachamanco KG, “**EFFECTO ANTIMICOTICO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* FRENTE A CEPAS DE *Trichophyton rubrum***”. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo – Perú (2018).

El **objetivo** del trabajo de investigación fue determinar el efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de orégano, frente a cepas de *Trichophyton rubrum*. El aceite esencial de obtuvo mediante el **método** por destilación por arrastre de vapor al cual se le determino características organolépticas y fisicoquímicas. **Resultados**, la concentración mínima inhibitoria fue de 0.25% y la concentración mínima fungicida de 0.125% se le atribuye el efecto antimicótico al timol y carvacrol. **Conclusión**, que el aceite esencial de *Origanum vulgare* presenta actividad antimicótica frente a *Trichophyton rubrum*. (15)

Villavicencio Gastelu JE, “**EFFECTO ANTIMICÓTICO IN VITRO DEL ORÉGANO (*Origanum vulgare*) EN CEPAS DE *Candida albicans* PROCEDENTES DE LA ESTOMATITIS SUB PROTESICA**”. Facultad de Odontología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima- Perú. (2017)

**Objetivo:** el presente estudio tuvo como objetivo evaluar el efecto antimicótico in vitro del aceite esencial del orégano (*Origanum vulgare*) en cepas de *Candida albicans* procedentes de la Estomatitis Sub Protésica (ESP); como alternativo farmacológico para la prevención y tratamiento de la ESP. **Metodología:** Se efectuó la recolección de cuatro variedades de orégano: *Origanum x intercedens* (chinito), *Origanum x majoricum* (nigra), *Origanum vulgare L* (Jauja) y *Origanum vulgare L* (Tacna). Se obtuvo los aceites esenciales mediante proceso de destilación por arrastre con vapor de agua. La composición química se determinó cuantitativamente por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas

(CG/EM). Los principales componentes químicos encontrados fueron: sabineno (3,67%); p-cimeno (3,52%);  $\alpha$ -terpineno (4,90%);  $\gamma$ -terpineno (9,04%); cis- $\beta$ -terpineol (3,62%); 4-terpineol (11,56%); 1-metoxi-4-metil-2-(1-metiletil)-benceno (4,06%); acetato de linalol 8,58; timol (14,71%); carvacrol (0,88%);  $\gamma$ -elemeno (4,76%) y elixeno (3,58%). Se comprobó *in vitro* el efecto antimicótico de los aceites esenciales a través de pruebas de sensibilidad con el método de difusión en cultivo de agar frente a *C. albicans* y se comparó con Miconazol (gel oral 20mg/g) y Clorhexidina (colutorio 0,12%). **Resultados:** Los aceites esenciales de orégano de las cuatro especies estudiadas mostraron efecto antimicótico, en diferentes concentraciones, y mostraron diferencias significativas frente al Miconazol y Clorhexidina. **Conclusión:** que el aceite esencial de *Origanum vulgare* puede ser una alternativa farmacológica para el tratamiento de la Estomatitis Sub Protésica. (16)

Alva Pretell JA, “**EFICACIA ANTIMICÓTICA DEL EXTRACTO ACUOSO DE *Origanum vulgare* “ORÉGANO” SOBRE *Cándida albicans* ATCC 10231, COMPARADO CON METRONIDAZOL, ESTUDIO IN VITRO.**”. Escuela Profesional de Medicina, Universidad Cesar Vallejo. Trujillo – Perú. (2018)

Se realizó un estudio experimental *in vitro* con el **objetivo** de evaluar la efectividad antimicótica del extracto acuoso de *Origanum vulgare* “orégano” sobre *Cándida albicans* ATCC 10231, **Metodología:** Se realizaron cuatro diluciones (100%, 75%, 50% y 25%) con control neutro con DMSO; se realizaron 19 repeticiones por cada grupo de estudio. **Resultados:** Se obtuvo que el Extracto de *Origanum vulgare*, mostró halos de inhibición a partir de la dilución al 75% 11.10 mm (DS: 5.68 $\pm$ 0.180. IC95% (10.60 -11.51)) con un rango de 10 a 12 mm, mayor fue el halo de inhibición a la concentración del 100% con 14.50 mm (DS: 1.080 $\pm$  0.342 IC95% (13.73-15.27)) con un rango de 13 a 16 mm, considerándose resistente según el CLSI; el grupo control de metronidazol, tuvo un halo de inhibición de 25.90 mm (DS: 8.76  $\pm$ 2.77 IC95% (25.27- 26.53)) con un rango de 25 a 27 mm. **Conclusión:** El análisis estadístico ANOVA fue altamente significativo (0.000), al igual que la prueba de Tukey demostró que los grupos evaluados fueron homogéneos y el grupo con mayor halo de inhibición fue para metronidazol, seguido del extracto acuoso al 100% de la planta en estudio evidenciándose que a mayor concentración el halo de inhibición

aumentaba. Se concluye que el extracto etanólico de *Origanum vulgare* “orégano” sí tiene efecto antimicótico sobre *Cándida albicans* ATCC 10231, pero menor que metronidazol según el CLSI. Pudiendo ser este producto utilizado como un tratamiento alternativo en las infecciones vaginales principalmente las candidiasis vaginales. (17)

Ayala Jara CI, Castillo Saavedra EF, Villanueva Sedano LC, Medina Espinoza. TM, “**DESARROLLO Y EFECTO ANTIMICÓTICO IN VITRO DE UNA CREMA DE *Tropaeolum majus* L. (*tropaeolaceae*) SOBRE *Trichophyton rubrum* (*Arthrodermataceae*)**” Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo – Perú. (2018)

**Objetivo:** El estudio estuvo orientado en desarrollar una crema a base de flores de *Tropaeolum majus* L. (*Tropaeolaceae*) y evaluar su efecto in vitro en cepas de *Trichophyton rubrum* (*Arthrodermataceae*). **Metodología:** Se obtuvo el extracto estandarizado de las flores, luego se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima fungicida (CMF); se diseñó y elaboró la formulación de la crema y se evaluó su efecto antifúngico in vitro, usando como patrón la crema de isoconazol al 1%. **Resultados:** Para determinar diferencia significativa en ambas cremas, se compararon los halos de inhibición obtenidos mediante la prueba “t” de Student con un nivel de significancia estadística de 0,05. La CMI fue de 1,8 g/mL y la CMF fue de 1,9 g/mL; en el estudio de preformulación de excipientes con el extracto estandarizado de *Tropaeolum majus* no ocurrieron cambios. **Conclusión:** Los controles de calidad organolépticos, fisicoquímicos y microbiológicos de la crema antimicótica coincidieron con las especificaciones establecidas. Se logró desarrollar la crema antimicótica con calidad farmacéutica; la evaluación del efecto in vitro en cepas de *Trichophyton rubrum*, con halos de inhibición semejantes de 33,15 + 3,26 mm, demuestran que tiene efecto antimicótico similar a la crema patrón de isoconazol al 1%. (18)

Martell Rosales AR, Rodríguez Del Águila JM, “**CALIDAD DE ESMALTES PARA UÑAS QUE SE COMERCIALIZAN EN EL EMPORIO COMERCIAL ALBARRACIN TRUJILLO, 2015**” Facultad de Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo – Perú. (2015)

**Objetivo:** El presente estudio se realizó la evaluación “CALIDAD DE ESMALTES PARA UÑAS QUE SE COMERCIALIZAN EN EL EMPORIO COMERCIAL ALBARRACIN TRUJILLO, 2015” **Metodología:** Se trabajó con 03 muestras de cada marca de esmaltes para uñas de diferentes lotes; Vogue Fantasic, P y W, NIGHTS, RODER, Briller, Belles, TLM, Gaudy, se determinó la calidad organoléptica: olor color, aspecto, así como la calidad fisicoquímica: densidad, evaporación, tiempo de secado, retracción o encogimiento y plasticidad. Dando como resultado que los esmalte los cumple con la calidad organoléptica. **Resultados:** Los fisicoquímicos indican que las marcas BelleS de color amarillo y RODER de color rojo que se encuentran diferente al parámetro de densidad establecidos según el Manual de cosméticos de FDA que establece una fluctuación ente 1,10g/ml a 1,35 g/ml. **Conclusión:** La marca BelleS de color blanco y amarillo así como Nights de color rojo no se encuentran dentro del rango establecido por la FDA, con respecto al tiempo de secado cuyos límites establecido varían de 4 min hasta 8 min. También se reporta la plasticidad de los esmaltes, las marcas que muestran dicho parámetro fisicoquímico alterado son BelleS, RODER, Sasha y Nighths. Se observó una alteración de la retracción o encogimiento en las marcas BelleS, RODER, Vogue y Nights. Como última prueba en el tiempo de evaporación, el parámetro que varía de 1 min con 30 seg hasta 5 min, todas las muestras analizadas se encuentran dentro del rango establecido. (19)

### 2.1.3 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

Arcilla Lozano CC, Loarca Piña G, Lecona Uribe S, “**EL ORÉGANO: PROPIEDADES, COMPOSICIÓN Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE SUS COMPONENTES**” Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. México. (2012)

**Objetivo:** El orégano comprende varias especies de plantas que son utilizadas con fines culinarios, siendo las más comunes el *Origanum vulgare*, nativo de Europa, y el *Lippia graveolens*, originario de México. **Metodología:** Entre las especies de *Origanum* se encuentran como componentes principales el limoneno, el  $\beta$ -cariofileno, el r -cimeno, el canfor, el linalol, el a -pineno, el carvacrol y el timol. En el género *Lippia* pueden encontrarse estos mismos

compuestos. Su contenido depende de la especie, el clima, la altitud, la época de recolección y el estado de crecimiento. **Resultados:** Algunas propiedades de los extractos del orégano han sido estudiadas debido al creciente interés por sustituir los aditivos sintéticos en los alimentos. El orégano tiene una buena capacidad antioxidante y antimicrobiana contra microorganismos patógenos como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, entre otros. **Conclusión:** Estas características son muy importantes para la industria alimentaria ya que pueden favorecer la inocuidad y estabilidad de los alimentos como también protegerlos contra alteraciones lipídicas. Existen además algunos informes sobre el efecto antimutagénico y anticarcinogénico del orégano sugiriendo que representan una alternativa potencial para el tratamiento y/o prevención de trastornos crónicos como el cáncer. (20)

Hernández Domínguez L. Abraham Juárez M. Martínez Jaime O. “**ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO COMO POTENCIAL NUTRACÉUTICO**”.

Universidad de Guanajuato. México. (2016)

**Objetivo:** El aceite de orégano ha sido investigado científicamente y ha resultado ser uno de los más potentes y efectivos antibióticos conocidos por el hombre. El ingrediente activo: carvacrol, ha resultado ser uno de los antisépticos más potentes. En este proyecto se utilizó orégano proveniente de tres regiones diferentes del estado de Guanajuato: A) Valle de Santiago, B) Irapuato y C) Ciudad de Guanajuato, con el objetivo de determinar y determinar si existen diferencias a nivel fisicoquímico y en su potencial nutracéutico. La variedad seleccionada fue orégano mexicano (*Lippia graveolens*). Para obtener el extracto de orégano de las tres muestras se evaluaron tres **Métodos:** 1) Con solventes orgánicos, 2) Por arrastre de vapor y 3) Con solventes orgánicos (etanol). Los **Resultados** nos indican que el mejor método de extracción fue el 2, ya que el extracto de orégano obtenido conservo mejor las características fisicoquímicas y algunos nutraceúticos. En cuanto al origen de la muestra de orégano, destaca el que proviene de la ciudad de Guanajuato, seguido el de Irapuato y de valle de Santiago, el cual se vio más afectado en sus propiedades. (21).

Tapeiro Cuellar J. Montaña Escobar Y, García Mendoza M, Marín Reina C. Escobar Salcedo J. **“EXTRACCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE ESENCIAL DE OREGANO (*Origanum vulgare*) DEL MUNICIPIO DE VIJES VALLE DEL CAUCA”**. Universidad de Caldas. Manizales – Caldas, Colombia. (2016)

El **objetivo** de esta investigación fue extraer mediante hidrodestilación asistida por radiación con microondas (MWHD) aceite esencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) del municipio de Vijes Valle del Cauca, caracterizar sus propiedades fisicoquímicas, valorar su composición química por cromatografía de gases espectrómetro de masas (GC-MS) y evaluar su actividad antioxidante frente a los métodos DPPH+, ABTS\*+ y ORAC.

**Método:** Para la extracción del aceite esencial se usó muestras vegetales de orégano procedentes del municipio de Vijes del Valle del cauca; situado sobre el valle del río Cauca, con una altitud de 987 m.s.n.m y una temperatura promedio de 25°C y humedad relativa del 75%.

**Resultados:** El rendimiento estuvo entre  $0,182 \pm 0,00067$  y  $0,229 \pm 0,00078$  para 300 gramos de muestra, con un índice de refracción a 20°C de  $1,5030 \pm 0,0012$ . La solubilidad al etanol (70%) es positiva, con una rotación óptica de  $-0,200 \pm 0,0001$  y una densidad a 20°C de  $0,9641 \pm 0,00034$ .

**Conclusiones:** Los análisis cromatográficos exponen al carvacrol como componente principal (65,06%) y timol (22,79%) e hidrocarburos monoterpenicos como,  $\beta$ -pineno (1,42%),  $\alpha$ -terpineno (9,85%) y Cariofileno (7,58%) entre otros. La capacidad antioxidante del AE de orégano presentó buena actividad antioxidante para cada uno de los métodos analizados; evidenciando que es un producto a tener en cuenta para la incorporación en productos agroindustriales y en películas y recubrimientos comestibles para conservar alimentos. (22)

Solís Campoverde PN, “**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE ORÉGANO (*Origanum vulgare L.*) Y TOMILLO (*Thymus vulgaris L.*) como potenciales bioconservadores en carne de pollo**”. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba – Ecuador. (2012)

El **objetivo** de la presente investigación fue evaluar el efecto antibacteriano de los aceites esenciales de orégano y tomillo como conservantes naturales, con el propósito de reducir la carga microbiana durante el almacenamiento de la pechuga de pollo. **Métodos**, los ensayos utilizados fueron inductivo-deductivos y científico-experimentales. Los microorganismos de ensayo fueron *Salmonella spp* y microorganismos proteolíticos; se aplicaron pruebas de Screening, Concentración Mínima Bactericida “in vivo” y tiempo de muerte “in vitro” e “in situ”. **Resultados**, se determinó actividad antimicrobiana con concentraciones al 100 % sin diluir. La concentración mínima bactericida frente a *Salmonella spp* fue de 1.56%. In vitro, el tratamiento más efectivo frente *Salmonella spp*. Fue obtenido con el aceite esencial de tomillo en concentración total mientras que el aceite esencial de orégano presentó una inhibición mínima. **Conclusión**, en el tiempo de muerte se determinó la eficacia de la actividad antibacteriana del aceite de tomillo ya que presentó una reducción significativa de *Salmonella spp*. Los ensayos “in situ” mostraron que el aceite esencial de tomillo en el almacenamiento de la pechuga de pollo a temperatura de refrigeración (4°C) hasta 48 horas, fue el tratamiento más efectivo para reducir la contaminación bacteriana y la pérdida de las características de calidad de la carne, logrando dar un producto de mejor calidad y libre de contaminación. Por lo que se recomienda el uso de los aceites esenciales en carne de pollo como una alternativa natural a los antibacterianos sintéticos para controlar la contaminación de la misma. (23)

Valverde Quinaluisa PY, “**EFFECTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO DE LAS PROVINCIAS DE CHIMBORAZO Y SANTA ELENA AL 100% DE CONCENTRACIÓN SOBRE *Candida albicans***”. Facultad de Odontología, Universidad Central del Ecuador, Quito – Ecuador. (2017)

El **objetivo** del trabajo fue tratar patologías orales producidas por *Cándida albicans* mediante sustancias alternativas a base de plantas medicinales, se planteó identificar la efectividad antimicótica de los aceites esenciales de Orégano de las provincias de Chimborazo y Santa Elena al 100% de concentración sobre *Candida albicans*, cepas que han sido inoculadas en láminas de acrílico, para lo cual se tomó como medicamento control a Nistatina.

**Metodología:** una vez seleccionado las plantas de orégano, se obtuvo el aceite esencial de las mismas, al 100% de concentración a través de la técnica de arrastre de vapor de agua. La activación de la levadura se realizó con 0,5 en la escala Mc Farland, posteriormente fueron colocadas en vasos estériles, donde se incorporó 50mL de agua más 0,3 y 0.5mL de aceite esencial de Orégano.

**Resultado,** ambos aceites esenciales de orégano mostraron diferencias significativas sobre las levaduras en comparación con nistatina. **Conclusión,** el aceite esencial obtenido de los oréganos provenientes de las provincias de Chimborazo y Santa Elena reveló valores más altos de efectividad antimicótica frente a *Candida albicans*. (24)

Salamanca García M, Sánchez Bermúdez M,“**EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA OLEORRESINA DEL ORÉGANO (*Origanum vulgare*)**”. Facultad de Tecnología Química. Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira- Colombia. (2009)

El **objetivo** de este estudio fue realizar la extracción, análisis físico-químicos y microbiológicos a la oleorresina del Orégano. Las extracciones realizadas fueron obtenidas a partir del orégano previamente lavado y deshidratado a 40°C por dos días. El **método** Soxhlet utilizando como solvente etanol al 75% presentó un mayor porcentaje de rendimiento y buenas características organolépticas en la extracción. Se realizaron pruebas de cenizas, densidad, índice de refracción, índice de acidez, análisis GC-MS, análisis microbiológicos, actividad antioxidante y análisis sensorial; todas las pruebas fueron realizadas por triplicado. Los **resultados** obtenidos para los análisis microbiológicos fueron satisfactorios presentando negativo para coliformes totales, coliformes fecales E-coli y mesófilos aerobios viables; teniendo en cuenta que este estudio preliminar puede dar paso a otros estudios para la comercialización de esta oleorresina como un producto comestible según la norma ISO 22000. **Conclusión:** el

extracto de orégano tiene poca actividad antioxidante ya que el extracto de orégano presentó un IC50 a una concentración de 35200 ppm, lo cual se puede concluir que el extracto etanólico no presenta compuestos con potencial antioxidante, y además el control positivo (ácido ascórbico) presenta un IC50 de 415 ppm. Por GC-MS se obtuvieron los siguientes compuestos en mayor porcentaje: Timol (96.351%), 2,5-ciclohexadieno1,4-diona, 2-metil-5-(1-metiletil) (1.596%). La oleorresina reporto: 0.266 % de cenizas, densidad de 0.988 g/cm<sup>3</sup>, Índice de refracción 1.345 ND 24 y 49,00% de grados Brix, Humedad 13.635% m/m, Índice de Acidez 5.028 %m/m ácido oleico. (25)

Traynor MJ, Turner RB, Evans CR, Jones SA. **“EFECTO DE UN POTENCIADOR NOVEDOSO EN LA PERMEACIÓN UNGUEAL DE LOS AGENTES ANTIFÚNGICOS”** (2010)

**Objetivo:** Evaluar el poder de penetración del miconazol a diferente concentración y del ciclopirox, **Metodología.** Se realizaron discos de pezuñas estériles de 0,5-1,0 mm de grosor, similares al grosor de las uñas humanas, Se colocaron en la superficie de las placas de agar sembradas con un inóculo de *Trichophyton* estandarizados a una concentración de 2-5 x 10 conidios /l. Trescientos microlitros de nitrato de miconazol comercializado 2% p/p y 8% p/p.

**Resultados,** Luego se aplicaron p / p de formulación tópica de ciclopirox a la superficie del disco de pezuña para. Las placas se incubaron durante 4 días y las zonas de inhibición (ZOI) fueron posteriormente medido. Como se esperaba, los controles no tratados no mostraron halos de inhibición, mientras que el 50% de nitrato de miconazol 2% p / p, luego de 60 minutos de exposición, mostró significativamente mayor halo de inhibición en comparación con 8% p / p de laca de ciclopirox, (26.5 ± 9.7 y 2.8 ± 3.4 mm, respectivamente) (P ≤ 0.05) (26)

## **2.2 BASE TEÓRICAS Y CIENTÍFICAS**

### **2.2.1 ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA ESPECIE VEGETAL EN ESTUDIO**

#### **2.2.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA**

**REINO:** PLANTAE

**DIVISIÓN:** MAGNOLIOPHYTA

**CLASE:** MAGNOLIOPSIDA

**ORDEN:** LAMIALES

**FAMILIA:** LAMIACEAE

**GENERO:** ORIGANUM

**ESPECIE:** *VULGARE* (27)

**2.2.1.2 NOMBRE CIENTÍFICO:** *Origanum vulgare* L.

**2.2.1.3 NOMBRES COMUNES:** Orégano, mejorana silvestre.

**FUENTE:** HERBARIO VARGAS (CUZ) (ver Anexo 1)

#### **2.2.1.4 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA ESPECIE**

Planta herbácea, perenne, rizomatosa. Los tallos son erectos, de unos 90 cm o más, generalmente ramificados en la parte superior, Las hojas, de 10-40(-50) x 4- 25 mm, son ovaladas, enteras o ligeramente crenacio-serradas, glabras o pilosas, punteado glandulosas y pecioladas. Flores dispuestas en espiga de verticilastros de 5-30 mm, ovoide, oblonga o prismática, formando en conjunto, una inflorescencia corimbosa densa. Brácteas florales de 4-5 mm, diferentes a las hojas, casi dos veces más largas que el cáliz, ovaladas u oblongas, no apiculadas, pilosas o glabras, sin glándulas o ligeramente punteado-glandulosas, herbáceas, generalmente de color púrpura violáceo o grisáceo. El cáliz, punteado de glándulas amarillas, con 5 dientes iguales, es piloso o glabro. La corola de 4-7 mm, es bilabiada, con el labio superior entero o escotado y el inferior trilobulado, blanco o rojo-púrpura. Androceo formado por 4 estambres fértiles, con los filamentos divergentes, didínamos (28).

### **2.2.1.5 ANTECEDENTES ETNOBOTÁNICOS Y ETNOFARMACOLÓGICOS**

Según antecedentes etnobotánicos y etnofarmacológicos del orégano:

- Es utilizado para trastornos digestivos por ejemplo dispepsia de origen nervioso, flatulencia, espasmos o cólicos de los órganos digestivos.
- Afecciones respiratorias que cursan son tos seca o irritativa, como la laringitis. El orégano tiene también acción expectorante y antitusígena, tanto como en uso interno y como externo es cicatrizante, analgésico, antiséptico y antifúngico.
- Dolores musculares, tortícolis y lumbago. (29)

### **2.2.1.6 FITOQUÍMICA, FARMACOLOGÍA Y TOXICOLOGÍA**

Contiene aceite esencial, cuya composición puede variar según su procedencia. Generalmente contiene fenoles (timol 18.80% y carvacrol 2,24%) hidrocarburos monoterpénicos (limoneno 0,85%, a-pineno 0.36 %, b-pineno 0.18%, m-cimeno 3.27%) sesquiterpenos (b-cariofileno 1.87%) y linalool 2.25%, L-4-terpinoel 26.56%,  $\gamma$ -terpineno 11,77%, careno 6.53%. entre otros presentes en menor proporción. (28)

## **2.2.2 ACEITES ESENCIALES**

### **2.2.2.1 DEFINICIÓN**

Los aceites esenciales son mezclas de componentes volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas; en su composición química entran hidrocarburos del grupo de los terpenos, junto con compuestos oxigenados de bajo peso molecular (alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos), que son los que les dan a los aceites esenciales el aroma que los caracteriza.

Los metabolitos secundarios volátiles tienen una distribución restringida en la naturaleza, la cual se limita a ciertas plantas llamadas “aromáticas”, en algunos casos, a solo algunas especies o subespecies, por lo que son consideradas como una manifestación individual del organismo que las contiene y se les atribuye una gran variedad de funciones específicas, por lo que éstos deben tener algún significado biológico, ya que son biosintetizados y biodegradados. (30)

### 2.2.2.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES

La composición química de los aceites esenciales es muy compleja, los metabolitos secundarios volátiles se pueden clasificar en base a los grupos funcionales que contienen sus moléculas. (31)

**TABLA 1. COMPOSICIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES**

GRUPO FUNCIONAL	NATURALEZA QUÍMICA	EJEMPLO
HIDROCARBUROS	Terpenicos Aromaticos Sesquiterpénicos	Limoneno, $\alpha$ -terpineno Cumeno, $p$ -cimeno Trans- $\beta$ Cariofileno
ALDEHÍDOS	Monoterpénicos Alifáticos Aromáticos	Citral Nonanal, octadenal Cinamaldehido
ALCOHOLES	Monoterpénicos Alifáticos Sesquiterpénicos Aromáticos	Geraniol, citronelol 3-Decanol Espatuleno, cedrol Alcohol bencílico
FENOLES	Aromáticos	Timol, carvacrol

**Grupos funcionales de las moléculas constituyentes de los aceites esenciales (31)**

**Fuente:** MARTINEZ ALEJANDRO; 2001

### 2.2.2.3 CLASIFICACIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES

Los aceites esenciales se pueden clasificar de la siguiente manera: (30)

#### 2.2.2.3.1 POR SU COMPOSICIÓN ELEMENTAL

1. **Aceites esenciales pobres en oxígeno:** (ricos en terpenos) Como los aceites esenciales de trementina, limón, bergamota, romero, eucalipto, Ciprés, tomillo, laurel, naranja, etc.
2. **Aceites esenciales ricos en oxígeno:** Como los aceites esenciales de anís, hinojo, comino, menta, manzanilla, rosas, violeta, etc.
3. **Aceites esenciales sulfurados:** Como los aceites esenciales de ajo, cebolla, mostaza, etc. (30)

#### 2.2.2.3.2 POR SU PUNTO DE EBULLICIÓN

1. **Aceites esenciales fijos:** Son comúnmente llamados “fijadores” su frecuencia ondulatoria es muy amplia, y su peso molecular generalmente elevado. Se incluye en este grupo a los productos balsámicos y a los aceites resinosos.
2. **Aceites esenciales persistentes:** Son más volátiles que los anteriores. Su acción dura varios días e imprime un carácter especial a los perfumes. (30)

#### 2.2.2.3.3 POR SU ORIGEN

1. **Aceites esenciales naturales:** Se obtienen directamente de la naturaleza, generalmente son de origen vegetal, aunque pueden ser de origen animal. Pueden ser productos de secreción o de algunos estados patológicos.
2. **Aceites esenciales sintéticos:** Son productos de síntesis orgánicas y pueden obtenerse a partir de los componentes obtenidos de los diversos aceites esenciales, como de compuestos ajenos a estos. Pertenecen a este grupo las yanonas con olor a violeta, que son muy empleadas en perfumería.
3. **Aceites esenciales artificiales:** Son la mezcla de los dos anteriores, son de aroma análogo al de los aceites naturales. Se les clasifica en dos subgrupos: los productos extraídos a partir de aceites esenciales; caso de geraniol, acetol y mentol y los obtenidos por síntesis química, caso de la vainilla. (30)

#### **2.2.2.4 CONSTITUCIÓN DE LOS ACEITES ESENCIALES**

Los aceites esenciales están constituidos por muchas clases de compuestos químicos, algunos con un solo componente en alto porcentaje y otros por mezclas complejas de compuestos acíclicos, aromáticos, eterocíclicos, y sus derivados oxigenados, etc.

Químicamente la mayor parte de todos los aceites esenciales consisten en terpenoides, sus derivados oxigenados y una pequeña cantidad de residuos no volátiles (estearoptenos). (30)

##### **2.2.2.4.1 TERPENOIDES**

Los terpenos forman una amplia familia de compuestos químicos; estrictamente hablando, son hidrocarburos cíclicos y acíclicos cuyas formulas moleculares son múltiplos del isopreno C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>. Generalmente se extiende tal definición para incluir alcoholes, aldehídos, cetonas y otros derivados, que poseen el mismo esqueleto carbonado del hidrocarburo terpénico fundamental; semejantes compuestos son llamados más propiamente terpenoides, término que se aplica también a los terpenos propiamente dichos. (30)

##### **A. Monoterpenoides:**

Estas sustancias constituyen un importante grupo de hidrocarburos, alcoholes y cetonas, que son los componentes mayoritarios de los aceites esenciales obtenidos de las hojas, raíces y cortezas de varias plantas. Pueden subdividirse en tres clases según posean o no anillos:

##### **1. Monoterpenoides Acíclicos:**

La estructura de los compuestos incluidos en este grupo se basa, salvo algunas excepciones, en el esqueleto del 2,6-dimetil octano.

##### **2. Monoterpenoides Monocíclicos:**

La gran mayoría de estos compuestos poseen esqueletos carbonados derivados del p-mentano.

##### **3. Monoterpenoides Bicíclicos:**

Los principales hidrocarburos y derivados oxigenados monoterpénicos bicíclicos poseen esqueletos bicarbonados del tipo de los hidrocarburos saturados: Tuyano, pinano, canfano, etc. La  $\alpha$ -pineno es uno de los más importantes por su gran disponibilidad y el gran número de productos obtenidos a partir de él. Está muy distribuido en la naturaleza y es uno de los componentes principales de los aceites esenciales de las coníferas. (30)

#### **B. Sesquiterpenoides:**

Este grupo de terpenoides puede considerarse como constituido por tres moléculas de isopreno. Los hidrocarburos sesquiterpénicos, son con frecuencia constituyentes de los aceites esenciales y a semejanza de los monoterpenoides suelen ser líquidos a las temperaturas ordinarias. Entre los derivados oxigenados se han encontrado alcoholes, epóxidos y cetonas sesquiterpénicas. (30)

#### **2.2.2.4.2 SUSTANCIAS OXIGENADAS**

Son las primeras portadoras de los olores específicos de los aceites esenciales. Se trata principalmente de alcoholes, aldehídos, cetonas y ésteres, entre estas sustancias hay compuestos saturados y no saturados, alifáticos y aromáticos, terpénicos y sesquiterpénicos. (30)

#### **2.2.2.4.3 ESTEAROPTENOS**

Después de su obtención por destilación en vapor en todos los aceites esenciales se encuentra una cantidad considerable de residuo no volátil; dejando en reposo a los aceites mucho tiempo, se separan de las mismas sustancias semejantes a la cera. Estos residuos reciben el nombre de estearoptenos.. (30)

#### **2.2.2.5 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, eucalipto, hierbabuena, menta, etc.), en las raíces (azafrán, cálamo, cúrcuma, jengibre, etc.), en el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.), en las semillas (anís, cardamomo, comino, etc.), en el tallo (canela, etc.), en las flores

(árnica, lavanda, manzanilla, rosa, etc.) y en los frutos (alcaravea, cilantro, laurel, etc.). (31)

## **2.2.2.6 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL**

### **2.2.2.6.1 DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR DE AGUA**

En la destilación por arrastre de vapor de agua se lleva a cabo la vaporización selectiva del componente volátil de una mezcla formada por este y otros "no volátiles". Lo anterior se logra por medio de la inyección de vapor de agua directamente en el seno de la mezcla, denominándose este "vapor de arrastre", pero en realidad su función no es la de "arrastrar" el componente volátil, sino condensarse formando otra fase inmiscible que cederá su calor latente a la mezcla a destilar para lograr su evaporación. En este caso se tendrá la presencia de dos fases inmiscibles a lo largo de la destilación (orgánica y acuosa), por lo tanto, cada líquido se comportará como si el otro no estuviera presente. Es decir, cada uno de ellos ejercerá su propia presión de vapor y corresponderá a la del líquido puro a una temperatura de referencia. (32)

### **2.2.2.6.2 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. (32)

### **2.2.2.6.3 ENFLEURAGE (MÉTODO DE ENFLORADO)**

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 otro medio físico-químico. 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. (32)

#### **2.2.2.6.4 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, bióxido 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. (32)

#### **2.2.3 DERMATOFITOS**

##### **2.2.3.1 DEFINICIÓN**

Los dermatofitos, son hongos filamentosos pluricelulares, potencialmente patógenos para el hombre y los animales, poseen gran capacidad de adaptación a las condiciones ambientales más diversas y tienen especial afinidad para parasitar las estructuras queratinizadas (piel, pelos y uñas) por lo que reciben el nombre de hongos queratinofílicos. No afectan las mucosas ni semimucosas. (33)

Los dermatofitos son un grupo extenso y homogéneo de hongos con características taxonómicas, antigénicas, fisiológicas y patogénicas similares, distinguiéndose entre sí por sus características macroscópicas y microscópicas, así como sus propiedades enzimáticas y nutricionales. Se clasifican en tres géneros: 1) *Trichophyton*, 2) *Microsporum*, y 3) *Epidermophyton*. (33)

La dermatofitosis es una infección superficial de la piel ocasionada por hongos queratinofílicos que afectan estructuras que contienen queratina: piel, pelo y uñas. (33)

## **2.2.3.2 MANIFESTACIONES CLÍNICAS**

### **2.2.3.2.1 TINEA CAPITIS**

Afecta el área de la cabeza, y usualmente es causada por miembros del género *Microsporum* y *Trichophyton*. Cuando es ocasionada por especies del género *Microsporum* es una afección de la infancia, que cura espontáneamente al llegar a la pubertad. Por excepción puede observarse en mujeres después de la menarca y en estos casos es frecuente comprobar hipoplasia de las glándulas sebáceas o alteraciones de la inmunidad mediada por células ocasionadas por otras enfermedades o por medicamentos inmunosupresores, Las fuentes de infección suelen ser animales domésticos, como perros y gatos, o también el suelo. (34)

### **2.2.3.2.2 TINEA CORPORIS**

Afecta hombros, tronco, miembros inferiores y superiores y la cara. Son placas de bordes bien limitados, tanto el eritema como las vesículas y las escamas predominan en la parte periférica, en tanto que la zona central presenta un color ligeramente pardo y se cubre de escamas muy finas. Las especies más frecuentemente aisladas son: *M. canis*, *T. rubrum*, *T. tonsurans* y *E. floccosum*. Las placas de tinea corporis producidas por *M. canis* muestran, con frecuencia una doble *Tinea capitis* descamativa Dermatofitosis circinación, con dos círculos concéntricos de vesículas sobre una base eritematosa; son pequeñas, múltiples y ubicadas en lugares descubiertos del cuerpo. (34)

### **2.2.3.2.3 TINEA MANUUM**

Están afectadas las áreas palmar e interdigital de la mano, que frecuentemente se presenta como una hiperqueratosis unilateral difusa. Usualmente es causada por miembros del género *Trichophyton*. (34)

### **2.2.3.2.4 TINEA PEDIS**

Afecta la planta del pie, bordes laterales, dorso y espacios interdigitales. La manifestación clínica más común es la de intertrigo entre el 4º y 5º dedo del pie con maceración, fisuras y prurito. Las dermatofitosis plantares de evolución aguda o subaguda suelen presentar un aspecto clínico enteramente semejante, sin embargo, su evolución es continua, puede comprometer una sola de las

plantas y cuando afectan a las manos habitualmente sólo atacan a una de ellas (síndrome de dos pies y una mano). Su presentación suele estar precedida de alguna marcha prolongada con calzado de suelas gruesas y con sudoración abundante de los pies. Esta forma clínica es habitualmente producida por *T. interdigitale* (antes *T. mentagrophytes*). Cuando la dermatofitosis plantar se hace crónica, se torna menos pruriginosa, desaparecen casi todas las vesículas y las zonas de la piel afectadas se cubren de escamas gruesas. Por lo general, abarcan la planta, los bordes laterales de los pies y los talones (tiña en mocasín). El agente causal habitual de este proceso es *T. rubrum* y con frecuencia se acompaña de una onicomicosis subungueal distal o de una leuconiquia proximal profunda, esta última es más común en los pacientes inmunocomprometidos. La dermatofitosis crónica en mocasín suele evolucionar por años y muchas veces el paciente no consulta por este problema, que atribuye a sequedad de la piel. Las dermatofitosis plantares son muy raras en la infancia, las formas agudas son patrimonio casi exclusivo de los jóvenes, en tanto que las crónicas de tipo hiperqueratósico son observadas en adultos y en ancianos. (34)

#### **2.2.3.2.5 TINEA UNGUEAL (ONICOMICOSIS)**

La onicomicosis es una infección crónica y progresiva del aparato ungueal causada por hongos.

En la mayoría de los casos se trata de dermatofitos y reciben el nombre de Tinea unguium, con menor frecuencia son levaduras y hongos miceliales, que se localizan, generalmente, en las uñas con algún tipo previo de distrofia (onicomicosis por cándida).

La forma subungueal distal y lateral es la más frecuente, casi siempre causada por dermatofitos y generalmente afecta a la primera uña del pie. Afecta, inicialmente, al hiponiquio y a los bordes laterales. Se extiende en dirección proximal y produce hiperqueratosis subungueal. La uña cambia de color y puede partirse, engrosarse o abombarse. En la parte inferior de la lámina ungueal se depositan restos de queratina alterada en forma de un detritus blanquecino. Finalmente, la uña puede afectarse profundamente y en su totalidad, incluida la matriz ungueal, y desprenderse. Es un proceso lento que puede afectar a una o varias uñas. La especie más frecuentemente aislada es *Trichophyton rubrum*. (35)

### **2.2.3.3 AGENTES ETIOLÓGICOS**

Anamorfo (hongos mitospóricos, asexuales): los agentes etiológicos de los dermatofitos son clasificados en tres géneros anamórficos: *Microsporum*, *Epidermophyton* y *Trichophyton*, de la clase Hifomicetes dentro de Deuteromicotina.

Teleomorfo (hongos meiospóricos, sexuales): algunos dermatofitos, principalmente de las especies *Microsporum* y *Trichophyton*, son capaces de reproducirse sexualmente produciendo gimnotecios con ascos y ascosporas. Los teleomorfos se clasifican en el género *Arthroderma*, familia *Arthrodermataceae*, orden *Onygenales*, filo *Ascomycota*. (33)

### **2.2.3.4 DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

El diagnóstico definitivo de las infecciones producidas por dermatofitos es necesario antes de la iniciación de la terapia antifúngica debido a que los tratamientos son largos, de elevado costo y pueden producir efectos colaterales. Para el diagnóstico de laboratorio hay que considerar los siguientes pasos:

Datos previos: el conocimiento previo del paciente y del problema diagnóstico es invaluable para el micólogo en el procesamiento de muestras. Para ello se aconseja usar fichas para tener un mejor aprovechamiento de estos datos.

Preparación adecuada del paciente:

- a) Se debe suspender toda medicación antifúngica, tópica o sistémica, entre 15 a 30 días antes de la extracción.
- b) Suspender la colocación de pomadas, cremas o talcos, medicinales o cosméticos por lo menos 1 día antes de concurrir al laboratorio.
- c) Se debe higienizar por lo menos 3 horas antes de la extracción de la muestra con agua y jabón.
- d) Cuando el material a estudiar es de uña se recomienda no cortarlas y cepillarlas con frecuencia usando agua y jabón y concurrir al laboratorio sin esmaltes. (33)

#### **2.2.3.4.1 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA**

Escamas de piel: Generalmente las escamas se obtienen por raspado del borde activo de la lesión, ya que allí hay más probabilidades de encontrar elementos fúngicos viables. Con un bisturí estéril se recoge el material en un portaobjeto flameado a la llama y después de la extracción se cubre con otro portaobjeto estéril. (33)

Uñas: Los métodos para la recolección de las uñas afectadas varían de acuerdo al tipo de cuadro clínico:

- a) Onicomycosis subungueal distal lateral: la muestra se obtiene por raspado del lecho ungueal, por el borde libre distal y lateral de la uña.
- b) Onicomycosis superficial blanca: se raspa con un bisturí la superficie afectada.
- c) Onicomycosis subungueal proximal: se debe recoger el material blanquecino de la porción más profunda de la tabla ungueal.
- d) Onicomycosis distrófica total: se debe raspar preferentemente el material subungueal.

Pelos: Si se trata de zonas pilosas se obtendrá el material con una pinza de depilar estéril arrancándolos con la raíz intacta, depositándolos entre portaobjetos estériles. Exudado y contenido vesicular. El material se tomará con un bisturí estéril.

Transporte de la muestra: Se deberá realizar en un contenedor seco. El almacenaje de muestras dermatológicas se debe realizar a temperatura ambiente. (33)

#### **2.2.4 AGENTE ETIOLÓGICO EN ESTUDIO**

##### **2.2.4.1 *Trichophyton rubrum***

Es el dermatofito aislado con mayor frecuencia, produciendo diversos tipos de tiña, predominando en la localización corporal, las dermatofitosis son las micosis más comunes, siendo *Trichophyton rubrum* el agente causal hasta en el 80% de los casos.

De acuerdo a la distribución por grupo de edad se evidencia que *Trichophyton Rubrum* predomina en aquellos pacientes cuyas edades están comprendidas entre 31 y 40 años (23.48%), seguido por aquellos con edades comprendidas entre 41 y 50 años (20.03%), y los de 21 a 30 años. (36)

#### **2.2.4.2 PATOGENIA**

Es la principal y única causa de dermatofitosis. No es una infección potencialmente mortal. Tiene la capacidad de segregar y producir enzimas proteolíticas que han demostrado ser más virulentas.

Entra en la piel a través de la degradación de la queratina de la piel. La queratina es una proteína fibrosa presente principalmente en la piel. *Trichophyton rubrum* invade a través del estrato córneo, que es la capa más externa de la piel de la epidermis.

Como resultado, la dermatosis ocurre en forma de pie de atleta, tiña inguinal, infección por hongos entre los dedos y las uñas de los dedos. Es una enfermedad dolorosa

#### **2.2.4.3 POSICIÓN TAXONÓMICA**

##### **Posición taxonómica**

**Phylum:** Ascomycota

**Clase:** Eufungi

**Orden:** Onygenales

**Familia:** Arthrodermataceae

#### **2.2.4.4 SINONIMOS**

*Trichophyton megninii*, *Trichophyton purpureum*, *Trichophyton vinosum*. (37)

#### **2.2.4.5 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS**

Hongo filamentoso con microconidios piriformes (de 3-5,5 x 2-3,5 µm), sésiles sobre las hifas formando racimos. Macroconidios muy escasos (de 40-55 x 6-7,5 µm), con varios tabiques, de formas irregulares, de pared fina y lisa, al final de la hifa. Abundan las clamidosporas intercalares, presencia de hifas en raqueta y ausencia de filamentos espirales. (37)

#### **2.2.4.6 CULTIVO DE *Trichophyton rubrum***

Se cultiva en agar glucosado de Sabouraud con NaCL al 5% y en otros con agar Littman Oxgall, agar peptona al 1% medio de urea de agar *Trichophyton*.

Si se realiza un examen del cultivo se observan hifas largas, delgadas, abundantes microconidias de piriformes a redondeadas de 3,0-5,5 x 2.0-3,5  $\mu\text{m}$ , rara vez hay microconidias, en forma de puro, de tamaño variable de pared delgada y multiseptada. (38)

#### **2.2.5 MEDIOS DE CULTIVO**

Los medios de cultivo son las soluciones nutritivas que usan en el laboratorio para el cultivo de microorganismo. Existen medios de cultivo comerciales como del agar Sabouraud dextrosa, agar mycosel y agar papa dextrosa, que permiten el aislamiento del hongo. (38)

##### **2.2.5.1 CULTIVO DE HONGOS**

1. Se tomará con el asa de siembra (previamente esterilizado por flameado), una cantidad adecuada de muestra problema depositando el inóculo en uno de los extremos superiores de la placa.
2. A partir de aquí se realizan movimientos en zigzag de un extremo a otro de la placa con un asa de siembra estéril.
3. Todo este procedimiento se debe realizar en condiciones de asepsia y con un mechero bunsen encendido.
4. Concluida la siembra, etiquetar la placa y dejarla en la estufa a 26°C y se lee dentro de 7 días. (38)

##### **2.2.5.2 CRECIMIENTO Y REPRODUCCIÓN MICÓTICA**

El crecimiento de un organismo se define como el aumento de los componentes celulares del mismo, el crecimiento celular conduce a un incremento en el número de células y en consecuencia al crecimiento poblacional.

Los hongos se reproducen por esporas, que son estructuras unicelulares de resistencia que contiene toda la información genética necesaria para el desarrollo completo de un hongo.

Los tipos de esporas, su tamaño y modo de esporulación son las características principales para clasificar e identificar a los hongos.

Las esporas pueden reproducirse de forma asexual (por simple diferenciación del micelio) o de forma sexual (por fusión de los núcleos haploide con formación de un cigoto sexual). (39)

### **2.2.5.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO**

#### **1. Fase de latencia**

Cuando una población micótica es inoculada en medio fresco, el crecimiento usualmente no comienza de inmediato sino después de un tiempo llamado de latencia, que puede ser corto o largo dependiendo de las condiciones. La fase de latencia representa un periodo de transición para los microorganismos cuando son transferidos a una nueva condición. En esta fase se producen las enzimas necesarias para que ellos puedan crecer en un nuevo medio ambiente. En esta fase no hay incremento en el número de células, pero hay gran actividad metabólica, aumento en el tamaño individual de las células, en el contenido proteico, ADN y peso seco de las células. Si un cultivo que está creciendo en fase exponencial es inoculado al mismo medio de cultivo bajo las mismas condiciones de crecimiento, no se observa fase de latencia y el crecimiento exponencial sigue a la misma velocidad. Si el inóculo se toma de un cultivo viejo (fase estacionaria) y se inocula en el mismo medio, generalmente se presenta la fase de latencia esto se debe a que las células generalmente agotan una serie de coenzimas esenciales u otros constituyentes celulares y se requiere cierto tiempo para su resíntesis. También se observa latencia cuando el inóculo está formado por células que han sido dañadas, pero no muertas, bien sea por tratamiento con calor, radiaciones o sustancias químicas, puesto que requieren reparar dicho daño. En el caso de que una población se transfiera de un medio de cultivo rico a un medio pobre, se observa latencia puesto que es necesario que las células para poder seguir creciendo tengan una serie de enzimas para poder sintetizar algunos metabolitos esenciales que no están presentes en el medio. (40)

#### **2. Fase exponencial o fase logarítmica**

Es el período de la curva de crecimiento en el cual el microorganismo crece exponencialmente, es decir que cada vez que pasa un tiempo de generación la población se duplica. Bajo condiciones apropiadas la velocidad de crecimiento

es máxima. Las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio de cultivo, etc.) afectan a la velocidad de crecimiento exponencial. (40)

### 3. Fase estacionaria

En cultivos en recipientes cerrados una población no puede crecer indefinidamente en forma exponencial. Las limitaciones del crecimiento ocurren ya sea por agotamiento de algún nutriente esencial, por acumulación de productos tóxicos, porque se alcance un número de células elevado para el espacio disponible o por una combinación de las causas anteriores. Este periodo durante el cual cesa el crecimiento se conoce como fase estacionaria. (40)

### 4. Fase de muerte

Si la incubación continúa después de que una población microbiana alcanza la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas y continuar metabolizando, pero va a comenzar una disminución progresiva en el número de células viables y cuando esto ocurre se dice que la población ha entrado en fase de muerte. (40)

#### 2.2.6 CEPARIO

Los procesos de validación son los procesos que se requieren para asegurar que los parámetros de funcionamiento de los test, tanto comerciales como los de uso doméstico, son los esperados y las pruebas pueden ser utilizadas como métodos de diagnóstico en el laboratorio. La mayoría de los procedimientos en microbiología clínica, dependen de que los microorganismos viables en el cultivo sean capaces de mantener sus características, morfológicas, fisiológicas y que sean típicas y reproducibles. (41)

Existen varias colecciones de cepas utilizables para el control de calidad.

- **ATCC:** American Type Culture Collection – Rockville, USA.
- **NCIC:** National Collection of Industrial Bacteria Survey, Inglaterra.
- **JFCC:** Japanese Federation of Culture Collection of Microorganism – Japon.
- **RIA:** USSR, Research Institute for Antibiotics – Moscú, Rusia.
- **NCIB:** Collection Nacional Industrial – Aberdeen, Escocia.
- **DSM:** Deutsche Sammlung von Mikroorganismen – Göttinger, Alemania.

En todo caso, las cepas de referencia deben tener requisitos específicos.

- Características típicas.
- Características estables.
- Reproducibilidad. (41)

#### **2.2.6.1 CEPAS ATCC**

Las cepas ATCC son una herramienta indispensable y eficaz para el control de calidad interno en cultivos de microbiología.

Son microorganismos certificados para el control de calidad en microbiología y es utilizado en disciplinas como la clínica, alimenticia, farmacéutica, cosmética o ambiental. Sus características genotípicas y fenotípicas garantizan la identidad del microorganismo. (42)

#### **2.2.7 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA**

Las pruebas de susceptibilidad “in vitro”, han sido tema de bastante interés en los últimos años. Es importante conseguir una adecuada valoración cuantitativa (CMI) que permite predecir si un aislamiento clínico o resistente “in vitro” a un antifúngico y una certera valoración cualitativa que sirva de predicción para confirmar dicha actividad.

A partir de 1986, al National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) crea el subcomité en pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos y comienza a estandarizar un método a través de estudios colaborativos. En diciembre de 1992 se publica un macro método de referencia en medio líquido para pruebas de susceptibilidad de hongos y lavaduras. (42)

##### **2.2.7.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR**

El microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antimicótico. Las placas se incuban por 16-18 horas a 35- 37°C. Durante la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco 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 al germen en estudio. El diámetro del área de inhibición alrededor del

disco puede ser convertido a las categorías de sensible, intermedio o resistente (S, I, o R) de acuerdo a tablas publicadas por los organismos encargados del control de tales métodos, por ejemplo el Comité Nacional de Estándar de Laboratorios Clínicos de los Estados Unidos de Norteamérica (National Committee for Clinical Laboratories Standards). (43)

#### **2.2.7.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA**

Se refiere al agente o solución que disminuye en 99.9% el crecimiento del hongo a partir de un inóculo de subcultivo

Los métodos más utilizados para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) son los métodos de dilución. (44)

##### **DILUCIÓN EN AGAR**

Se inoculan placas con concentraciones dobles progresivas de antibiótico y un testigo sin fármaco con varias cepas fúngicas. Tras la inoculación pertinente se determina la CMI. (44)

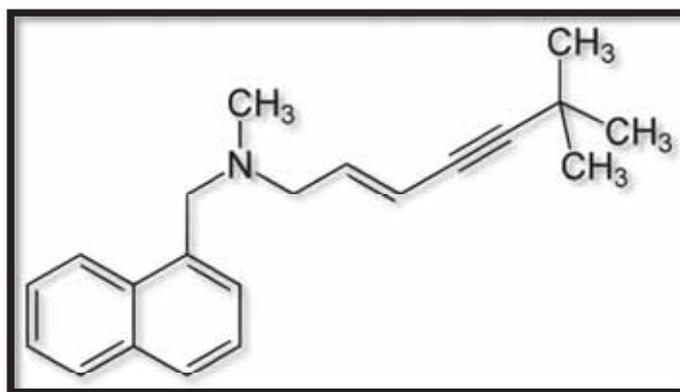
##### **DILUCIÓN EN CALDO**

Puede hacerse en forma de macrodilución o microdilución fúngico estandarizado y diluciones dobles progresivas de antibiótico. tras la incubación se hacen subcultivos en placas y de esta forma se calculan la CMI en relación a un control sin fármaco. (44)

## 2.2.8 DESCRIPCIÓN DEL ANTIMICÓTICO USADO COMO PATRÓN COMPARATIVO

### 2.2.8.1 TERBINAFINA:

Terbinafina, es un derivado sintético de alilamina.



Estructura química del terbinafina. (45)

**Fuente:** <http://corinto.pucp.edu.pe/quimicageneral/contenido/72-grupos-funcionales.html>

#### 2.2.8.1.1 MECANISMO DE ACCIÓN

La terbinafina inhibe el escualeno epoxidasa, esencial en la biosíntesis enzimática del esterol fúngico. La terbinafina provoca una deficiencia del ergosterol y una acumulación intracelular del escualeno causando la muerte del hongo. Su espectro incluye: *Microsporum spp*, *Epidermophyton spp*, *Trichophyton ssp*, *Candida albicans*. (46)

#### 2.2.8.1.2 FARMACOCINÉTICA

- **Biodisponibilidad:** 40 %
- **Tiempo de vida media:** de eliminación 17 horas.
- **Absorción:** Buena, en TGI se absorbe en más del 70%
- **Distribución:** Se distribuye rápidamente en la dermis y el estrato corneo incluyendo las glándulas sebáceas. Mantiene concentraciones elevadas en los folículos pilosos, en los cabellos y la piel grasa. Penetra en las uñas y está presente por semanas. Se excreta en leche materna. Unión a proteínas plasmáticas 99%.
- **Metabolismo:** Hepático, a metabolitos inactivos.
- **Excreción:** Renal, 80% como metabolitos, fecal 20%. (46)

### **2.2.8.1.3 INDICACIONES Y USOS**

Está indicado en el tratamiento: Onicomycosis por dermatofitos de los dedos de la mano y de los pies. (46)

### **2.2.8.1.4 PRECAUCIONES**

Se ha descrito alteraciones en el cristalino y en la retina durante su uso, se suspende el tratamiento si se presenta hipersensibilidad, fiebre, astenia, orina cargada o ictericia. (46)

### **2.2.8.1.5 EFECTOS ADVERSOS**

#### **Vía oral**

**GI:** Diarrea, dispepsia, cólico, náuseas, flatulencia.

**HEMA:** Neutropenia severa, trombocitopenia y agranulocitos.

**OFT:** Trastornos visuales.

#### **Vía tópica**

Enrojecimiento, picor o urticaria en el lugar de aplicación. (47)

### **2.2.8.1.6 PRESENTACIÓN**

- Lamisil, comp 250 mg Novartis
- Lamisil, crema al 1% Novartis **(47)**

## **2.2.9 PREFORMULACIÓN**

Los estudios de preformulación consisten en la aplicación de los conceptos biofarmacéuticos a las características fisicoquímicas del principio activo con el objetivo de diseñar el sistema de liberación adecuado, es decir la forma farmacéutica o cosmética. (48)

Cualquier principio activo que se pretenda incluir en una forma farmacéutica o cosmética debe de pasar por una serie de etapas para la obtención de un medicamento seguro y eficaz. (48)

Esta fase inicial de la investigación se conoce como preformulación la cual se describe como los procesos por medio de los cuales se caracteriza física y químicamente al principio activo antes de formularlo y de esta forma poder

conseguir calidad durante el desarrollo de la forma farmacéutica, pudiéndose anticipar a los problemas que se pudieran presentar durante la formulación, identificando el mejor camino para la elección de la tecnología requerida para su manufactura y para obtener un producto efectivo, seguro y estable dentro de la formulación seleccionada.

### **2.2.9.1 CONSIDERACIONES GENERALES PARA FORMULAR**

#### **CONSIDERACIONES PREVIAS:**

##### **PROPIEDADES FARMACODINÁMICAS**

- Finalidad terapéutica
- Efectos tóxicos
- Reacciones adversas. (48)

##### **CARACTERÍSTICAS A LAS PERSONAS A LOS QUE SE DIRIGE**

- Aceptación y comodidad de la forma farmacéutica.

##### **CONSIDERACIONES BIOFARMACEUTICAS**

- Biodisponibilidad
- Vía de administración
- Características biofarmacéuticas de la formulación. (48)

##### **CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS Y FARMACOTECNICAS**

- Solubilidad
- pH
- Fluidez
- Estabilidad
- Compatibilidad (48)

### **2.2.9.2 ENSAYOS DE PREFORMULACIÓN**

Estos ensayos de preformulación sirven para determinar que no exista incompatibilidad entre el principio activo y los auxiliares de formulación, que pueden afectar la estabilidad del producto final. (49)

Para determinar la forma farmacéutica se tiene que tomar en cuenta los siguientes aspectos:

- Sustancias compatibles.
- Material apropiado para la elaboración.
- Concentraciones adecuadas.
- Forma adecuada y cómoda de aplicación del producto. (49)

### **2.2.10 FORMAS COSMÉTICAS**

Los cosméticos se pueden presentar de diversas formas ya sean líquidos (lociones, colonias, etc.), sólidos (polvos, lápices, barras, etc.) y semisólidos o pastosos (cremas, geles, mascarillas, etc.).

Para establecer su forma, depende de varios factores:

- En función de su forma farmacéutica.
- En función de su lugar de aplicación.
- En base a su función principal, cosméticos de higiene y acondicionamiento, mantenimiento y protección de la piel y cabello, decorativos y para el tratamiento de las alteraciones estéticas del cabello. (50)

#### **2.2.10.1 FORMAS COSMÉTICAS QUE DEPENDEN DEL EXCIPIENTE:**

La forma cosmética es la presentación final del producto y está determinada por el excipiente o por el tipo de envase en el que está incluido.

##### **A. Esmalte**

El esmalte para uñas es una dispersión líquida nitrocelulósica pigmentada que debido a su composición posee propiedades tales como: buen brillo, secamiento rápido, excelente dureza y buena adherencia.

##### **B. Soluciones**

Son formas líquidas en las que se han disuelto varios componentes que forman una sola fase (sistemas monofásicos)

Pueden ser hidrófilas como los tónicos, las lociones capilares o las lociones para después del afeitado; o lipófilas como los aceites de masaje. (50)

### **C. Suspensiones**

Son formas líquidas en las que uno o varios componentes líquidos dispersan a unos componentes sólidos insolubles.

Se utilizan sobre todo en cosmética decorativa como maquillajes fluidos o esmaltes de uñas. (50)

### **D. Emulsiones**

Son mezclas heterogéneas de dos o más sustancias líquidas de distinta naturaleza, hidrófilas y lipófilas, que se mantienen estables por la incorporación de otra sustancia emulgente. Las emulsiones fluidas se comercializan como leches (por ejemplo, leche corporal hidratante) y las semisólidas, como cremas (crema antiarrugas, crema acondicionadora para el cabello, etc.). (50)

### **E. Geles**

Son dispersiones coloidales viscosas y transparentes. Dentro de este grupo están las gominas, los contornos de ojos, etc.

Dentro de este tipo se incluyen los cristales líquidos, que son formas irisadas obtenidas con productos derivados del colesterol. (50)

### **F. Pastas**

Son formas semisólidas deformables y húmedas. Contienen un alto porcentaje de sustancias sólidas pulverizadas, dispersas en líquidos acuosos u oleosos. Ejemplo: mascarilla antiarrugas. (50)

## **2.2.10.2 FORMAS COSMÉTICAS QUE DEPENDEN DEL ENVASE**

La forma cosmética es la presentación final del producto y está determinada por el excipiente o por el tipo de envase en el que está incluido.

### **A. Vaporizadores**

Son envases que contienen aire y líquido. El producto sale presionando el envase o la válvula que contiene. Ejemplo: pulverizadores de agua termal, de perfume. (50)

## **B. Aerosoles**

Son mezclas de un gas propelente y un líquido contenidos en un envase metálico a presión. Al pulsar la válvula, la mezcla sale en forma de gotas muy finas.

Ejemplo: laca. (50)

## **C. Espumas**

Son dispersiones gas en sólido o gas en líquido que se presentan en envases a presión. Poseen una válvula que permite la salida de la mezcla, dando la forma cosmética. Ejemplo: maquillaje en espuma. (50)

## **D. Envases monodosis**

Son pequeños envases herméticos que se presentan como dosis única. Ejemplo: ampollas faciales. (50)

### **2.2.11 ESMALTE DE UÑAS**

El esmalte de uñas, barniz de uñas es un cosmético que tiene como objetivo pintar las uñas de los dedos de las manos y los pies a través de una laca. En general los productos cosméticos de este tipo son compuestos orgánicos con contenido de nitrocelulosa, tolueno, formaldehído entre otros. Es común el agregado de perlas y otros tipos de brillos propios de la industria. (51)

#### **2.2.11.1 TIPOS DE ESMALTES DE UÑAS**

Los esmaltes de uñas son productos cosméticos ideados especialmente para embellecer y decorar las uñas, aunque no todos cuentan con las mismas propiedades. Los mejores esmaltes de uñas son aquellos que, además de cumplir con su función decorativa, cuidan y respetan la estructura natural de la uña. Son formulaciones resistentes y de gran dureza, que aseguran una permanencia mayor, y además forman una capa protectora sobre la uña, proporcionando acabados cubrientes y sin estrías.

**A. Crema:** Se dice del esmalte de acabado cremoso, liso y brillante.

**B. Efecto Arena / Texturados:** Estos esmaltes son de los más recientes, imitan el efecto arena, al igual que los crackelados se aplican normalmente y se hace el efecto una vez van secando

- C. Escamas:** Se trata de los esmaltes que incluyen una especie de partículas plásticas de formas irregulares, de menor o mayor tamaño, algunas de ellas pueden ser (o no) holográficas.
- D. Glossy:** Este tipo de lacas se caracterizan por tener un acabado muy brillante, tipo gel.
- E. Duocromo:** Este tipo de esmalte son de acabado metálico y se caracterizan por cambiar de tono (dos colores) según la incidencia de la luz. (52)

### 2.2.11.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ESMALTE

Los esmaltes están compuestos por sustancias químicas, en una proporción donde al individuo no le hagan mucho daño y den el color deseado. Principalmente están compuestos por los siguientes:

- Nitrocelulosa: Derivado de la celulosa uso en la elaboración de diversos productos como esmaltes, lacas y plásticos. (INCI: Nitrocellulose)
- Formaldehído: Producto químico que se usa como bactericida, conservante, fabricación de plásticos, lacas y esmaltes. (INCI: Formaldehyde)
- Acetato de etil: Líquido incoloro característico de los esterres, es miscible en hidrocarburos y cetonas y poco soluble en agua, es usado como solvente de barnices, lacas y esmaltes.
- Alcohol isopropílico: Alcohol incoloro con olor intenso y muy miscible con el agua, usado en la industria farmacéutica y cosmética. (INCI: Isopropyl alcohol) (53)

### 2.2.11.3 USOS

- Laca conteniendo medicamentos antihongos es ideal para tratar infecciones producidas por los hongos de las uñas de manos y pies.
- Elimina verrugas
- Regeneración y recuperación de la uña.
- Onicomycosis, causadas por dermatofitos, levaduras y mohos.
- Pintar las uñas de las manos y los pies. (53)

#### **2.2.11.4 ESMALTE HIDROSOLUBLE DE QUITOSANO**

Esmalte que mejora la penetración y la liberación del principio activo en la uña. La tecnología TUD (Trans Ungueal Delivery) basada en el quitosano, es una nueva tecnología basada en el producto quitosano, un agente filmógeno hidrosoluble, que mejora la liberación del principio activo en la uña. Es un biopolímero semisintético derivado de la quitina, que se extrae del caparazón de los cangrejos.

Una vez aplicada sobre la uña, seca rápidamente y forma película invisible en la superficie ungueal. (54)

#### **2.2.11.5 PROPIEDADES DE ESMALTE CON QUITOSANO**

- Forma un film elástico y fácilmente eliminable con agua.
- Transporta activos a través de la capa cornea.
- Atraviesa la queratina.
- No tóxico, no irritable.
- Permeable al aire y a la humedad.
- Cosméticamente aceptable en hombres.
- Penetra en los espacios intercelulares y cavidades de la uña.
- Hidrata la superficie de la uña.
- Proporciona una protección natural frente a agentes externos. (54)

##### **2.2.11.5.1 COMPONENTES**

- Acetato etílico: Líquido incoloro característico de los ésteres, es miscible en hidrocarburos y cetonas y poco soluble en agua, es usado como solvente de barnices, lacas y esmaltes.
- Alcohol cetosteárilico: Es una mezcla de alcoholes grasos, insoluble en agua, se usa como agente viscosante en la elaboración del esmalte. (INCI: Cetoesteryl alcohol)
- Alcohol etílico: Líquido incoloro, que se obtiene por destilación, se emplea como disolvente en la preparación de fármacos y perfumes. (INCI: Alcohol)
- Quitosano: Es un agente filmógeno hidrosoluble, que mejora la liberación del principio activo en la uña. (INCI: N-carboximetilquitosano)

- Agua purificada: Agua tratada por osmosis inversa o destilación, si minerales en su composición (55)

#### **2.2.11.6 PREPARACIÓN DEL ESMALTE DE UÑAS**

1. Disolver el alcohol cetosteárico (viscosante), en el acetato de etilo (disolvente).
2. A la mezcla se le agrega el alcohol etílico (disolvente) y se agita, evitando la formación de grumos.
3. Se agrega chitosano (mejora la liberación del principio en la uña) y se remueve.
4. Se añade agua purificada hasta que se forme una mezcla viscosa. . (55)

#### **2.2.11.7 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS, FISCOQUÍMICOS Y MICROBIOLÓGICOS DEL ESMALTE DE UÑAS.**

- **Organolépticos:** Aspecto, color y olor.
- **Fisicoquímicos:** Viscosidad, pH.
- **Microbiológicos:** Microorganismos mesófilos, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* , *Escherichia coli*, *Candida albicans* (56)

#### **2.2.11.8 EVALUACIONES DEL ESMALTE DE UÑAS**

- Tiempo de secado
- Suavidad para fluir
- Penetración de uña
- Estudio de estabilidad (57)

#### **2.2.11.9 MARCO CONCEPTUAL**

**Dermatofitosis:** Son un conjunto de micosis superficiales que afectan la piel y sus anexos (uñas y pelos), llamadas también tiñas de manera común, son causadas por un grupo de hongos parásitos de la queratina denominados dermatofitos. (1)

**Volátil:** Es una medida de la tendencia de una sustancia a pasar a la fase de vapor. Se ha definido también como una medida de la facilidad con que una sustancia se evapora.

**Preformulación:** Sirven para determinar que no exista incompatibilidad entre el principio activo y los auxiliares de formulación, que pueden afectar la estabilidad del producto final. (49)

**Enfleurage:** 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. (32)

**Teleomorfo:** Estructura reproductiva, de un hongo, resultado de la plasmogamia, con nueva combinación nuclear (reproducción sexual).  
**Coenzima:** Moléculas orgánicas que se unen de manera temporal o permanente a la enzima en una zona bastante próxima al centro activo. (58)

**Propelente:** Gas utilizado para impulsar las sustancias contenidas en los aerosoles

**Chitosano:** Agente filmógeno hidrosoluble, que mejora la liberación del principio activo en la uña. Es un biopolímero semisintético derivado de la quitina, que se extrae del caparazón de los cangrejos. (54)

**Ergosterol:** Es un componente lipídico de la membrana sobre el cual actúa la mayoría de los fármacos antimicóticos. Es el esteroide que predomina en las células fúngicas y, entre sus funciones, da fluidez e integridad a la membrana, permite la función apropiada de muchas enzimas unidas a ella y, al favorecer la función de la quitina sintetasa, permite el crecimiento y la división celular. (59)

**Lecho ungueal:** Área modificada de la epidermis situada debajo de la uña, sobre la cual se desliza esta al crecer.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 MATERIALES

##### 3.1.1 MUESTRA VEGETAL

Se emplearon las hojas de *Origanum vulgare L.* (Orégano) que fueron recolectadas en la Provincia de Andahuaylas que se encuentra a una altitud de 2836 m.s.n.m, localizada en la zona noroccidental del departamento de Apurímac.

##### 3.1.2 MUESTRA MICROBIOLÓGICA

*Trichophyton rubrum* ATCC 28188 Microbiologics, Inc.(ver anexo 2)

##### 3.1.3 PATRÓN COMPARATIVO ANTIMICÓTICO

Terbinafina al 3% y esmalte antimicótico de ácido undecilénico al 25%

##### 3.1.4 MEDIO DE CULTIVO

Agar Dextrosa Sabouraud

#### 3.2 MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

##### 3.2.1 MATERIALES DE CAMPO

- Tijera podadora
- Bolsas de papel Kraff
- Bolsas de polietileno
- Cámara fotográfica
- Lapiceros
- Etiquetas de campo
- Cuaderno de campo

##### 3.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO

- Vaso de precipitados
- Matraz 100, 200, 250 mL
- Pipetas de 100,200, 500, 1000  $\mu$ L
- Placas Petri

- Tubos de ensayo
- Discos de difusión estériles de 6 mm
- Fiola
- Gradilla
- Papel filtro
- Termómetro
- Goteros
- Asas de siembra y aguja de kohle
- Mecheros
- Pinzas
- Baguetes
- Embudos

### **3.2.3 EQUIPOS DE LABORATORIO**

- Autoclave: marca INDUMELAB, modelo AT – TM50.
- Incubadora: marca BINDER, modelo DIN 12880
- Micropipetas marca DRAGONLAB, modelo KE 0024257
- Balanza analítica: marca OHAUS, modelo PA313.

### **3.2.4 INSUMOS PARA LA ELABORACIÓN DEL ESMALTE**

- Alcohol isopropílico: 13% (INCI: Isopropyl alcohol)
- Propilenglicol: 82% (INCI: Propylene glicol)
- Acetato de etilo: 4%
- Chitosano: 0.5% (INCI: N-carboximetilquitosano)
- Ácido láctico: 1% (INCI: Lactic acid)
- Aceite esencial de oregano: 0.5% (*Origanum Vulgare Oil*)

### **3.2.5 OTROS MATERIALES**

- Algodón
- Gasas
- Guantes no quirúrgicos
- Detergente
- Barbijos

- Jeringas de 1 mL
- Papel aluminio
- Papel filtro
- Vernier
- Hisopos estériles
- Pinzas metálicas
- Cronómetro

### 3.3 DISEÑO METODOLÓGICO

#### 3.3.1 TIPO DE ESTUDIO

Para la evaluación de la actividad antimicótica del esmalte de uñas elaborado con aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (Orégano) frente *Trichophyton rubrum ATCC 28188* se realizó un estudio.

- **Experimental.** Porque se manipula deliberadamente una o más variables independientes para analizar las consecuencias que la manipulación tiene sobre una o más variables dependientes.

#### 3.3.2 DISEÑO DE ESTUDIO

##### 3.3.2.1 DE PRUEBA ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL

Grupo	Tratamiento experimental	Medición de prueba (observación)
G1	X1	O1
G2	X2	O2
G3	X3	O3
G4	X4	O4
G5	X5	O5
G6	X6	O6
G7	X7	O7
G8	X8	O8
G9	X9	O9
G10	X10	O10
G11	X11	O11
G12	X12	O12

**Simbología:**

**G:** Grupo

**X:** Tratamiento experimental

**O:** Observación después de 7 días.

**G1, G2,.....G11, G12:** Cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

**X1, X2....X10:** Concentraciones del aceite esencial que fueron utilizados a concentraciones (12.5, 25, 50, 70,75,80,85,90,95,100 %)

**X11:** Concentración del fármaco terbinafina que se utilizó como patrón para la prueba antimicótica

**X12:** Dimetilsulfoxido, solución que se usa como blanco para la prueba antimicótica

**O1, O2.....O10:** Medición del halo de inhibición que fueron producidos por el aceite esencial de orégano después de 7 días.

**O11:** Medición de los halos de inhibición que fueron producidos por el patrón después de 7 días.

**O12:** Medición de los halos de inhibición que fueron producidos por el blanco después de 7 días.

**3.3.2.2 DISEÑO DE LA PRUEBA ANTIMICÓTICA DEL ESMALTE ELABORADO A BASE DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* L. (ORÉGANO)**

<b>Grupo</b>	<b>Tratamiento experimental</b>	<b>Medición de la prueba</b>
<b>G1</b>	X1	O1
<b>G2</b>	X2	O2
<b>G3</b>	X3	O3
<b>G4</b>	X4	O4

**Simbología:**

**G:** Grupo

**X:** Tratamiento experimental

**O:** Observación después de 7 días.

**G1, G2...G4:** Cepas de *Trichophyton rubrum ATCC 28188*

**X1:** Esmalte elaborado con aceite esencial al 70% con quitosano al 1%.

**X2:** Esmalte elaborado con aceite esencial al 70% con quitosano al 2%.

**X3:** Esmalte antimicótico de ácido undecilénico que se usó como patrón.

**X4:** Dimetilsulfóxido (DMSO) solución que se usó como blanco.

**O1, O2.....O4:** Medición del halo de inhibición después de 7 días.

### **3.4 IDENTIFICACIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

#### **3.4.1 VARIABLES IMPLICADAS**

##### **3.4.1.1 VARIABLE INDEPENDIENTE**

#### **A. CONCENTRACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL OBTENIDA DE LAS HOJAS SECAS DE *Origanum vulgare* (ORÉGANO).**

##### **DEFINICIÓN CONCEPTUAL**

La concentración es la relación que existe entre la cantidad de una sustancia disuelta en este caso aceite esencial y la del disolvente dimetilsulfoxido. Cantidad de aceite esencial que se requiere para que cumpla la acción farmacológica adecuada (60)

##### **DEFINICIÓN OPERACIONAL**

- **Naturaleza:** Cuantitativa
- **Medición:** Directa
- **Escala:** Razón
- **Instrumento de medición:** Micropipeta
- **Procedimiento de medición:** Se procedió a medir el volumen del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano), la cual luego se añadió a diferentes concentraciones en la formulación y elaboración del esmalte.
- **Indicador:** cantidad de aceite esencial expresado en microlitros
- **Expresión final:** (mg/mL).

## **B. CONCENTRACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare L.* (ORÉGANO) Y DEL QUITOSANO EN EL ESMALTE DE UÑAS.**

### **DEFINICIÓN CONCEPTUAL**

La concentración es la relación que existe entre la cantidad de una sustancia disuelta en este caso aceite esencial y el quitosano en la formulación del esmalte. (60)

### **DEFINICIÓN OPERACIONAL**

- **Naturaleza:** Cuantitativa
- **Medición:** Directa
- **Escala:** Razón
- **Instrumento de medición:** Micropipeta
- **Procedimiento de la medición:** Se procedió a medir el volumen del quitosano (mL), posteriormente se midió el volumen de aceite esencial (mL) para luego ser incluidas en la formulación y elaborar el esmalte de uñas.
- **Indicador:** Porcentaje
- **Expresión final:** (mg/mL)

### **3.4.1.2 VARIABLES DEPENDIENTES**

- A.** Actividad antimicótica del aceite esencial del *Origanum vulgare L.* (orégano), frente a cepas de *Trichophyton rubrum*.
- B.** Evaluación del esmalte de uñas
- C.** Actividad antimicótica del esmalte de uñas elaborado con el aceite esencial de orégano.

## **A. ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DEL *Origanum vulgare* (ORÉGANO), FRENTE A CEPAS DE *Trichophyton rubrum***

### **DEFINICIÓN CONCEPTUAL**

Es la capacidad de una 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, directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped. (61)

## **DEFINICIÓN OPERACIONAL**

- **Naturaleza:** Cuantitativa
- **Medición:** Directa
- **Escala:** Razón
- **Instrumento de medición:** Vernier
- **Procedimiento de medición:** Se mide los halos de inhibición del crecimiento fúngico producido por las diferentes concentraciones del aceite esencial usando el vernier.
- **Indicadores:** Diámetro de halo de inhibición del crecimiento
- **Expresión final:** Milímetros (mm)

## **B. EVALUACIÓN DEL ESMALTE DE UÑAS**

### **B.1 PARÁMETROS ORGANOLEPTICOS**

#### **DEFINICIÓN CONCEPTUAL**

Permite evaluar inmediatamente el estado en que se encuentra la muestra, las características organolépticas determinan los parámetros de aceptación del producto por el consumidor. (62)

#### **SUB INDICADORES**

##### **B.1.1 COLOR**

#### **DEFINICIÓN CONCEPTUAL**

Impresión que produce en la vista la luz reflejada por un cuerpo. (62)

#### **DEFINICIÓN OPERACIONAL**

- **Naturaleza:** Cualitativa
- **Medición:** Directa
- **Escala:** Nominal
- **Procedimiento de medición:** Se toma una pequeña cantidad de muestra en un vaso de vidrio limpio y seco, se observa el color, se informa los resultados
- **Expresión final:** Conforme (color amarillo transparente) o No conforme (Diferente al color amarillo transparente)

## **B.1.2 OLOR**

### **DEFINICIÓN CONCEPTUAL**

El olor es la sensación resultante provocada por partículas aromáticas desprendidas de los cuerpos volátiles.(63)

### **DEFINICIÓN OPERACIONAL**

- **Naturaleza:** Cualitativa
- **Medición:** Directa
- **Escala:** Nominal
- **Instrumento de medición:** Ficha de recolección de datos
- **Procedimiento de medición:** Con una tira de papel se introdujo en la muestra, se determinó las características del olor.
- **Indicador:** Presencia de olor característico
- **Expresión final:** Conforme (olor característico) o No conforme (olor no característico)

## **B.1.3 ASPECTO**

### **DEFINICIÓN CONCEPTUAL**

Dicho de una sustancia o de una mezcla de varias, de compensación y estructura uniforme. (62)

- **Naturaleza:** Cualitativa
- **Medición:** Directa
- **Escala:** Nominal
- **Instrumento de medición:** Ficha de recolección de datos
- **Procedimiento de medición:** Se determina observando contra luz la presencia de partículas, modificaciones macroscópicas y/o turbidez.
- **Expresión final:** Conforme (No presenta modificaciones macroscópicas) o No conforme (presenta modificaciones macroscópicas)

## **B.2 PARÁMETROS FISICOQUÍMICOS**

### **DEFINICIÓN CONCEPTUAL**

Procedimiento que permite estudiar alteraciones en la estructura de la formulación que no son comúnmente perceptibles a simple vista haciendo énfasis en la determinación de sus propiedades. Permiten detectar futuros problemas que pueden afectar la estabilidad y la calidad del producto. (64)

## B.2.1 pH

### DEFINICIÓN CONCEPTUAL

EL pH es una medida de acidez o alcalinidad e indica la concentración de iones hidronio, presentes es determinadas sustancias. La determinación es medida directamente por electrodos inmersos en la muestra en estudio. Cuando este se encuentra fuera del rango, puede provocar alteraciones no favorables a la piel. (64)

### DEFINICIÓN OPERACIONAL

- **Naturaleza:** Cuantitativa
- **Medición:** Indirecta
- **Escala:** Razón
- **Instrumento:** pH – metro
- **Procedimiento de medición:** Ajustar el equipo con la solución reguladora de pH adecuado al rango en que se realizara la determinación. Posteriormente determínese el valor del pH directamente en la muestra.
- **Expresión final:** Valor del pH dentro del rango de referencia de 5-7. Conforme (dentro del rango) o No conforme (fuera del rango). (65)

## B.2.2 ESTABILIDAD

### DEFINICIÓN CONCEPTUAL

La estabilidad de un cosmético proporciona indicaciones sobre el comportamiento del producto, en un determinado intervalo de tiempo y frente a condiciones ambientales a las que pueda estar sujeto, desde la fabricación hasta su expiración. (64)

### DEFINICIÓN OPERACIONAL

- **Naturaleza:** Cuantitativa
- **Medición:** Indirecta
- **Escala:** Nominal
- **Instrumento de medición:** Estufa

- **Procedimiento de la medición:** Se mantuvieron en la estufa a 37 °C durante 30 días.
- **Expresión final:** Estable o Inestable

## **C. ACTIVIDAD ANTIMICOTICA DEL ESMALTE DE UÑAS ELABORADO CON EL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO.**

### **DEFINICIÓN CONCEPTUAL**

Es la capacidad del esmalte de uñas de producir una alteración tal de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped. (61)

### **C.1 DIAMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICOTICO**

Los halos de inhibición es la zona alrededor de un disco de antibióticos en un antibiograma en el que no se produce crecimiento micotico en una placa de agar inoculada con el germen. (66)

### **DEFINICIÓN OPERACIONAL**

- **Naturaleza:** Cuantitativa
- **Medición:** Directa
- **Escala:** Razón
- **Instrumento de medición:** Vernier
- **Procedimiento de medición:** Se mide los halos de inhibición del crecimiento fúngico producido por las diferentes concentraciones de aceite esencial y de quitosano.
- **Indicador:** Diámetro del halo de inhibición del crecimiento
- **Expresión final:** milímetros (mm)

### **C.2 CONTROL MICROBIOLÓGICO**

#### **DEFINICIÓN CONCEPTUAL**

Consiste en una inspección de sustancias en este caso del esmalte, por medio de pruebas que permiten detectar si se presentan o no elementos patógenos. de acuerdo con la cantidad de agentes patógenos encontrados y el grado de

contaminación que tengan las sustancias analizadas se puede determinar si es apta o no para su uso. Se realiza el recuento de Microorganismos mesófilos, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphyococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* (67)

#### **DEFINICIÓN OPERACIONAL**

- **Naturaleza:** Cualitativa
- **Medición:** Indirecta
- **Escala:** Nominal
- **Instrumento de medición:** Ficha de recolección
- **Procedimiento de medición:** Se sembró el esmalte de uñas en diferentes agares.
- **Expresión final:** Presencia (desarrollo microorganismos) o ausente (ausencia de desarrollo de microorganismos), Microorganismos mesófilos, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphyococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*

#### **3.4.2 VARIABLES NO IMPLICADAS**

##### **3.4.2.1 VARIABLES INTERVINIENTES**

###### ➤ **DEL HONGO**

Se tomó en cuenta

**Microorganismo:** Se trabajo con *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

**Medio de cultivo:** Para reactivar los microorganismos se utilizaron el Agar Dextrosa Sabouraud y el caldo BHI que se encontraban en buenas condiciones.

**Temperatura de crecimiento:** Se conservó el *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 a una temperatura de 26 °C entre 5 – 7 días.

###### ➤ **DE LA PLANTA DE ESTUDIO**

Se tomó en cuenta:

**Lugar de recolección:** Se realizó la recolección de la especie en estudio en la provincia de Andahuaylas en el departamento de Apurímac.

**Temporada de recolección:** la es especie *Origanum vulgare* L. (orégano) se recolecto en el mes de mayo.

**Partes de la planta a estudiar:** Se estudió las hojas del *Origanum vulgare* L.(orégano).

**Estadio de crecimiento:** Especies maduras

### **3.4.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN**

#### **A. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:**

##### **DE LA ESPECIE VEGETAL**

De la planta se tomaron hojas libres de hongos, ataques de plagas o aquellos que no presenten daños evidentes.

##### **DEL HONGO**

Se trabajó con cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, que se encontraron en buenas condiciones y libres de contaminantes.

#### **B. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

##### **DE LA ESPECIE VEGETAL**

Se excluyeron aquellas muestras que presentan algún deterioro o algún grado de contaminación y aquellos que estén expuestas a agroquímicos.

##### **DEL HONGO**

No se trabajaron con aquellas cepas que no estén en buenas condiciones o que no cumplan las características básicas de la cepa.

##### **DE LA FORMULACIÓN**

No se trabajó con las formulaciones que no pasen el control de calidad.

**TABLA 2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

VARIABLES	INDICADORES	SUB INDICADORES	NATURALEZA	MEDICIÓN				EXPRESIÓN FINAL DE LA VARIABLE
				FORMA	ESCALA	PROCEDIMIENTO	INSTRUMENTO	
INDEPENDIENTES	Concentración del aceite esencial de Origanum vulgare (orégano)	Volumen del aceite esencial de Origanum vulgare L. (orégano)	Cuantitativa	Directa	Proporción o razón	Se procedió a medir el volumen del aceite esencial de Origanum vulgare (orégano), para cada disco.	Micropipeta	Porcentaje (%) de aceite esencial de Origanum vulgare L.(orégano)
	Concentración del aceite esencial de Origanum vulgare l. (orégano) en el esmalte de uñas.	Volumen del aceite esencial Origanum vulgare L. (orégano)	Cuantitativa	Directa	Proporción o razón	Se procedió a medir el volumen del aceite esencial de Origanum vulgare L. (orégano) el cual se incluirán en la formulación y elaboración del esmalte de uñas.	Micropipeta	Porcentaje (%) del aceite esencial de Origanum vulgare L.(orégano).
DEPENDIENTE	Actividad antimicrobica del aceite esencial de Origanum vulgare (orégano) frente a cepas de Trichophyton rubrum.	Diámetro de halos de inhibición del crecimiento fungico	Cuantitativa	Directa	Proporción o razón	Se mide los halos de inhibición del crecimiento fúngico producido por las diferentes concentraciones del aceite esencial usando el vernier.	Vernier	Milímetros (mm)

Actividad antimicrobica del esmalte de uñas elaborado a base del aceite esencial de Origanum vulgare (orégano) frente a cepas de Trichophyton rubrum ATCC 28188	Diámetro de los halos de inhibición del crecimiento fúngico		Cuantitativa	Directa	Razón o proporción	Se mide los halos de inhibición del crecimiento fúngico producido por las diferentes concentraciones del aceite esencial usando el vernier.	Vernier	Milímetros
Evaluación del esmalte de uñas	Control microbiológico		Cualitativa	Indirecta	Nominal	Siembra del esmalte de uñas	Ficha de recolección	Presencia o ausencia de Microorganismos mesófilos, Pseudomona aeruginosa, Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Candida albicans
	Parámetros organolépticos	Color	Cualitativa	Directa	Nominal	Tomar una muestra en una placa de vidrio y observar el color	Ficha de recolección de datos	Conforme / no conforme
		Olor	Cualitativa	Directa	Nominal	Con una tira de papel introducir en la muestra determinar las características del olor	Ficha de recolección de datos	Característico / no característico
		Aspecto	Cualitativa	Directa	Nominal	Observación contra luz presencia de partículas o turbidez	Ficha de recolección de datos	Conforme/ no conforme
	PH		Cuantitativa	Indirecta	Razón	Determinar el valor del pH directamente de la muestra	pH -metro	Valor de pH dentro del valor de referencia

		Parámetros físicoquímicos	Estabilidad	Cualitativa	Directa	Nominal	Mantener el esmalte de uñas a 30 °C durante 30 días. Verter la muestra sobre una placa de vidrio de 1.5 y esperar el tiempo de recorrido de la medida. (68)		Estable / inestable
			Suavidad para fluir	Cuantitativa	Indirecta	Razón	Placas de vidrio de 2 pulgadas		Segundos

**Fuente:** Elaboración propia

**VARIABLES NO IMPLICADAS**

**TABLA 3. VARIABLES INTERVINIENTES**

<b>Variables intervinientes</b>	<b>Naturaleza</b>	<b>Forma de medición</b>	<b>Escala de medición</b>	<b>Expresión final</b>
<b>Característica del hongo</b> Medio de cultivo, temperatura de crecimiento	Cualitativo	Directa	Nominal	Cepas estándar de Trichophyton rubrum ATCC 28188.
<b>Característica de la planta</b> Estadio de crecimiento, lugar de recolección, temporada de recolección, parte usada (hojas)	Cualitativo	Directa	Nominal	Hojas sanas, libre de daños evidentes

**Fuente:** Elaboración propia

## METODOLOGÍA

### 3.5 DESARROLLO DE LA INVESTIGACIÓN

#### 3.5.1 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

La especie vegetal fue recolectada en bolsas de papel kraft, en la provincia de Andahuaylas que se encuentra ubicada a la altitud de 2836 m.s.n.m en el departamento de Apurímac, se recolectaron las hojas en buen estado y enteras el 30 de mayo del 2018.

#### 3.5.2 SELECCIÓN DE LA MUESTRA

Una vez obtenida las muestras se seleccionaron las hojas enteras, sanas libre de (hongos, manchas).

#### 3.5.3 SECADO DE LA MUESTRA

El secado de las hojas se realizó en un ambiente limpio, ventilado y a temperatura ambiente protegidos del sol, durante 2 meses.

#### 3.5.4 DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

La determinación de la humedad se realizó por triplicado en placas Petri con 5 gr de muestra, las mismas que fueron introducidas a la estufa a una temperatura de 105°C hasta peso constante.

Luego se determinó el porcentaje de humedad mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ de humedad} = \frac{M_1 - M_2}{M_1} \times 100$$

**Fórmula 1.**

**Donde:**

%H= porcentaje de humedad

M1= peso de la muestra fresca

M2= peso de muestra seca. (69)

### 3.5.5 EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL

#### 3.5.5.1 DESTILACIÓN POR ARRASTRE DE VAPOR:

La destilación por arrastre de vapor posibilita la purificación o el aislamiento de compuestos de punto de ebullición elevado mediante una destilación a baja temperatura (siempre inferior a 100 °C). Es una técnica de destilación muy útil para sustancias de punto de ebullición muy superior a 100°C y que descomponen antes o al alcanzar la temperatura de su punto de ebullición. (32)

#### Procedimiento:

1. Las hojas secas de orégano (1 kilogramo) fueron acondicionadas en el tanque del equipo de destilación.
2. Se procedió a la extracción del aceite esencial mediante el método de arrastre de vapor
3. Las hojas del orégano fueron sometidas a 1 hora de extracción por arrastre de vapor para la cual se usó el equipo de arrastre por vapor (destilador).
4. El aceite obtenido (8 mililitros) fue decantado y desecado con sulfato sódico anhídrido y almacenado a 4 °C
5. Se analizó sus características organolépticas, fisicoquímicas y se evaluó su efecto antimicótico.

#### 3.5.6 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

Las hojas de la muestra fueron sometidas a 1 hora de extracción por arrastre de vapor para la cual se usó el equipo de arrastre por vapor (destilador).

Se utilizó aproximadamente 1 kg de hojas secas de *Origanum vulgare L.* para cada hidrodestilación obteniéndose un promedio de 7.8 mL de aceite esencial. El porcentaje de rendimiento se calculó usando la siguiente formula.

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{volumen (mL)}}{\text{peso (gr)}} \times 100\%$$

Fórmula 2

**Donde:**

%R: Rendimiento expresado en porcentaje.

V: Volumen del aceite esencial extraído en mL.

P: Peso de la materia vegetal empleado en la destilación. (70)

**3.5.7 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD**

Para realizar las pruebas de solubilidad se tomó 1 mL del aceite esencial de orégano en diferentes tubos de ensayo y a cada uno de los tubos se le agrego 1 mL de solventes de diferentes polaridades.

**TABLA 4. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD**

<b>SOLVENTE</b>
Agua destilada
Metanol
Etanol al 40%
Etanol al 70%
Etanol al 90%
Etanol absoluto
Acetona
Acetato de etilo
Cloroformo
Dimetilsulfoxido
Benceno
Hexano

**SOLVENTES PARA LA PRUEBA DE SOLUBILIDAD**

**FUENTE:** Elaboración propia

### 3.5.8 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICOQUÍMICOS DEL ACEITE ESENCIAL

#### A. ANÁLISIS DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

- **ASPECTO:** Se analizó el aspecto externo mediante el análisis visual
- **COLOR:** Se tomó un tubo de ensayo limpio se llenó las  $\frac{3}{4}$  del tubo con el aceite esencial, observándose contraluz.
- **OLOR:** Se sumergió un papel secante de aproximadamente 1 cm de ancho y 10 cm de largo, se introdujo en un extremo de la muestra, luego se procedió a oler.
- **SABOR:** Se tomó una muestra significativa de aceite esencial y mediante el gusto se apreció que tipo de sabor presenta.

#### B. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL ACEITE ESENCIAL

El aceite esencial se mandó a analizar en el Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la UNSAAC. (Ver Anexo: 3)

##### 1. DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD

El principio en que se basa es la determinación de la masa de la unidad de volumen, expresado en g/mL, a una temperatura dada (20°C). Se determinó la densidad por el método del picnómetro de vidrio del 10 mL, un termómetro y una balanza analítica. (71)

##### 2. ÍNDICE DE REFRACCIÓN

El índice de refracción (n) de una sustancia dada es la relación entre la velocidad de un rayo de luz en el vacío y la velocidad de la luz a través de la sustancia. Por conveniente práctica se refiere a la relación aire sustancia.

Es importante para la identificación de sustancias y la detección de impurezas, y es medido mediante un refractómetro ABBE. (72)

### 3. ROTACIÓN ÓPTICA

Es la medida de rotación de plano de polarización de la luz, a una longitud de onda definida, al atravesar un espesor determinado de aceite esencial. La longitud de onda es generalmente aquella correspondiente a la línea del sodio. (72)

### 4. ÍNDICE DE SAPONIFICACIÓN

El índice de saponificación es el número de mg de hidróxido de sodio de potasio necesario para neutralizar los ácidos libres y saponificarlos esteres existentes en 1.0 g de la sustancia. (73)

### 5. ÍNDICE DE ACIDEZ

La acidez se expresa frecuentemente como el índice de acidez, que es el número de gramos mg de hidróxido de potasio necesario para neutralizar los ácidos libres en 1.0 g de la sustancia. (73)

#### 3.5.9 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN DEL ACEITE ESENCIAL POR CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROFOTOMETRÍA DE MASAS

El aceite esencial se mandó a analizar, en el Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la UNSAAC. mediante cromatografía de gases, en el cual se utilizó el siguiente procedimiento.

##### **Procedimiento:**

1. Se diluye el aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano) con el solvente N-heptano.
2. En una proporción de 100 microlitros de aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano) con 700 microlitros de N – heptano.
3. La dilución se inyecta al cromatógrafo de gases.
4. Se espera el tiempo necesario para la obtención de espectros (50 minutos).
5. Los espectros obtenidos se identifican con espectrofotometría de masas y comparación con bibliografía. (Ver Anexo 5)

### **3.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* L. (orégano), SOBRE *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, POR DIFUSION EN DISCO**

#### **3.6.1 ACTIVACIÓN DE CEPAS.**

1. Una vez obtenidas las cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 fueron sembrados en agar Sabouraud.
2. Estas fueron incubadas a 26 °C por 7 -14 días para comprobar su viabilidad
3. Luego se replicaron en placas de Agar Sabouraud y conservadas en refrigeración a 2-8 °C hasta su uso.

#### **3.6.2 PREPARACIÓN DEL INOCULO**

1. Las colonias de cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, fueron extraídos de la placa activada.
2. Se cubrió la placa con 5 mL de agua destilada estéril la superficie fue ligeramente raspada con un hisopo.
3. La combinación de conidios e hifas fueron filtradas a través de papel filtro estéril de 8 µm, se recolecto el inculo en un tubo de ensayo estéril.
4. Se ajustó la turbidez de acuerdo a la escala 0,5 de McFarland, ajustado a longitud de onda de 530 nm y transmitancia ajustada entre 68 – 70% en el espectrofotómetro. (74)

#### **3.6.3 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR**

Esta prueba se basó en la inhibición del crecimiento fúngico, mediante la difusión de las sustancias activas en un medio, que luego se evidenció por la formación de halos.

**Fundamento:** El método de disco en difusión consiste en depositar en la superficie de una placa de agar previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel filtro impregnados con las diferentes concentraciones del antimicótico o sustancias en estudio. Tan pronto el disco impregnado se pone en contacto con la superficie del agar, el filtro absorbe agua y el antimicótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurrido 7 a 14 días

de incubación en caso de antimicóticos, los discos pueden o no ser rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano. (75)

El método de difusión en agar fue utilizado para determinar la actividad antimicótica del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano) frente *Trichophyton rubrum ATCC 2818*, en el siguiente ensayo se utilizó como control negativo Dimetilsulfoxido (DMSO) y como control positivo la terbinafina

**TABLA 5. MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR SABOURAUD**

<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>HONGOS FILAMENTOSOS</b>
<b>Método</b>	Difusión en agar
<b>Control positivo</b>	Terbinafina
<b>Medio de cultivo</b>	Agar Sabouraud
<b>Temperatura</b>	7 días a 26 °C
<b>Punto de lectura</b>	Diámetro de halo de inhibición

#### **3.6.4 PREPARACIÓN DE LOS DISCOS DE SENSIBILIDAD**

Se realizó el estudio mediante la determinación de la actividad antimicótica por el método de Kirby - Bauer en cepas de *Trichophyton rubrum ATCC 28188*, sembrado en medio de cultivo Agar Sabouraud.

1. El aceite de *Origanum vulgare L.* fue diluido en Dimetilsulfoxido, con las siguientes concentraciones 12.5, 25, 50, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100%. Se prepararon 50 discos en blanco de 6 mm.
2. Se pesaron 3 mg de terbinafina (patrón) y se diluyo en 1 mL de metanol.
3. Estos fueron autoclavados para ser esterilizados

4. Luego son impregnados con las diferentes concentraciones de aceite y del patrón con los que se trabajó, se puso 5  $\mu\text{L}$  de concentración en cada cara del disco, con un total de 10  $\mu\text{L}$  por disco de concentración preparada.
5. Se secaron durante 7 horas a temperatura ambiente para luego ser colocados en la superficie del agar.

**TABLA 6. CONCENTRACIÓN DE LOS DISCOS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* L. (ORÉGANO)**

Concentración del aceite esencial (%)	Aceite esencial ( $\mu\text{L}$ )	Dimetilsulfoxido ( $\mu\text{L}$ ) (76)	$\mu\text{L}$ / disco
100	1000	0	10
95	950	50	10
90	900	100	10
85	850	150	10
80	800	200	10
75	750	250	10
70	700	300	10
50	500	500	10
25	250	750	10
12.5	125	875	10

### 3.6.5 INOCULACIÓN AL MEDIO DE CULTIVO

1. Una vez activo el inóculo de las cepas estándar dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, se rota el hisopo varias veces presionando sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso del inóculo.
2. Se inóculo la superficie de la placa de agar saboraud de manera que se obtuvo un crecimiento de la cepa, para lo cual se estría con el hisopo en forma paralela compacta abarcando toda la superficie de la misma, estriando con el hisopo en tres direcciones diferentes rotando la placa en 60 grados para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Se tuvo mucho cuidado en sembrar las placas de borde a borde, porque puede haber problemas en la realización de las lecturas. (77)
3. Antes de colocar los discos se deja secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.
4. Se procedió a colocar los discos estériles del papel de 6 mm de diámetro impregnados con las diferentes concentraciones del aceite esencial 12.5, 25,50,70,75,80,85,90,95 y 100%, presionando suavemente sobre cada disco para poder asegurar un contacto completo con la superficie del agar.
5. Se distribuyeron los discos uniformemente, de modo que estas estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro. No deben colocarse más de 12 discos en una placa de 150 mm, ni más de 6 en una placa de 100 mm de diámetro interno, para evitar la superposición de las zonas de inhibición. Un disco no debe ser removido una vez que tomo contacto con la superficie del agar debido a que algunas sustancias se difunden rápidamente.
6. Se colocaron 3 discos impregnados con el aceite esencial y el patrón terbinafina por placa.

## FLUJOGRAMA 1. INOCULACIÓN DEL *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 AL MEDIO DE CULTIVO

Una vez listo el inóculo de las cepas estándar se procedió a la siembra en las placas previamente esterilizadas y para lo cual se utilizó una asa descartable y mechero.



Se tomó una asada del inóculo y se procedió a sembrar sobre toda la superficie de la placa con agar Sabouraud, se tapó la placa y se dejó secar el inóculo unos 5 minutos a temperatura ambiente.



Se procedió a colocar los discos que contienen las diferentes concentraciones del aceite esencial diluido en dimetilsulfoxido (DMSO) con las siguientes concentraciones 12.5, 25, 50, 70, 75, 80, 85, 90, 95, y 100% con la ayuda de una pinza estéril, se incubaron a 26°C por 7 días.



Se repitió el ensayo 3 veces para cada prueba.



El antimicótico terbinafina se utilizó como patrón de comparación de la actividad antimicótica de las respectivas concentraciones del aceite esencial en estudio. Se incluyó el DMSO como blanco.



Para la lectura se midió el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento micótico expresados en mm.

**Fuente:** Elaboración propia

### 3.6.6 INCUBACIÓN

1. Se incubo las placas en posición invertida a 26 °C por 7 días, para evitar que el agua condensada caiga sobre el agar, lo cual cambiaría las condiciones del medio y no serviría para la lectura de los halos. (75)
2. El diámetro de la zona de inhibición fue medido en mm. El antimicótico terbinafina se utilizó como patrón de comparación, se repitió el ensayo tres veces.
3. El dimetilsulfoxido se utilizó como blanco, se repitió el ensayo tres veces.
4. Para la lectura se midió con un vernier el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento micótico expresado en mm.

### 3.6.7 LECTURA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN

Se midió los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando un vernier.

#### 3.6.7.1 CATEGORÍA DE INTERPRETACIÓN DE LAS PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

**Sensible:** si existe una buena probabilidad de éxito terapéutico en canso de un tratamiento a la dosis habitual.

**Resistente:** si la probabilidad de éxito terapéutico es nula o muy reducida. No es de esperar ningún efecto terapéutico sea cual fuere el tipo de tratamiento.

**Intermedio:** cuando el éxito terapéutico es imprevisible. Se puede conseguir efecto terapéutico en ciertas condiciones (fuertes concentraciones locales o aumento de la posología (78)

**TABLA 7. INTERPRETACIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN**

Nula	Diámetro inferior a 8 mm
Sensibilidad limite	Diámetro entre 9 a 14 mm
Sensibilidad media	Diámetro entre 15 y 19 mm
Sumamente sensible	Diámetro superior a 20 mm

**Fuente:** Herrera Hidalgo. 2004 (78)

### 3.6.8 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL ACEITE ESENCIAL

Esta prueba se realizó para determinar la concentración mínima inhibitoria para *Trichophyton rubrum*, por discos y el diámetro del halo de inhibición formado. Se usaron placas Petri estériles y se procedió a hacer la siembra.

**TABLA 8. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL ACEITE ESENCIAL**

La CMI corresponde a la mínima concentración de antifúngico en donde no se observa crecimiento de hongos, luego se debe recurrir a la tabla 7 para definir según los valores de CMI que en ellas aparecen si las cepas en estudio son sensibles o resistentes. En aquellos casos donde se observó inhibición, se tomaron alícuotas de 5 microlitros y se sembraron en medios específicos libres del agente antimicótico, agar Sabouraud dextrosa.

Espece	Complejo activo	Concentraciones del aceite esencial (%)	Número de placas para cada concentración
<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.	Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano)	12.5	3
		25	3
		50	3
		70	3
		75	3
		80	3
		85	3
		90	3
		95	3
		100	3

### 3.7 PREFORMULACIÓN DEL ESMALTE DE UÑAS

Se realizaron ensayos de preformulación para obtener el esmalte de uñas ideal, durante esta etapa se seleccionaron los excipientes que fueron compatibles con el aceite esencial y cumplieron con los requisitos establecidos.

Tomando en cuenta la CMI que en la prueba fue la concentración de 70% de aceite esencial, se procedió a formular las siguientes formulaciones con concentraciones de aceite al 70,75 y 80% de aceite esencial

**TABLA 9. PREFORMULACIONES DEL ESMALTE CON QUITOSANO AL 1% Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACEITE ESENCIAL 70,75 Y 80%.**

<b>Quitosano al 1%</b>	<b>70%</b>	<b>75%</b>	<b>80%</b>
Quitosano	100 mg	100 mg	100 mg
Ácido láctico	100 uL	100 uL	100 uL
Agua destilada	100 mL	100 mL	100 mL
Propilenglicol	125 µL	125 µL	125 µL
Isopropanol	1049 µL	1049 µL	1049 µL
Acetato de etilo	44 µL	44 µL	44 µL
Aceite esencial	700 µL	750 µL	700 µL

**Fuente:** Mailland, Federico. United States Patent, 2014. (79)

**TABLA 10. PREFORMULACIONES DEL ESMALTE DE QUITOSANO AL 2% Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DEL ACEITE ESENCIAL 70,75 Y 80%.**

Quitosano al 2%	70%	75%	80%
Quitosano	200 mg	200 mg	200 mg
Ácido láctico	100 µL	100 µL	100 µL
Agua destilada	100 mL	100 mL	100 mL
Propilenglicol	125 µL	125 µL	125 µL
Isopropanol	1049 µL	1049 µL	1049 µL
Acetato de etilo	44 µL	44 µL	44 µL
Aceite esencial	700 µL	750 µL	800 µL

**Fuente:** Mailland, Federico. United States Patent, 2014. (79)

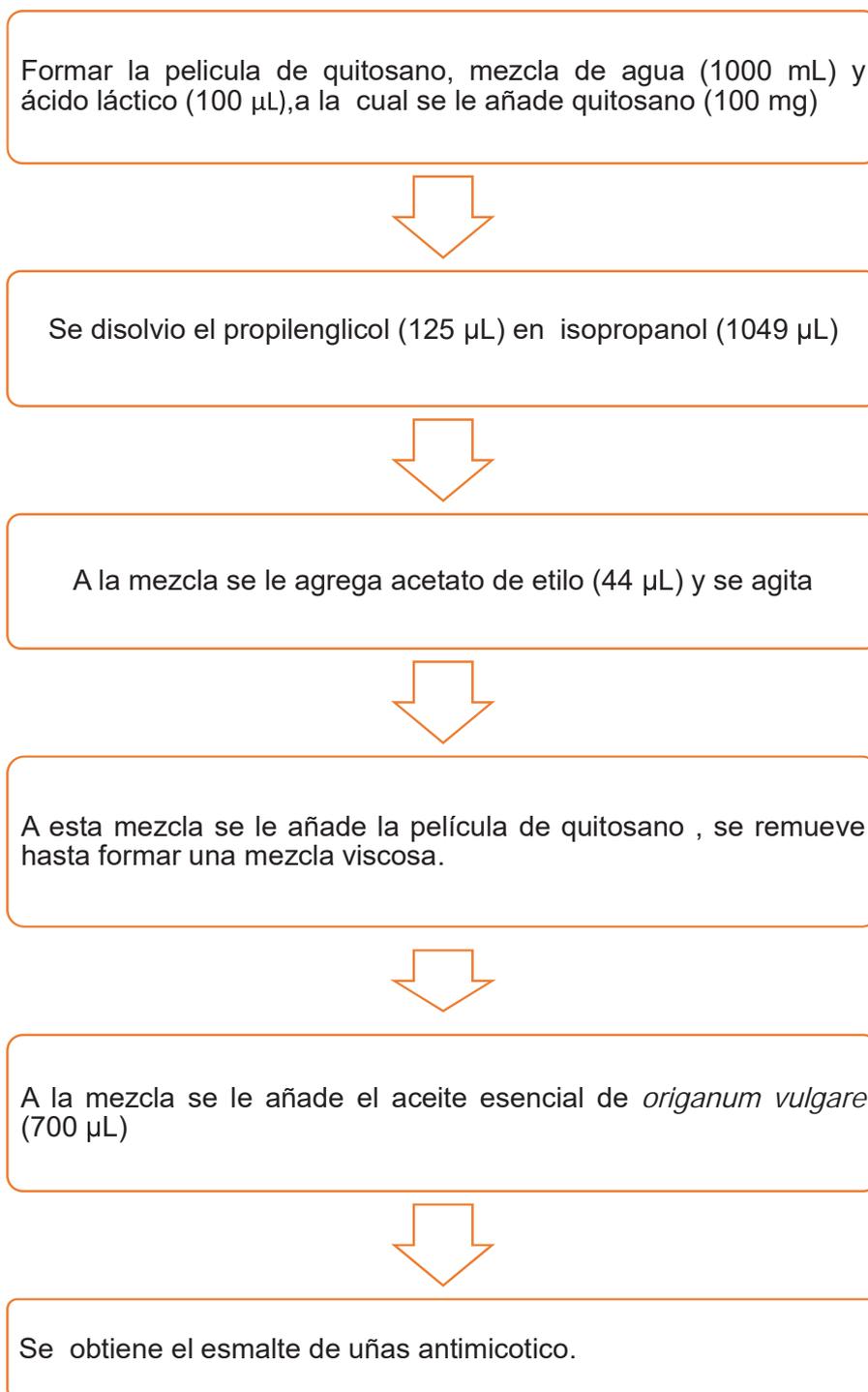
### 3.8 FORMULACIÓN DEL ESMALTE DE UÑAS

Se realizaron 6 preformulaciones, de las cuales se tomaron en cuenta 2 formulaciones, esmalte con aceite esencial al 70% y quitosano al 1% y el esmalte con aceite esencial al 70% y quitosano al 2%. Debido a que estas dos presentan mejores características fisicoquímicas y organolépticas

Se elaboró el esmalte de uñas con aceite esencial al 70% y quitosano al 1 y 2%.

1. Se formuló la película de quitosano, se mezcló agua (100 mL) y ácido láctico (10 µL), se le añadió quitosano (100 mg), se agito durante 12 horas.
2. Se disolvió el propilenglicol (125 µL) en el isopropanol (1049 µL)
3. A la mezcla se le agrego el acetato de etilo (44 µL) y se agito.
4. A esta mezcla se le añadió la película de quitosano, se removió hasta que se formó una mezcla viscosa y homogénea.
5. Se agregó el aceite esencial de orégano (700 µL)
6. Se obtiene el esmalte de uñas antimicótico en base al aceite esencial.

## FLUJOGRAMA 2. FORMULACIÓN DEL ESMALTE DE UÑAS



**Fuente:** Elaboración propia

### 3.9 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ESMALTE DE UÑAS

Para este caso también se determinó la actividad antimicótica por el método de difusión en agar.

1. Los discos de papel de 6 mm de diámetro fueron impregnados con el esmalte elaborado con las diferentes concentraciones de quitosano al 1 y 2% con 70% del aceite esencial, luego fueron colocados en la superficie del agar cultivado.
2. Los discos de papel también fueron impregnados con el esmalte antimicótico patrón de ácido undecilénico.
3. Luego fueron puestos en la superficie del agar cultivado e incubados a 26 °C por 7 días.
4. El esmalte antimicótico de ácido undecilénico se usó como patrón de comparación de la actividad antimicótica y el dimetilsulfoxido (DMSO) se incluyó como blanco.
5. El diámetro de la inhibición fue medido con ayuda de un vernier en mm, para cada prueba se realizaron 3 repeticiones. (80)

#### 3.9.1 EVALUACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICOS

1. **Olor:** No tiene que cambiar durante el periodo de vida media del esmalte en almacén.
2. **Color:** Homogéneo no tiene que cambiar durante el periodo de vida media del esmalte en almacén, ni presentar sedimentación
3. **Aspecto:** Debe conferir brillo a la uña, el cual no disminuirá ante la exposición a la luz solar, ni tampoco cuando las manos se sumerjan en soluciones alcalinas o detergentes. (19)

### **3.9.2 MODELO DE PENETRACIÓN DE UÑA**

El modelo de penetración de uña se hizo la prueba para aumentar la eficacia y mejorar la liberación del principio activo en la uña, con el uso del quitosano como potenciador de penetración de uñas.

1. Se realizaron discos de uñas de 6 mm. Se colocaron en la superficie de las placas de agar sembradas con inóculo de *Trichophyton rubrum*.
2. Luego se aplicó el esmalte en la superficie del disco de uña, las placas se incubaron durante 7 días a una temperatura de 26 °C y los halos de inhibición fueron medidos posteriormente. (81)

### **3.9.3 TIEMPO DE SECADO**

Se define la velocidad de secado como la pérdida de humedad del sólido húmedo por unidad de tiempo, operando en condiciones constantes de secado, es decir con aire a las condiciones de temperatura, presión, humedad y velocidad constantes en el tiempo.

1. Se aplicó una película de muestra en uñas con la ayuda de un pincel.
2. Se tomó el tiempo para formar una película seca al tacto. (82)

### **3.9.4 SUAVIDAD PARA FLUIR**

Aplicado al ámbito de la cosmetología se define como la capacidad del esmalte para soportar los cambios de forma que sufren los cuerpos donde son aplicados.

1. La muestra se vertió desde una altura de 1,5 pulgadas, en una placa de vidrio puesta verticalmente
2. Se tomó el tiempo que tardó en extenderse sobre la placa de vidrio (68)

### **3.9.5 DETERMINACIÓN DEL pH**

La medición del pH se llevó a cabo por medio de la lectura de pH en la escala medido de pH. Esta lectura está en función de la diferencia de potencial establecida entre un electrodo indicador y un electrodo de referencia usando

como solución de ajuste de la escala del medidor de pH una solución reguladora del mismo. El límite de aceptación será entre un rango de 5 – 8. (83)

### **3.9.6 ESTUDIO DE ESTABILIDAD**

Las muestras se almacenaron a una temperatura de 37 °C durante 1 mes. Se observaron que haya formación de fases, aparición de partículas extrañas, que mantenga el mismo olor, color y consistencia. (68).

### **3.9.7 CONTROL MICROBIOLÓGICO**

Para el control microbiológico se determinó los siguientes parámetros: aerobios totales (UFC/ g o mL), Hongos y Levaduras (UFC/ g o mL) y Microorganismos Especificos como *Pseudomonas spp* (UFC/ g o mL), *Salmonella spp.* (UFC/ g o mL), *Staphylococcus Aureus* (UFC/ g o mL) y *Escherichia coli* (UFC/ g o mL)

### **3.10 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS**

Se realizo la recolección de datos utilizando la técnica de observación mediante instrumentos como cámara fotográfica y fichas de recolección.

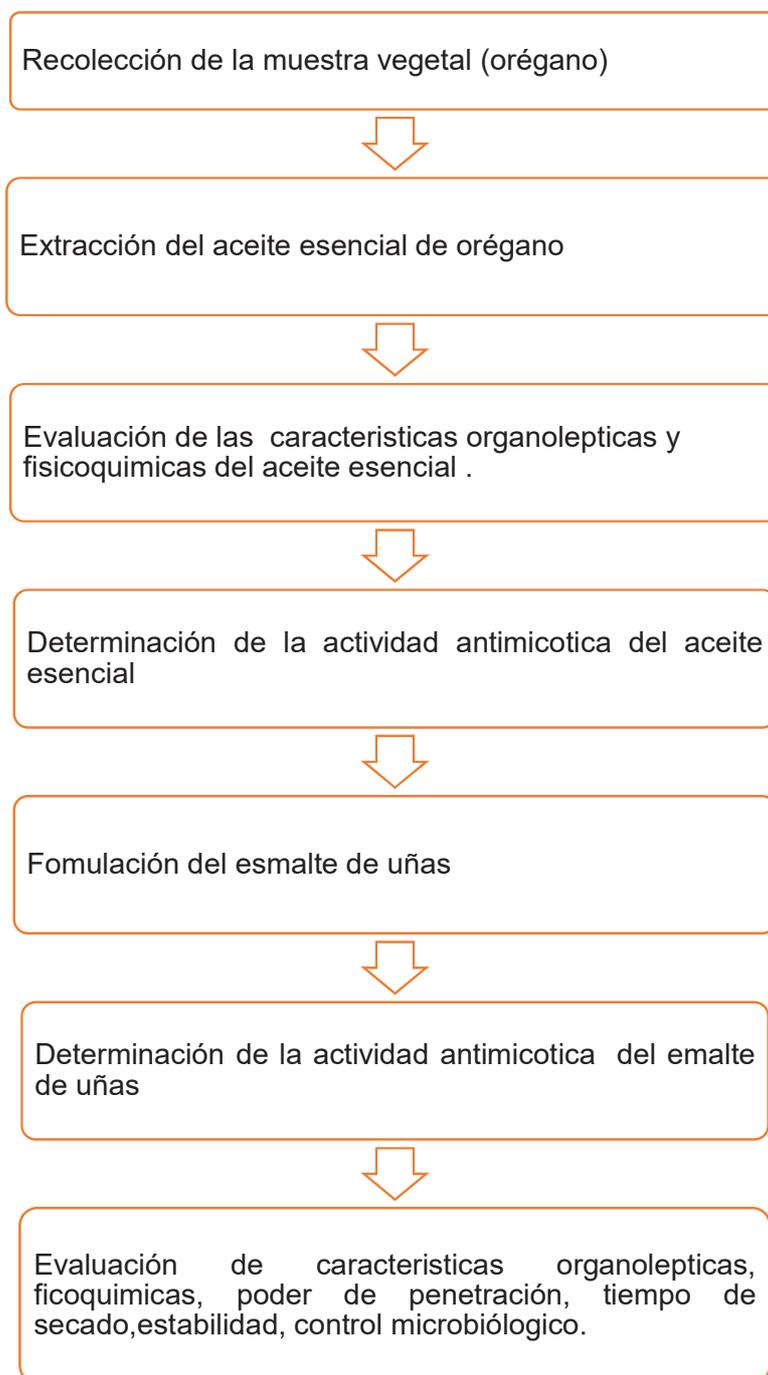
#### **INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

- Para la recolección de la especie vegetal (Anexo 8)
- Para la determinación del porcentaje de rendimiento (Anexo 9)
- Para determinar las características organolépticas del aceite (Anexo 10)
- Para las pruebas de solubilidad (Anexo 11)
- Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Anexo 12)
- Para el estudio de estabilidad fisicoquímicos y organolépticos (Anexo 13)

### **3.11 TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN**

Todos los datos se obtuvieron de la actividad antimicótica fueron procesados en una base de datos creada en el paquete estadístico Statistical Package For Social Sciencies (SPSS) versión 10.0.

### FLUJOGRAMA 3. PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN



**Fuente:** Elaboración propia

**CAPÍTULO IV**  
**ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

**4.1 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD *Origanum vulgare* L. (ORÉGANO)**

**CUADRO 1. PORCENTAJE DE HUMEDAD DE *Origanum vulgare* L. (ORÉGANO)**

MUESTRA	% HUMEDAD
M 1	74.46
M 2	73.4
M 3	73.46
PROMEDIO	73.77

**RESULTADOS E INTERPRETACIÓN**

En el cuadro 1, se observa el resultado de la evaluación del porcentaje de humedad, a una temperatura de 100 – 105°C durante 5 horas, el orégano presento un porcentaje de humedad de 73.77, la cual indica que tiene una gran cantidad de agua en sus tejidos esto representa un porcentaje alto de humedad lo cual hace que la planta sea propensa a contaminación por bacterias y hongos.

**ANÁLISIS Y DISCUSIÓN**

De acuerdo a este porcentaje se tomó las medidas necesarias para realizar el correcto proceso de secado de la especie vegetal y así evitar su contaminación, además de estabilizar los procesos enzimáticos y evitar la degradación de los metabolitos secundarios, se obtuvo una muestra adecuada para el estudio.

Los resultados obtenidos por Salamanca y Sánchez (2009) (25) obtuvieron un porcentaje de humedad de 63.72% y en comparación con nuestro dato 73.77%, esta diferencia se debe a la zona donde se cultivó la especie vegetal, época de recolección.

#### 4.2 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare L.* (ORÉGANO)

CUADRO 2.DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare l.* (ORÉGANO)

PESO DE HOJAS SECAS (gr)	ACEITE EXTRAÍDO (mL)	% DE RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL
960	8	0.83
950	7.9	0.83
940	7.8	0.82
930	7.7	0.82
920	7.6	0.82
<b>TOTAL</b>	<b>39 mL</b>	<b>PROMEDIO: 0.82</b>

#### RESULTADOS E INTEPRETACIÓN

De acuerdo a los datos obtenidos en cuadro 2 el porcentaje de rendimiento por arrastre de vapor de *Origanum vulgare L.* (orégano) fue de 0.82 %, esta determinación es importante porque permite calcular la cantidad de muestra necesaria para la obtención de aceite esencial y así determinar la cantidad necesaria de aceite esencial para las diferentes pruebas del trabajo de investigación.

#### ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos por Lachos y Laurente (2016) (15) obtuvieron un porcentaje de rendimiento de 0.80% de aceite esencial de *Origanum vulgare L.* y en comparación con nuestra investigación los datos fueron similares.

Según Villavicencio (2017) (16) obtuvo un porcentaje de rendimiento de 0.20% en comparación con nuestra investigación el rendimiento del aceite esencial fue de 0.82%, la cual fue superior. El rendimiento del aceite esencial podría variar según los factores climáticos, altitud de cultivo, tipo de suelo, época de recolección y método de extracción.

#### 4.3 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare L.*(orégano)

**CUADRO 3. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare L.* (ORÉGANO).**

CARACTERÍSTICAS	RESULTADOS	CONFORME / NO CONFORME
OLOR	Característico	Conforme
COLOR	Amarillo	Conforme
SABOR	Amargo	Conforme

**Fuente:** Elaboración propia

#### RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

De acuerdo al cuadro 3 el aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (Orégano), muestra un color característico amarillo, un olor característico de la planta, además tiene un sabor amargo. Por la presencia de los metabolitos reportados en la cromatografía de gases, como el Timol que provee un olor característico que está presente en el aceite esencial del orégano, el carvacrol que aportaría olor acre característico del orégano. (20)

#### 4.4 DETERMINACIÓN DE LA PRUEBA DE SOLUBILIDAD

**CUADRO 4. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare L.* (ORÉGANO)**

SOLVENTE	ACEITE ESENCIAL DE OREGANO
Agua destilada	-
Metanol	-
Etanol al 40 %	-
Etanol al 70 %	+
Etanol al 90 %	++
Etanol absoluto	+++
Acetona	+++
Acetato de etilo	+++
Cloroformo	+++
Dimetilsulfoxido	+++
Benceno	++
Hexano	++

**Fuente:** Elaboración propia

**Leyenda:**

Totalmente soluble : +++  
Parcialmente soluble : ++  
Muy poco soluble : +  
Insoluble : -

#### RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

De acuerdo al cuadro 4, se muestra los resultados de la prueba de solubilidad del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (Orégano) frente a solventes de diferente polaridad.

De acuerdo a los resultados obtenidos el aceite esencial de *Origanum vulgare L.* es totalmente soluble en solventes apolares como la acetona, acetato de etilo, cloroformo, dimetilsulfoxido y una completa insolubilidad en solventes polares como el metanol y agua. Esta prueba nos ayudó a reconocer el vehículo adecuado para desarrollo de la investigación se eligió el dimetilsulfoxido en la cual el aceite muestra mejor solubilidad además que habrá menos interferencia para la evaluación del efecto antimicótico.

#### 4.5 ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DEL ACEITE ESENCIAL

**CUADRO 5. PROPIEDADES FISICOQUÍMICOS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare L.* (ORÉGANO)**

Propiedades fisicoquímicas	Aceite esencial de <i>Origanum vulgare L.</i> (orégano)
Densidad	0.8454 g/mL
Índice de refracción	1.3872
Índice de saponificación	0.0102
Índice de acidez	0.8265 g
Rotación óptica	-0.542

**Fuente:** datos obtenidos en el Laboratorio de Química – UNSAAC (Ver anexo 6)

#### ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

En el cuadro 5, podemos observar las características fisicoquímicas de los aceites esencial estos caracterizan por sus propiedades fisicoquímicas, densidad, índice de refracción, índice de saponificación, índice de acidez, rotación óptica.

Para el *Origanum vulgare L.* (orégano) la densidad tuvo un valor de 0,8454, cual indica que comparado con la investigación realizada por Albado y Grabiél. (2001) (4) que es de 0.923, es menor esto está relacionado con una menor cantidad de fenoles. En cuanto al índice de refracción, el resultado fue de 1.387, lo que indica que las muestras están conformadas posiblemente por sustancias oxigenadas aromáticas o acíclicas. Además de encontrarse dentro de los valores normales del aceite comparado con la investigación realizado por (Albado y Grabiél. 2001) que es de 1.4774. (4)

Para el índice de saponificación se obtuvo el valor 0.0102 comparado con la investigación realizada por (Hernández y Martínez. 2016) (21) que fue de 0.071, lo que indica que las muestras están conformadas posiblemente por una mezcla de grupos esterés de mediano peso molecular. En cuanto al índice de acidez se obtuvo el valor 0.8265 y en comparación con la investigación de (Hernández y Martínez. 2016) que fue de 0.84. Es un referente para determinar el grado de enranciamiento (deterioro del aceite en contacto con el aire, humedad, temperatura y tiempo) (21).

La rotación óptica el valor que se obtuvo fue de -0,542 y comparado con el trabajo de investigación de Tapiero y Cuellar. (2016) (22) que fue de -0,400, lo que indica que la muestra de orégano está conformada por moléculas levóginas ya que rota la luz en dirección opuestas a las agujas del reloj. (22).

El aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano) se encuentra dentro de los rangos comparados con bibliografía, los resultados de la densidad, rotación óptica, índice de acidez, saponificación, acidez y refracción, permitirán en lo posterior caracterizar y analizar su control de calidad.

**4.6 DETERMINACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL POR CROMATOGRFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROFOTOMETRÍA DE MASAS**

**CUADRO 6. COMPOSICIÓN QUÍMICA CUANTITATIVA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare L.* (ORÉGANO)**

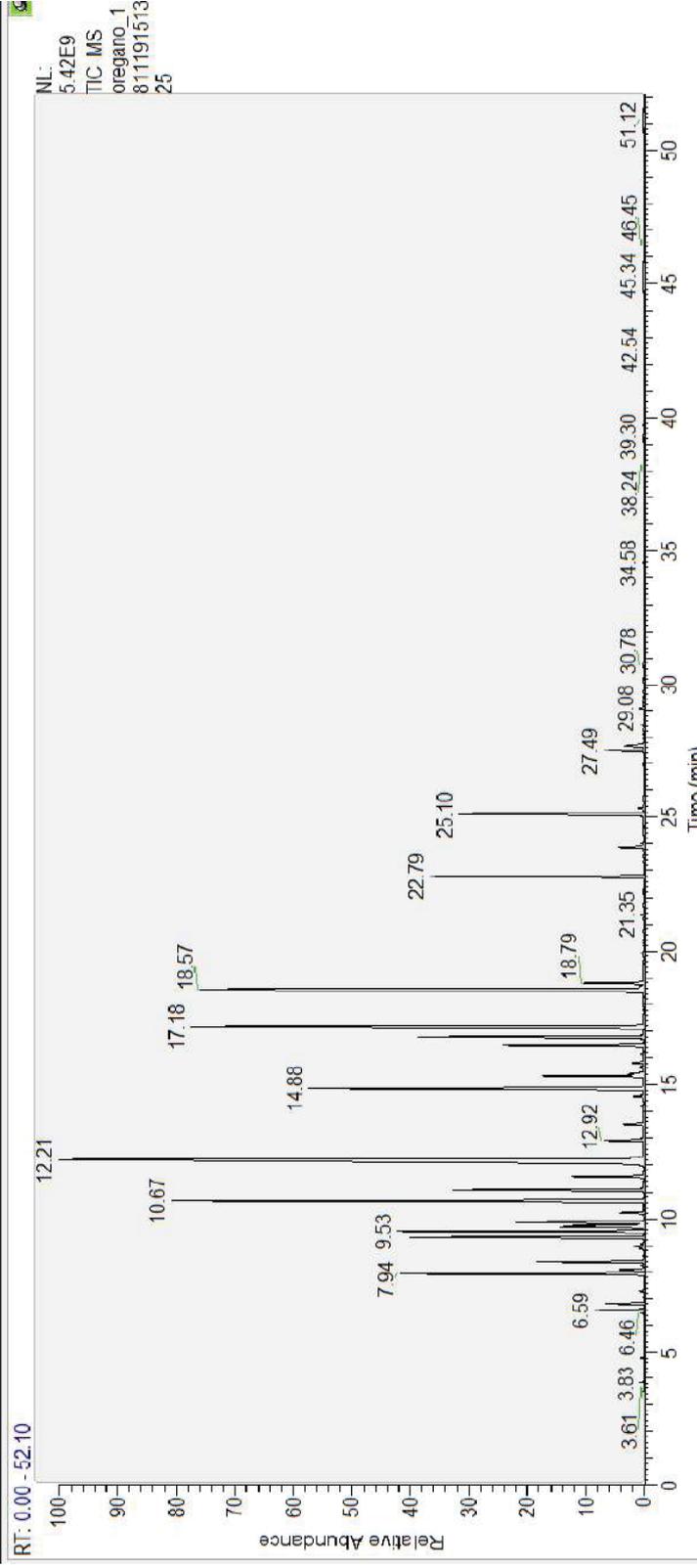
Nombre del compuesto	Área	Tiempo de retención	Área %
1-Isopropil-4-metilbicyclo [3.1.0] hex-2-eno	236322705.324	8.95	0.14
p-menth-1-en-3-ol,cis-	275385183.346	15.41	0.17
Borneol	296335248.782	14.55	0.18
p-Menth-1-en-3-ol,trans-	314061480.321	15.81	0.19
3-Careno	572362162.824	10.21	0.35
4-isopropil-1-metil-2-ciclohexen-1-ol	600037670.355	13.52	0.36
Oxido de cariofileno	666397476.419	27.66	0.4
α -Cariofileno	733363027.795	23.87	0.44
α -Pino	822596218.198	8.1	0.5
6,6-Dimetil-2-metilen-bicyclo [3.1.1] heptano	856604485.658	6.82	0.52
1-Isopropil-4-metilbicyclo [3.1.0] hex-2-eno	1025138712.786	6.59	0.62
4-isopropil-1-metil-2-ciclohexen-1-ol	1118373430.168	12.92	0.68
(-)-Espatuleno	1239190289.72	27.49	0.75
α-felandreno	1551316404.381	9.75	0.94
<b>Carvacrol</b>	1619800395.872	18.79	<b>0.98</b>
p-Mentha-1,4 (8) -dieno	1954828325.607	11.57	1.19
D-Limoneno	2057359547.11	9.7	1.25
β -Pino	2530319463.477	8.38	1.53
p-menth-1-en-8-ol	2839306816.955	15.33	1.72
6,6-Dimetil-2-metilen-bicyclo [3.1.1] heptano	3166488331.73	9.86	1.92

Terpineol, cis- $\alpha$	5419807146.594	11.08	3.29
o-Menth-8-eno, 4-isopropilideno-1-vinilo	5741560332.817	25.1	3.48
$\alpha$ -Terpineno	6089304999.537	9.3	3.69
$\alpha$ -felandreno	6151514884.119	7.94	3.73
Cariofileno	6371591726.395	22.79	3.86
2-isopropil-1-metoxi-4-metilbenceno	6540270858.374	16.79	3.97
o-Cimeno	6812690254.923	9.53	4.13
p-Menth-1-en-4-ol, (R) - (-)	11393561529.036	14.88	6.91
<b>c-Terpineno</b>	15211249753.349	10.67	<b>9.22</b>
<b>Ácido antranílico, 1,5-dimetil-1-vinil-4-hexenil éster</b>	15473820752.116	17.18	<b>9.38</b>
<b>Timol</b>	20417642557.516	18.57	<b>12.38</b>
<b>Terpineol, cis- <math>\alpha</math></b>	30442513278.331	12.21	<b>18.46</b>

**Fuente:** Datos obtenidos en el laboratorio de cromatografía de gases (UNSAAC)

oregano\_181119151325

11/19/18 15:15:12



**FUENTE:** Laboratorio de Cromatografía de la facultad de Ciencias de la UNSAAC

## RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

De acuerdo al cuadro 6, nos muestra los componentes del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. se observa que el Terpeneol, cis-a (18.46 %) es el componente mayoritario seguido del timol (12.38 %), Ácido antranílico, 1,5-dimetil-1-vinil-4-hexenil éster (9.38%) y c-Terpinen (9.22 %). a los que le podemos atribuir el efecto antimicótico (4)

Existen estudios sobre la composición del orégano, usando extractos acuosos y aceites esenciales. En *Origanum vulgare* se han encontrado componentes activos como: rosmarinico (planta y hoja), palmítico, esteárico, oleico(planta), taninos (planta) y vitaminas como la niacina y B –caroteno (planta), aceite esencial rico en timol, cimeno, carvacrol, borneol,limoneno, a terpineno (planta). Los compuestos mayoritarios encontrados en *Origanum vulgare* son el carvacrol, timol, c- terpinen. (84)

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Según (Acevedo, d. navarro, m. Monroy 2013), emplearon cromatografía de gases acoplada con espectrofotometría de masas e identificaron como compuesto mayoritario al timol con 67,51% seguido, p- cimeno con 11,66% c-terpineno con 5,51%, cariofileno 5,38% y eugenol con 1,32%.

En comparación con (Tellez y Nolazco 2017) identifico como componentes mayoritarios el terpineol (25,56%), timol (18,80%), c-terpineno (11,77%), cimeno (3,27%) y carvacrol (2,24%), sin embargo, se presentan algunas diferencias cuantitativas en su composición las que pueden ser debido a varios factores, época de recolección, el año, el método de extracción, condiciones de almacenamiento.

La composición química que presenta el aceite esencial de orégano pertenece al quimiotipo timol, este compuesto permite dar un valor agregado a esta planta por su alto porcentaje en masa que se convierte en posible fuente natural de este terpeno, y que le otorga propiedades antioxidantes, microbiológicas, antimicóticas y conservantes de alimentos. (85).

#### 4.7 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL FRENTE A *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

##### 4.7.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DEL ACEITE ESENCIAL

CUADRO 7. LECTURA DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN OBTENIDOS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* L. (ORÉGANO) FRENTE A *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

CONCENTRACIÓN	DIÁMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm)			
	I	II	III	PROMEDIO
ACEITE ESENCIAL ORÉGANO (%)				
TERBINAFINA	20.73	20.83	20.98	20.84
100	13.50	13.78	13.67	13.65
95	13.53	13.51	13.57	13.53
90	12.38	12.04	11.97	12.13
85	12.27	11.64	11.51	11.80
80	9.97	10.17	10.67	10.27
75	9.70	10.42	9.94	10.02
70	9.58	9.85	9.83	9.75
50	6.00	6.00	6.00	6.00
25	6.00	6.00	6.00	6.00
12.5	6.00	6.00	6.00	6.00
DIMETILSULFÓXIDO	6.00	6.00	6.00	6.00

#### RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

En el cuadro 7, muestra los resultados de los halos de inhibición donde la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) es de 70% con 9.75 mm de halo de inhibición y la concentración máxima es de 100% con 13.65 mm de halo de inhibición frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Se analizó también el dimetilsulfoxido utilizado para solubilizar el aceite, este no presento actividad antimicótica por lo cual no altera los resultados.

Con respecto al patrón utilizado estudios indican que la terbinafina es un potente antimicótico, se comprobó la eficacia in vitro frente a cepas *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

Según el estudio realizado por Maravi (2012) (13), empleando el método de difusión en disco , concluyendo que *Origanum vulgare* L.(orégano) al 100% alcanzo un mayor efecto antimicótico (56.25 mm) en comparación con su control nistatina (13,21 mm), seguido de la concentración al 70% (23,67 mm), contrariamente a lo esperado en este estudio del aceite esencial al 100% se obtuvo un halo inhibitorio promedio (13.65 mm), mientras que a la concentración de 70% se obtuvo un halo promedio (9.75 mm) . Esto posiblemente se deba a la diferencia de piso, debido a que esta planta es proveniente de Apurímac (2836 msnm) mientras que este ensayo provenía de Lima (500 msnm). Además, según Arcilla y Loarca (2012) (20), la composición, cantidad y calidad de los metabolitos químicos en el aceite esencial depende de ciertos factores tales como, condiciones climáticas, la como altitud.

**CUADRO 8. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE Origanum vulgare L. (ORÉGANO) FRENTE A Trichophyton rubrum ATCC 28188.**

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
100 %	3	13,6500	,14107	,08145	13,2996	14,0004	13,50	13,78
95 %	3	13,5367	,03055	,01764	13,4608	13,6126	13,51	13,57
90 %	3	12,1300	,21932	,12662	11,5852	12,6748	11,97	12,38
85 %	3	11,8067	,40649	,23469	10,7969	12,8164	11,51	12,27
80 %	3	10,2700	,36056	,20817	9,3743	11,1657	9,97	10,67
75 %	3	10,0200	,36661	,21166	9,1093	10,9307	9,70	10,42
70 %	3	9,7533	,15044	,08686	9,3796	10,1271	9,58	9,85
50 %	3	6,0000	,00000	,00000	6,0000	6,0000	6,00	6,00
25 %	3	6,0000	,00000	,00000	6,0000	6,0000	6,00	6,00
12,5 %	3	6,0000	,00000	,00000	6,0000	6,0000	6,00	6,00
Terbinafina	3	20,8467	,12583	,07265	20,5341	21,1592	20,73	20,98
Dimetilsulfóxido	3	6,0000	,00000	,00000	6,0000	6,0000	6,00	6,00
Total	36	10,5011	4,27043	,71174	9,0562	11,9460	6,00	20,98

## RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

En el cuadro 8, se observan los resultados descriptivos de los halos de inhibición de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Origanum vulgare L.*, a las concentraciones de 12.5%, 25% y 50% no se evidencio efecto inhibitorio, a 70% presento el mínimo valor (9.7533 mm), siendo mayor el halo de inhibición a la concentración del 100% con (13.6500 mm).

La terbinafina presento un halo de inhibición de (20.846 mm) este es mayor en comparación al halo de inhibición de 100% de *Origanum vulgare L.* lo que indica que el fármaco patrón tiene mayor actividad antimicótica.

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Según el estudio de Lachos y Laurente 2018, “Efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de *Origanum vulgare* frente a cepas de *Trichophyton rubrum*”, el aceite esencial fue extraído por el método de destilación por arrastre de vapor, utilizando el método de dilución en medio liquido se determinó la concentración mínima inhibitoria que fue de 0.25%, determinaron el efecto antimicótico del orégano en sus resultados la concentración mínima fue de 0.25% ,concluyeron que el aceite esencial de orégano presenta actividad antimicótica frente a *Trichophyton rubrum*.

Según el estudio de Mamani. 2016, evaluó el efecto antimicótico del aceite esencial de orégano frente a levaduras de *Candida albicans ATTC 6538*, determino la sensibilidad antimicótica del aceite esencial de orégano por el método de difusión en discos siendo para *Candida albicans*, el mayor promedio de halo inhibición a la concentración de 1,75 mg/ml con 56,08 mm de diámetro y el menor promedio de halo de inhibición fue a la concentración de 0,5 mg/ml con 24,65 mm de diámetro.

Determinó la concentración mínima inhibitoria por el método de dilución en medio liquido con el aceite esencial cuya concentración fue de 0,8053 mg/ml, se demostró que la *Candida albicans* tiene sensibilidad frente al aceite esencial de orégano.

**CUADRO 9. ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare L.* (ORÉGANO) FRENTE A *Trichophyton rubrum ATCC 28188*.**

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	637,207	11	57,928	1294,399	,000
Dentro de grupos	1,074	24	,045		
Total	638,281	35			

**Fuente:** Datos estadísticos

**Leyenda;**

GL : Grados de libertad

F : Estadístico de prueba

Sig : Significancia

Sig  $\leq$  0,05, existe diferencia entre los halos de inhibición

Sig  $\geq$  0,05, no existe diferencia entre los halos de inhibición

**RESULTADOS E INTERPRETACIÓN**

En el análisis de varianza (ANOVA), del cuadro 9, se observa que el valor de significancia es de 0,000, valor que está debajo de 0.05, con lo cual se pudo afirmar que existe diferencia significativa entre los halos de inhibición formados por el aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano).

Como el ANOVA dio diferencias significativas para las concentraciones, se realizó el análisis mediante la prueba de TUKEY

**CUADRO 10. PRUEBA DE TUKEY PARA ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare L.* (ORÉGANO) FRENTE A *Trichophyton rubrum ATCC 28188*.**

Concentración del aceite (%)	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
50	3	6,0000				
25	3	6,0000				
12,5	3	6,0000				
Dimetilsulfoxido	3	6,0000				
70	3		9,7533			
75	3		10,0200			
80	3		10,2700			
85	3			11,8067		
90	3			12,1300		
95	3				13,5367	
100	3				13,6500	
Terbinafina	3					20,8467
Sig.		1,000	0,172	0,764	1,000	1,000

**Fuente:** Datos estadísticos

**Leyenda:**

Sig: Significancia

**RESULTADOS E INTERPRETACIÓN**

En el cuadro 10 se puede observar la prueba de significación de Tukey al 95% de confiabilidad se puede apreciar que se obtuvieron 5 subconjuntos al comparar las medias de los halos de inhibición en el quinto subconjunto se observa el valor máximo de halo de inhibición, correspondiente de 20.8467 mm de la terbinafina, seguido del halo de inhibición de 13.6500 mm del aceite esencial de orégano al 100% en el cuarto subconjunto.

**ANÁLISIS Y DISCUSIÓN**

El análisis estadístico ANOVA fue significativo (0.000), en relación a los datos obtenidos, indicando que el aceite esencial de *Origanum vulgare L.* sí tuvo efecto antimicótico, pero que no supera a la terbinafina. Esto se ve corroborado por la prueba Post ANOVA de Tukey, el cuadro 10 demuestra que son homogéneos,

que, a mayor concentración de aceite esencial aumenta el halo de inhibición y que la terbinafina tiene mayor efecto antimicótico sobre *Trichophyton rubrum*.

Se concluye que el aceite esencial de *Origanum vulgare L.*(orégano), si tiene efecto antimicótico sobre *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, pero menor que la terbinafina.

Según el estudio de Villavicencio (2016) (16). Evaluaron el efecto antimicótico efecto antimicótico del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano) frente a cepas de *Candida albicans*. Se determinó por el método de difusión en agar en la cual se observó que *Candida albicans*, a la concentración de aceite esencial al 100% formo un halo de inhibición de (24,864 mm), 50 % (16.713 mm), 25% (11,432 mm) y 12,5% (8,002 mm) respectivamente, a medida que se incrementa el porcentaje de aceite esencial aumentan los halos de inhibición.

Se debe tener en cuenta que las diferencias encontradas en los resultados con los antecedentes y nuestra investigación, puede estar condicionado por el medio ambiente en el que se desarrolló el cultivo de la planta, temperatura, altitud.

Ciertas condiciones mencionadas, determinan en las plantas la concentración de minerales, micronutrientes, lo que explicaría la diferencia en los halos de inhibición en los diferentes estudios.

#### 4.8 FORMULACIONES DEL ESMALTE DE UÑAS ELABORADO A BASE DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO

**CUADRO 11. FORMULACIÓN DEL ESMALTE DE UÑAS CON QUITOSANO AL 1% Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACEITE ESENCIAL 70,75 Y 80%.**

QUITOSANO AL 1 %	CONCENTRACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL		
	70%	75%	80%
Quitosano	100 mg	100 mg	100 mg
Ácido láctico	100 uL	100 uL	100 uL
Agua destilada	10 mL	10 mL	10 mL
Propilenglicol	125 µL	125 µL	125 µL
Isopropanol	1049 µL	1049 µL	1049 µL
Acetato de etilo	44 µL	44 µL	44 µL
Aceite esencial	700 µL	750 µL	800 µL
Dimetilsulfoxido	300 µL	250 µL	200 µL

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Para las siguientes formulaciones se optó por hacer una película con ácido láctico, agua destilada y quitosano al 1 %, la cual se agitó durante 12 horas. A la cual se le añadió el esmalte conteniendo aceite esencial a diferentes concentraciones.

Se realizó un esmalte base de acuerdo a lo realizado por Mailland (86)

Se evaluaron las características organolépticas y fisicoquímicas y en cuanto al estudio de estabilidad se sometieron a agitación.

Para la concentración al 70 %, el esmalte al ser agitado posee una textura y color homogéneo, no presento separación de fases, y no se tornó lechoso.

Para la concentración del 75 % el esmalte al ser agitado, se tornó lechoso debido a la cual se descartó la formulación.

Para la concentración al 80% el esmalte al ser agitado, se tornó lechoso y hubo separación de fases debido a la cual se descartó la formulación.

Se tomó la formulación de 70% ya que al ser agitada presentó aspecto homogéneo, olor característico del aceite esencial, color amarillo transparente, consistencia viscosa y textura suave.

### CUADRO 12. FORMULACIÓN DEL ESMALTE DE UÑAS CON QUITOSANO AL 2% Y DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ACEITE ESENCIAL 70,75 Y 80%.

QUITOSANO AL 2%	CONCENTRACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL		
	70%	75%	80%
Quitosano	100 mg	100 mg	100 mg
Ácido láctico	100 uL	100 uL	100 uL
Agua destilada	10 mL	10 mL	10 mL
Propilenglicol	125 µL	125 µL	125 µL
Isopropanol	1049 µL	1049 µL	1049 µL
Acetato de etilo	44 µL	44 µL	44 µL
Aceite esencial	700 µL	750 µL	800 µL
Dimetilsulfoxido	300 µL	250 µL	200 µL

## **ANÁLISIS Y DISCUSIÓN**

Para las siguientes formulaciones se optó por hacer una película con ácido láctico, agua destilada y quitosano al 2 % la cual se agitó durante 12 horas. A la cual se añadió el esmalte conteniendo aceite esencial a diferentes concentraciones. Se evaluaron las características organolépticas y fisicoquímicas y en cuanto al estudio de estabilidad se sometieron a agitación.

Para la concentración al 70 %, el esmalte al ser agitado posee una textura y color homogéneo, no presento separación de fases, y no se tornó lechoso.

Para la concentración del 75 % el esmalte al ser agitado se tornó lechoso debido a la cual se descartó la formulación.

Para la concentración al 80% el esmalte al ser agitado se tornó lechoso y hubo separación de fases debido a la cual se descartó la formulación.

El cambio en las características organolépticas en las concentraciones de aceite al 75 y 80 % se debió a la concentración de aceite esencial utilizado en la formulación del esmalte, a la concentración de 75% primeramente se tornaba lechoso, a mayor concentración 85% se tornaba lechoso con separación de fases.

### **CUADRO 13. FORMULACIÓN DEL ESMALTE AL 1% Y 2% DE QUITOSANO CON ACEITE ESENCIAL AL 70%.**

De acuerdo a los ensayos de preformulación se seleccionaron los esmaltes al 1% y 2% de quitosano con aceite esencial al 70%. Debido a que estas dos formulaciones presentan mejores características organolépticas, no se tornan lechosos al añadir el aceite esencial al esmalte base y tampoco presentan separación de fases.

<b>ESMALTE 1% DE QUITOSANO</b>	<b>FORMULACIÓN AL 70 % DE ACEITE ESENCIAL</b>
Propilenglicol	125 µL
Isopropanol	1049 µL
Acetato de etilo	44 µL
Aceite esencial	700 µL
Agua destilada	10000 µL
Ácido láctico	100 µL
Quitosano	100 mg
<b>ESMALTE 2% DE QUITOSANO</b>	<b>FORMULACIÓN AL 70 % DE ACEITE ESENCIAL</b>
Propilenglicol	125 µL
Isopropanol	1049 µL
Acetato de etilo	44 µL
Aceite esencial	700 µL
Agua destilada	10000 µL
Ácido láctico	100 µL
Quitosano	200 mg

## **RESULTADOS E INTERPRETACIÓN**

Se formularon 2 esmaltes a diferente concentración de quitosano 1 y 2% con concentración de aceite esencial al 70%.

De acuerdo a las pruebas de estabilidad se almacenó las 2 formulaciones durante 30 días a temperatura ambiente, se observó que las formulaciones conservaban sus propiedades organolépticas.

Se obtuvieron formulaciones con olor a orégano, color amarillo transparente, con una buena apariencia, no hubo separación de fases, tampoco se tornó lechoso.

**CUADRO 14. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS Y FISICOQUÍMICAS DE LAS FORMULACIONES**

		FORMULACIONES						
Características organolépticas y fisicoquímicas	1% de quitosano 70 % de aceite esencial	1% quitosano 75% de aceite esencial	1% quitosano 80% de aceite esencial	2% quitosano 70% de aceite esencial	2% quitosano 75% de aceite esencial	2% quitosano 80% de aceite esencial	2% quitosano 80% de aceite esencial	Esmalte de ácido Undecilénico
	Color	Amarillo transparente	Lechoso	Lechoso, separación de fases	Amarillo transparente	Lechoso	Lechoso, separación de fases	Trasparente
	Olor	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico	Característico de acetona
	Aspecto	Semilíquido homogéneo	Semilíquido	semilíquido	Semilíquido homogéneo	semilíquido	Semilíquido	Semilíquido
	pH	6	5.5	5	6	5	5	6
	Estabilidad	Sin sedimentación, sin separación de fases	Sedimentación, se tornó lechoso	Sedimentación, se tornó lechoso con separación de fases	Sin sedimentación, sin separación de fases	Sedimentación, se tornó lechoso	Sedimentación, se tornó lechoso	Sin sedimentación, Sin separación de fases

## RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos se eligieron las formulaciones de quitosano al 1 % y 2% con concentración de 70% de aceite esencial debido a que estos presentan mejores características organolépticas y fisicoquímicas en comparación con el resto de formulaciones.

De acuerdo al cuadro las formulaciones elegidas presentan aspecto homogéneo, color amarillo transparente, olor característico del aceite esencial.

La evaluación de las características organolépticas se realizó por medio del análisis sensorial comparando con la muestra patrón con los esmaltes formulados, la cual fue almacenada a temperatura ambiente protegida de la luz

El pH (ligeramente ácido 6) obtenido de ambas formulaciones permite la seguridad de uso al no comprometer la integridad de las uñas. Al mismo tiempo se encuentran dentro del rango permitido por la USP 25 que es de 5,5 – 7.

Para el estudio de estabilidad se sugiere considerar las condiciones climáticas donde será almacenado el producto. En referente a las pruebas de estabilidad se almacenaron las 2 formulaciones a temperatura de 30 °C +- 2°C y humedad de 75% +-5% durante 30 días se observó que conservaba sus características organolépticas, sin sedimentación y tampoco separación de fases. Se realizaron los estudios de estabilidad del esmalte de uñas, llevadas a cabo según las directrices de la International Conference on Harmonisation (ICH). (87)

Concluida la investigación las 2 formulaciones continúan conservando su homogeneidad y todas las características mencionadas.

#### 4.9 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DE LA FORMA COSMÉTICA ELABORADA

**CUADRO 15. LECTURA DE HALOS DE INHIBICIÓN OBTENIDOS DEL ESMALTE DE UÑAS DE ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare L.* (ORÉGANO) FRENTE A *Trichophyton rubrum ATCC 28188*.**

CONCENTRACIÓN DEL QUITOSANO	CONCENTRACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL	HALOS DE INHIBICIÓN			
		I	II	III	PROMEDIO
QUITOSANO AL 1%	70 %	11.03	12.02	11.45	11.50
QUITOSANO AL 2%	70 %	12.30	12.94	12.41	12.55
ESMALTE DE ÁCIDO UNDECILÉNICO		15.01	15.40	15.17	15.19

#### RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

Después de evaluar las características organolépticas y fisicoquímicos se realizó las lecturas de halos de inhibición de las formulaciones

En el cuadro 15, se observa los halos de medición de las 2 formulaciones del esmalte, se observa que la medida del halo de inhibición que corresponde al patrón esmalte de ácido undecilénico es mayor en comparación a las diferentes concentraciones del esmalte con aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano).

Es así que para el quitosano al 1% se obtuvo un halo promedio de (11.50 mm), para el quitosano al 2% se obtuvo (12.55 mm), para el patrón se obtuvo un halo promedio de (15.19 mm)

De acuerdo al cuadro se observa que el halo de inhibición del esmalte al 2 % de quitosano con una concentración del aceite al 70 % se encuentra más próximo al esmalte de ácido undecilénico usado como patrón.

Para la formulación final se eligió el esmalte de quitosano al 2% con aceite esencial al 70% debido a que tiene mayor formación de diámetro de halos en comparación al esmalte 1% de quitosano formulado, también por que presento mejores características organolépticos y fisicoquímicos.

**CUADRO 16. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL ESMALTE DE UÑAS DE ACEITE ESENCIAL DE Origanum vulgare L. (ORÉGANO) FRENTE A Trichophyton rubrum ATCC 28188**

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Quitosano al 1% con 70 % de aceite	3	11,5000	,49689	,28688	10,2657	12,7343	11,03	12,02
Quitosano al 2% con 70 % de aceite	3	12,5500	,34220	,19757	11,6999	13,4001	12,30	12,94
Esmalte de ácido undecilénico	3	15,1933	,19604	,11319	14,7063	15,6803	15,01	15,40
Total	9	13,0811	1,67837	,55946	11,7910	14,3712	11,03	15,40

**Fuente:** Datos estadísticos

## ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En el cuadro 16 se observan los resultados descriptivos de los halos de inhibición de la actividad antimicótica del esmalte aceite esencial de *Origanum vulgare L.*, a la concentración de los esmaltes de quitosano al 1% con 70% de aceite esencial y quitosano al 2% con 70% de aceite esencial presentaron halos de inhibición de (11.5000 mm) y (12.550 mm) respectivamente y el esmalte control de ácido undecilénico tuvo un halo de inhibición de (20.8467 mm), frente a cepas *Trichophyton rubrum ATCC 28188*.

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Según el estudio de Alva (2018) (17) evaluó el efecto antimicótico del aceite esencial de *Origanum vulgare* “orégano” sobre *Cándida albicans ATCC 10231*, comparado con metronidazol, estudio in vitro. Se realizaron cuatro diluciones (100%, 75%, 50% y 25%), mostró halos de inhibición a partir de la dilución al 75% (11.10 mm), mayor fue el halo de inhibición a la concentración del 100% (14.50 mm), el grupo control de metronidazol, tuvo un halo de inhibición de (25.90 mm).

Los resultados obtenidos demuestran que el *Trichophyton rubrum* es sensible a los dos esmaltes de uñas, sin embargo, existieron diferencias entre los diámetros de los halos inhibición por lo cual se eligió el esmalte de quitosano al 2% con 70% aceite esencial ya que este tiene mayor halo de inhibición (12.550 mm) de diámetro.

### CUADRO 17. ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA DEL ESMALTE DE UÑAS DE ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare L.* (ORÉGANO) FRENTE A *Trichophyton rubrum ATCC 20188*.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	21,730	2	10,865	80,996	,000
Dentro de grupos	,805	6	,134		
Total	22,535	8			

Fuente: Datos estadísticos

#### Leyenda;

GL : grados de libertad

F : Estadístico de prueba

Sig : Significancia

Sig  $\leq$  0.05, existe diferencia entre los halos de inhibición

Sig  $\geq$  0.05, no existe diferencia entre los halos de inhibición

En el análisis de varianza (ANOVA), del cuadro 17 se observa que el valor de significancia es de 0,000, un valor que está por debajo 0.05 con lo cual se pudo afirmar que existió una diferencia significativa entre los halos de inhibición formados por los esmaltes formulados a diferente concentración, por lo que se concluye que el esmalte de aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano) presenta diferente actividad inhibitoria para cada concentración.

Como el ANOVA dio diferencias significativas para las concentraciones, se realizó el análisis mediante la prueba de TUKEY.

**CUADRO 18. PRUEBA DE TUKEY PARA EL ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ESMALTE DE UÑAS DE ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare L.* (ORÉGANO) FRENTE A *Trichophyton rubrum ATCC 28188.***

Concentración del aceite	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Quitosano al 1% con 70 % de aceite	3	11,5000		
Quitosano al 2% con 70 % de aceite	3		12,5500	
Esmalte de ácido undecilénico	3			15,1933
Sig.		1,000	1,000	1,000

Fuente: Datos estadísticos

## RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

Según el cuadro 18, se observa tres subconjuntos al comparar las medias de los halos de inhibición, en el tercer subconjunto se observa el valor máximo de halo de inhibición de 15.1933 mm, correspondiente al patrón esmalte de ácido undecilénico, en el segundo subconjunto se observa el esmalte elaborado con quitosano al 2% con 70% de aceite esencial con halo de inhibición de 12.5500. La prueba de TUKEY nos sirve para determinar cómo se agrupan los subconjuntos formados por los diferentes esmaltes de uñas conteniendo aceite esencial.

De acuerdo a esta comparación se tomó como formulación final el esmalte de quitosano al 2 % con 70 % de aceite esencial, el cual presenta mayor halo de inhibición.

## **ANÁLISIS Y DISCUSIÓN**

El análisis estadístico anova fue significativo (0.000), en relación a los datos obtenidos, indicando que el esmalte de uñas conteniendo aceite esencial de *Origanum vulgare L.* quitosano 1% con 70% de aceite esencial y quitosano 2% con 70% de aceite esencial si tuvo efecto antimicótico, pero que no superan al esmalte de ácido undecilenoico. Esto se ve corroborado por la prueba Post ANOVA de Tukey, el cuadro 18 demuestra que son homogéneos, que, a mayor concentración del esmalte de uñas, aumenta el halo de inhibición y que el ácido undecilenoico tiene mayor efecto antimicótico sobre *Trichophyton rubrum*.

Según el estudio de Ayala y Castillo (2018) (18). evaluaron el efecto antimicótico *in vitro* de la crema de *Tropaeolum majus L.* (Tropaeolaceae) desarrollada sobre cepas de *Trichophyton rubrum* (Arthrodermataceae), demostró que tiene efecto antimicótico similar a la crema de isoconazol al 1% utilizada como patrón debido a la presencia de halos de imbibición semejante de (33.15 mm), no existiendo diferencia significativa; lo que permite concluir que es una potencial alternativa de tratamiento para las micosis de la piel producidas por la cepa estudiada.

Se debe tener en cuenta que las diferencias encontradas en los resultados de los antecedentes y los de nuestra investigación, puede estar condicionado o influenciado por el medio ambiente en el que se desarrolló el cultivo de la planta, en relación a la humedad, temperatura, altitud y componentes de terreno.

Los resultados que se obtuvieron nos brindan nuevas posibilidades de tratamiento. Se considera el uso del esmalte de uñas en base al aceite esencial de orégano como una alternativa terapéutica a utilizar, como antifúngico tópico.

#### 4.10 EVALUACIONES DEL ESMALTE DE UÑAS TERMINADA

**CUADRO 19. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL ESMALTE DE UÑAS.**

CARACTERÍSTICAS	RESULTADOS	CONFORME / NO CONFORME
Olor	Aromático	Conforme
Color	Amarillo transparente	Conforme
Apariencia	Viscoso	Conforme

#### RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

Posterior a la evaluación de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano) frente *Trichophyton rubrum ATCC 28188*, se elaboró el esmalte de uñas con el aceite esencial, donde las características organolépticas del esmalte elaborado son apariencia viscosa, color amarillo transparente, olor característico del orégano, apariencia viscosa esta es aceptables comparados en el esmalte patrón.

**CUADRO 20. TIEMPO DE SECADO DEL ESMALTE DE UÑAS**

Concentración del esmalte	Tiempo de secado			Promedio
	I	II	III	
1% de quitosano con aceite esencial al 70%	04 minutos, 24 segundos	04 minutos, 25 segundos	04 minutos, 24 segundos	04 minutos, 24 segundos
2% de quitosano con aceite esencial al 70%	04 minutos, 38 segundos	04 minutos, 40 segundos	04 minutos, 40 segundos	04 minutos, 39 segundos
Esmalte antimicótico Ácido undecilenico	05 minutos 13 segundos	5 minutos, 11 segundos	5 minutos, 13 segundos	5 minutos, 12 segundos

## RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

En el cuadro 20 se reportan los datos del tiempo de secado los cuales deben fluctuar dentro del rango establecido según la normatividad de la FDA y del Manual de Cosméticos de la FDA (FDA Handbook on Cosmetics) que es de 4 minutos hasta 8 minutos, los 2 esmaltes formulados y el esmalte patrón se encuentran dentro del rango establecido.

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En comparación con los resultados obtenidos por MARTELL Y RODRIGUEZ (2015) (19) , que realizaron el tiempo de secado de 24 esmaltes comerciales Bells negro 7.43” Roder melon 6.04” Vogue azul 6.32” P&W rojo 5.10” M.M rojo 6.10” Sasha rojo 5.32” Briller rojo 7.15”., en comparación con los resultados y con el esmalte de 2% de quitosano con 70% de aceite esencial 4.39” esta se encuentra dentro del rango establecido.

Se aplicó una película sobre la uña con ayuda de un pincel, el tiempo para formar la película seca se obtuvo con ayuda de un cronometro, el tiempo de secado fue satisfactorio estuvo en un rango de 4 – 5 minutos.

En comparación con el esmalte patrón hay una diferencia de milésimas el tiempo de secado fue de 5 minutos 12 segundos.

## CUADRO 21. SUAVIDAD PARA FLUIR DEL ESMALTE DE UÑAS.

Concentración del esmalte	Tiempo de suavidad para fluir			Promedio
	I	II	III	
1% de quitosano con aceite esencial al 70%	12 segundos, 72”	11 segundos, 70”	12 segundos, 41”	12 segundos, 27”
2% de quitosano con aceite esencial al 70%	13 segundos, 46”	14 segundos, 17”	14 segundos, 57”	14 segundos, 06”
Esmalte antimicótico ácido undecilénico	2 segundos, 10”	2 segundos, 49”	2 segundos, 10”	2 segundos, 23”

## RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

Las 3 muestras se vertieron sobre una placa de vidrio de 1,5 pulgadas, puesto verticalmente y se tomó el tiempo en que el esmalte recorría las 1,5 pulgadas.

De acuerdo al cuadro el esmalte al 1% de quitosano con aceite esencial al 70% tuvo un tiempo para fluir de 12 segundos ,27” posteriormente el esmalte al 2% de quitosano con aceite esencial al 70% tuvo un tiempo de 14 segundos, 06” hubo una diferencia de 2 segundos esto es debido a que se realizó una película de quitosano que le da mayor viscosidad a la concentración de quitosano al 2% con aceite esencial al 70%.

El esmalte antimicótico de ácido undecilénico tuvo un tiempo de fluidez de 2 segundos, 23” en comparación con los 2 esmaltes formulados hay una diferencia de 13 segundos, esto debido a que el esmalte patrón tiene una consistencia mucho más líquida.

### CUADRO 22. DETERMINACIÓN DEL PH DEL ESMALTE DE UÑAS.

Valores de pH de los esmaltes formulados			
Esmalte a diferente concentración	pH	Rango USP 5.5 - 7	Conforme / No conforme
1% de quitosano con aceite esencial al 70%	6	5.5 - 7	Conforme
2% de quitosano con aceite esencial al 70%	6	5.5 - 7	Conforme
Esmalte antimicótico ácido undecilénico	6	5.5 - 7	Conforme

## RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

De acuerdo al cuadro 22 observamos que el ph de las dos formulaciones son ligeramente ácidos y tienden hacia la neutralidad, estos valores resultan ser adecuados para la aplicación por su compatibilidad con el pH de la uña (5 -5.5), impidiendo el desarrollo de microorganismos patógenos y que él esmalte no

comprometerá la integridad de las uñas. Al mismo tiempo se encuentran dentro del rango permitido por la USP 25 que es de 5,5 - 7. (88)

### CUADRO 23. MODELO DE PENETRACIÓN DE UÑA

CONCENTRACIÓN DEL QUITOSANO Y ACEITE ESENCIAL	CANTIDAD DE ESMALTE	HALOS DE INHIBICIÓN			
		I	II	III	PROMEDIO
Quitosano al 1% con aceite al 70%	5 µL de esmalte	11.00	11.74	11.40	11.38
Quitosano al 2 % con aceite al 70%	5 µL de esmalte	11.67	12.21	11.85	11.95
Esmalte de ácido undecilénico	5 µL de esmalte	11.73	11.67	11.51	11.63

### RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

La prueba realizada tuvo la finalidad de observar la penetración del principio activo del esmalte, por lo cual se realizó la prueba en uñas humanas las cuales se cortaron en forma de discos.

Se aplicó el esmalte a la superficie del disco de uña a diferentes concentraciones y cantidades, luego se colocaron en el superficie de las placas de agar sembradas con el inóculo de *Trichophyton Rubrum* a diferentes concentraciones de quitosano al 1% con una concentración de aceite esencial al 70% con una cantidad de 5 µL , quitosano al 2 % con una concentración de aceite esencial al 70% con una cantidad de 5 µL , donde se pudo observar la formación de la halos por ende hubo penetración de la uña

### ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Las placas se incubaron durante 7 días a 26 °C y los halos de inhibición fueron medidos.

Las 3 formulaciones mostraron capacidad de penetración mediante la uña con formación de halos, la formulación de quitosano al 2 % con aceite esencial de orégano al 70% con una cantidad de 5 uL mostro mayor capacidad de formación

de halo inhibición 11.95 mm y mayor poder de penetración con respecto a las otras dos formulaciones.

En comparación con el esmalte patrón que formo un halo de 11.63 mm, el esmalte elaborado formo un halo de 11.95 mm lo cual en comparación es casi similar con lo cual podemos concluir que el esmalte formulado tiene buena penetración.

**CUADRO 24. RESULTADOS DESCRIPTIVOS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL ESMALTE UÑAS DE ACEITE ESENCIAL DE Origanum vulgare L. (ORÉGANO) FRENTE A Trichophyton rubrum ATCC 28188. MODELO DE PENETRACIÓN DE UÑA.**

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Quitosano al 1% con 70% de aceite 5 µL de esmalte	3	11,3800	,37041	,21385	10,4599	12,3001	11,00	11,74
Quitosano al 2% con 70% de aceite 5 µL de esmalte	3	11,9100	,27495	,15875	11,2270	12,5930	11,67	12,21
Esmalte de ácido undecilénico 5 µL de esmalte	3	11,6367	,11372	,06566	11,3542	11,9192	11,51	11,73
Total	15	11,8147	,48474	,12516	11,5462	12,0831	11,00	12,86

**Fuente:** Datos estadísticos

## RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

En el cuadro 24. Se observa los resultados descriptivos de los halos de inhibición de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano), el esmalte con quitosano al 1% y 70% de aceite esencial presenta un halo de inhibición de (11.3800 mm) , el esmalte de quitosano al 2% y 70% de aceite esencial presenta un halo de inhibición de (11.9100) y el patrón el esmalte de ácido undecilenico presenta un halo de inhibición de (11.63 mm) frente a cepas de *Trichophyton rubrum*, mediante el modelo de penetración de uña.

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a los datos obtenidos el esmalte que presenta mayor halo de inhibición por ende mayor capacidad de penetración de uña es el esmalte de quitosano al 2% y 70% de aceite esencial,

En comparación con el producto antimicótico para uñas tópicas actualmente comercializado que se usó como patrón esmalte de ácido undecilenico, los datos del esmalte con quitosano al 2% y 70% de aceite esencial indican que este tiene mejor capacidad de penetración debido a que este posee en su composición el quitosano, que mejora la penetración ya que este que mejora la liberación del principio activo en la uña , una vez aplicado sobre la uña, seca rápidamente y forma una película en la superficie ungueal

En la prueba de modelo de penetración de uña se demostró que el esmalte formulado, puede penetrar la uña e inhiben el crecimiento de hongos y puede ser eficaz en el tratamiento tópico de la uña.

### CUADRO 25. ANÁLISIS DE VARIANZA ANOVA DEL ESMALTE DE UÑAS DE ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* L. (ORÉGANO) FRENTE A *Trichophyton rubrum* ATCC 28188. MODELO DE PENETRACIÓN DE UÑA.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1,092	4	,273	1,243	,354
Dentro de grupos	2,197	10	,220		
Total	3,290	14			

Fuente: Datos estadísticos

**Leyenda;**

GL : grados de libertad

F : Estadístico de prueba

Sig : Significancia

Sig  $\leq$  0,05, existe diferencia entre los halos de inhibición.Sig  $\geq$  0,05, no existe diferencia entre los halos de inhibición.**ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS**

En el análisis de varianza (ANOVA), del cuadro 25 Se observa que el valor de significancia es de 0,354, con lo cual se pudo afirmar que no existió una diferencia significativa entre los halos de inhibición formados por lo que se concluye que el esmalte de aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) a diferentes concentraciones no presentan diferencia de actividad inhibitoria, mediante el modelo de penetración de uña.

**CUADRO 26. PRUEBA DE TUKEY PARA ESTUDIO COMPARATIVO DEL ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ESMALTE DE UÑAS DE ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* L. (ORÉGANO) FRENTE A *Trichophyton rubrum* ATCC 28188. MODELO DE PENETRACIÓN DE UÑA.**

concentración de quitosano y aceite	N	Subconjunto para alfa = 0.05
		1
Quitosano al 1% con 70% de aceite 5 $\mu$ L de esmalte	3	11,3800
Quitosano al 2% con 70% de aceite 5 $\mu$ L de esmalte	3	11,9100
Esmalte de ácido undecilénico 5 $\mu$ L de esmalte	3	11,6367
Sig		,397

**Fuente:** Datos estadísticos

## RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

En el cuadro 26 se puede apreciar que se obtuvo un solo subconjunto al comparar las medias de los halos de inhibición de las formulaciones del esmalte a diferentes concentraciones y el patrón, se observa que para quitosano al 1% con 70% de aceite 5  $\mu$ L de esmalte forma un halo de ( 11.3800 mm) y quitosano al 2% con 70% de aceite 5  $\mu$ L de esmalte (11,9100 mm) y en comparación con el esmalte de ácido undecilénico 5  $\mu$ L estas no presentan diferencias significativas para el *Trichophyton rubrum* lo que demuestra que los esmaltes a diferente concentración penetran e inhiben el microorganismo..

## ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Según ( Traynor y Turner 2010) Realizaron el modelo de pezuña bovina, se realizó discos de pezuñas estériles de 0,5 – 1,0 mm de grosor, similares al grosor de las uñas humanas, se colocaron en la superficie de las placas de agar sembrados con un inculo de *Trichophyton rubrum*, estandarizados a una concentración de  $2-5 \times 10^5$  conidios/mL , 300 microlitros de nitrato de miconazol 2% y 8%, luego se aplicaron p/p de formulación tópica de ciclopirox a la superficie del disco de pezuña , la placas se incubaron durante 4 días y las halos de inhibición fueron posteriormente medido. Como se esperaba los controles no tratado no mostraron halos de inhibición. El nitrato de miconazol 2%mostro significativamente mayor halo de inhibición en comparación que es esmalte de ciclopirox, (28,0 mm y 26,5 mm) respectivamente. (26) En comparación con nuestros datos obtenidos del modelo de penetración estos presentan mayor halo de inhibición debido a que miconazol y el ciclopirox son agentes sintéticos para el tratamiento dermatológico tópico de micosis, nuestro esmalte está en base al aceite esencial de orégano y quitosano que con componentes naturales.

Los resultados estadísticos demostraron que una vez conocida la actividad antimicótica del esmalte de uñas se estableció que las diferentes formulaciones utilizados tuvieron casi la misma eficacia para inhibir a la cepa patógena.

#### 4.10.1 ESTUDIO DE ESTABILIDAD

Se realizaron estudios de estabilidad del esmalte de uñas, las muestras se almacenaron a una temperatura de 25 °C durante 1 mes, luego se analizaron tiempo de secado, suavidad para fluir, capacidad de penetración del esmalte, en los estudios posteriores al cumplir 1 mes no mostraron variaciones con los resultados obtenidos.

#### CUADRO 27. ESTUDIO DE ESTABILIDAD FISICOQUÍMICOS Y ORGANOLÉPTICOS

Características organolépticos y fisicoquímicos		Conforme /No conforme
Aspecto	Homogéneo	Conforme
Color	Amarillo transparente	Conforme
Olor	Característico de orégano	Conforme
pH	6	Conforme

#### RESULTADOS E INTERPRETACION

De acuerdo a los resultados obtenidos en el cuadro 27 se evaluó el esmalte de uñas de quitosano al 2% con 70% de aceite esencial de orégano, se almaceno durante 30 días a temperatura ambiente en un lugar fresco, el esmalte mantiene todas sus características organolépticas y fisicoquímicas, aspecto homogéneo, olor característico del aceite esencial, color amarillo transparente, tiempo de secado de 4 minutos luego de su aplicación.

#### ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Se realizaron estudios de estabilidad del esmalte de uñas, llevadas a cabo según las directrices de la International Conference on Harmonisation (ICH), las muestras de almacenaron a temperatura de 30 °C +- 2°C y humedad 75% +- 5% durante 30 días. (87)

El factor más importante a considerar es la temperatura a la que se realiza el ensayo, pues incide directamente en la interpretación de los resultados. La humedad es un parámetro que se considera en esmaltes por su cantidad de solventes, donde se pueda ver afectadas sus propiedades de calidad.

La evaluación de las características organolépticas se realizó por medio de análisis sensorial, comparado con la muestra patrón de esmalte de ácido undecilénico.

Al evaluar el color el esmalte formulado con aceite esencial no mostro cambio, a temperatura ambiente la formulación con aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) no presento ningún cambio en su aspecto, color y olor. Tampoco hubo cambio en el pH (ligeramente ácido 6) lo cual permite la seguridad de uso al no comprometer la integridad de las uñas. A pesar de todo ello se recomienda guardar el esmalte en un lugar fresco para conservar sus propiedades.

#### 4.10.2 CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL ESMALTE DE UÑAS

**CUADRO 28. RESULTADOS DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL ESMALTE DE UÑAS**

CRITERIOS	RECUENTO EN LA DILUCIÓN 10 <sup>1</sup>	LIMITES BIOLÓGICOS PERMISIBLES (LMP)	OBSERVACIONES
<b>Criterio imperativo</b>	Ausencia de <i>salmonella spp</i>	Ausencia de <i>salmonella spp.</i>	La muestra cumple los LMP
<b>Criterio indicativo de higiene</b>	Numero de coliformes fecales <i>Escherichia coli.</i> ausencia	<i>Escherichia coli.</i> Ausencia	La muestra cumple los LMP
<b>Criterio de alerta o limites críticos</b>	Recuento de microorganismos aerobios mesofilos viables < 10 <sup>-2</sup> UFC	10 <sup>-4</sup> - 10 <sup>-5</sup> UFC	La muestra cumple los LMP
	Recuento de hongos y levaduras 10 <sup>-2</sup> UFC	10 <sup>-2</sup> - 10 <sup>-3</sup> UFC	La muestra cumple los LMP

**Fuente:** Datos certificados Laboratorio. Servicio de Bacteriología y Microbiología del Hospital Regional del Cusco.

#### RESULTADOS E INTERPRETACIÓN

En el cuadro 28, muestran los resultados del control microbiológico del esmalte formulado, fue evaluado de acuerdo a los criterios imperativos, indicativo de higiene y limites críticos, en los resultados se aprecia que los análisis

correspondientes se encuentran dentro de los límites establecidos por la Dirección General de Salud Ambiental (DIGESA).

## **ANÁLISIS Y DISCUSIÓN**

De acuerdo al estudio realizado por El Consejo de Fabricantes de Uñas (Nail Manufacturers Council, NMC), (2008), se analizaron frascos de esmalte que se habían aplicado a múltiples clientes, junto con frascos de control no utilizados. Se realizaron pruebas microbiológicas estándar de todos los frascos con el fin de determinar si los microbios podían sobrevivir en el esmalte, ya sea que hayan sido introducidos durante el uso en el salón o a través de una prueba de exposición. Los resultados demuestran que los microbios no sobreviven en el esmalte y que mueren rápidamente cuando se los introduce en el producto. Los productos para esmaltado de uñas a base de solventes (por ej., brillo, laca, esmalte, barniz, base, acabados) no ofrecen condiciones adecuadas para el crecimiento ni la reproducción de microbios y, de hecho, son extremadamente hostiles para la supervivencia de éstos.

El recuento de aerobios en placa y el recuento de levaduras y hongos en placa reveló la presencia de menos de 10 unidades de formación de colonias (UFC) por gramo en todas las muestras. De acuerdo con BioScreen, 10 UFC/gramo es el límite de detección de la prueba, por lo tanto, el término “<10 UFC” equivale a decir que no se observaron microbios.

Los microorganismos estudiados fueron

- *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, y *Staphylococcus aureus*
- *Pseudomonas aeruginosa* y *Burkholderia cepacia*
- *Aspergillus niger* y *Candida albicans*. (89)

En conclusión, los esmaltes de uñas a base de solventes no albergan ni promueven el crecimiento de microorganismos patógenos y, además, los matan rápidamente. Los resultados correspondientes indican que el esmalte formulado está libre de contaminación por microorganismos, y está apto su uso para el tratamiento antimicótico

## CONCLUSIONES

1. Se determinó la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano) y del esmalte de uñas, frente a cepas *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, siendo el esmalte al 2% de quitosano con 70 % de aceite esencial la cual presento mayor actividad antimicótica en comparación con las demás formulaciones.
2. Se extrajo el aceite esencial del *Origanum vulgare L.* (orégano) por el método de arrastre por vapor para realizar el estudio, y se determinó el porcentaje de rendimiento con un valor de 0.82%.
3. Se evaluó las características organolépticas del aceite esencial, sabor amargo, olor característico del orégano, color amarillo y textura aceitosa, y las características fisicoquímicas densidad relativa (0.8454 g/ml), índice de refracción (1.3872), índice de saponificación (0.0102), rotación óptica (-0.542) e índice de acidez (0.8265).
4. Se determinó la composición química del aceite esencial mediante cromatografía de gases acoplado a espectrofotómetro de masas (CG-SM), informo de la presencia de 33 metabolitos de los cuales los componentes mayoritarios fueron terpineol, cis-a (18.46%), timol (12.38%) y ácido antranílico, 1,5-dimetil-1-vinil-4-hexenil ester (9.38%) y carvacrol (0.98%)
5. Se determinó la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial del *Origanum vulgare* por el método de difusión de discos frente a cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, Se comparó la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial a diferentes concentraciones versus el medicamento patrón terbinafina que tiene un halo de inhibición de 20.26 mm a diferencia de la concentración mínima de 70% que presenta un halo de 9.75 mm. Se comprobó que a medida que se aumenta la concentración del aceite de *Origanum vulgare L.* el crecimiento de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, es afectado como se confirma con los datos obtenidos.
6. Se determinó la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano) con un CMI de 70% con un halo de

inhibición de 9.75 mm frente a cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

7. Se diseñó y elaboró el esmalte de uñas usando aceite esencial de *Origanum vulgare* L. (orégano). Siendo el esmalte de *Origanum vulgare* L. a una concentración de quitosano al 2% con aceite esencial al 70%, el cual presentó mejores características fisicoquímicas y mayor actividad antimicótica frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, con un halo de inhibición de (12.55 mm), mediante el método de difusión en agar.
8. Se evaluó las características organolépticas del esmalte de quitosano al 2% con aceite esencial al 70%, presento color amarillo transparente, olor característico del orégano. Características fisicoquímicas, pH (6) que se encuentra dentro de los parámetros establecidos por la USP. Evaluaciones al esmalte terminado, tiempo de secado (4 minutos), suavidad para fluir (14 segundos), penetración de uñas (11.95 mm) las cuales se encuentran dentro de los rangos en comparación con el esmalte patrón de ácido undecilénico y el control microbiológico no reporto presencia de microorganismos contaminantes en el esmalte.

## RECOMENDACIONES

### **A LAS AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO**

- Incentivar la investigación y promover el cultivo sustentable y sostenible de diferentes plantas con propiedades terapéuticas en las comunidades aprovechando nuestra ubicación geográfica y biodiversidad que tiene nuestra región.

### **A LOS DOCENTES DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

- Incentivar a los estudiantes a desarrollar proyectos relacionados con la industria farmacéutica y cosmética.
- Incentivar a los estudiantes al desarrollo de proyectos de investigación en revistas científicas, páginas web y apoyarlos para obtener el financiamiento brindando por la universidad.

### **A LOS ESTUDIANTES DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

- Realizar la extracción de aceites esenciales de diversas plantas, para poder explotar las propiedades terapéuticas que estas poseen.
- Realizar proyectos relacionados con la industria cosmética, formulando, shampoos, bloqueadores, cremas, esmaltes, etc.
- Ejecutar nuevos estudios in vivo del esmalte a fin de evaluar su acción antimicótica en seres vivos.
- Ampliar otros estudios para determinar el espectro de actividad antifúngica *Origanum vulgare* "Orégano", en otras formas de concentrados, como aceite esencial o extracto acuoso.
- Se recomienda hacer estudio de estabilidad a largo plazo en el esmalte elaborado, así se obtendrá datos más reales con relación a la estabilidad del producto tomando en cuenta el tiempo de conservación.
- Promover el uso de este producto natural, así mismo estudiar su cultivo y desarrollo para evidenciar una mejora su espectro y eficacia de acción en las investigaciones futuras a realizarse en nuestro país.

## BIBLIOGRAFÍA

1. MATUTE. Micología Médica Básica. 5th ed. Trujillo AB, editor. New York : McGraw - Hill Medical; 2015.
2. BERNARDEZ CRUZ Y, CABRERA ACEA , RODRIGUEZ GANDULLA T, MENENDEZ CORDERO B. Características clínico-epidemiológicas de pacientes en edad pediátrica afectados por dermatofitosis. MediSur. 2011 Noviembre ; 9(6).
3. CANO P , BONILLA R P, NEIRA M. Estudio fitoquímico del aceite esencial de las hojas de *Mintostachys mollis* (muña). Universo Farmaceutico : Revista Institucional de la Facultad de Ciencias Farmaceuticas y Bioquímica. 2014 Junio ;(3): p. 59.
4. ALBADO PLAUS E, SAEZ FLORES G, GRABIEL ATAUCUSI S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (oregano). Revista Medica Herediana. 2001 Marzo; 12(1).
5. VILA R, CAÑIGUERAL S. El aceite esencial de *Malaleuca alternifolia* en el tratamiento de vulvovaginitis. Revista de Fitoterapia. España ;; 2006.
6. VALDIVIA BLONDET L. Las dermatofitosis: Clínica, diagnóstico y tratamiento. DERMATOL - PERU. 2003; 13(1).
7. ARENAS GUZMAN. Micología Médica Ilustrada. Tercera edición ed. Madrid : McGraw - Hill Medical; 2008.
8. BEJAR V, VILLANUEVA F, GUEVARA JM, GONZALEZ S, VERGARAY G, ABANTO E, et al. Epidemiología de las dermatomicosis en 30 años de estudio en el Instituto de Medicina Tropical. Daniel A Carrion. Lima. Anales de la Facultad de Medicina. 2014 Abril; 75(2).
9. CAMUS J, TRUJILLO M. Contribución a la química de los aceites esenciales provenientes del oregano. Revista Boliviana de Química - La Paz. Bolivia. 2011; 28(1).
10. IBARRA CASTILLO , TUNQUI NEIRA GH. Actividad antimicótica del aceite esencial de *artemisa absinthium* (ajenjo) frente a *trychophyton rubrum* y *candida albicans* y elaboración de una forma farmacéutica. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2009.
11. HUANCACHOQUE USCA B. Actividad antimicótica in vitro del zumo de limón frente a *Trichophyton rubrum*". Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2007.
12. LOVON SALCEDO M, DELGADO RAMOS SY. Actividad antimicótica in vitro de los aceites esenciales de romero y canela, frente a cepas de *candida albicans*, evaluados por separado y en combinación. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2011.

13. MARAVÍ INGA GG. Efecto antibacteriano y antifungico del aceite esencial de MENTA y HIERBA LUISA , sobre streptococcusmutans y candida albicans. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener, Facultad de Ciencias de la Salud; 2012.
14. QUINTANILLA JJ. Efecto antibacteriano in vitro del carvacrol (aceite de oregano) sobre CANDIDA ALBICANS. Lima: Universidad Privada Norbert Wiener , Escuela Academica Profesional de Odontologia; 2012.
15. LACHOS MIGUEL , LAURENTE PACHAMANGO KG. Efecto antimicotico in vitro del aceite esencial de origanum vulgare frente a cepas de trichophyton rubrum. Trujillo : Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Farmacia y Bioquimica ; 2018.
16. VILLAVICENCIO GASTELU JE. Efecto antimicótico in vitro del (origanum vulgare) en cepas de Candida albicans procedentes de la Estomatits Sub Protesica. Lima : Universidad Nacional Mayor de San Marcos , Facultad de Odontologia ; 2017.
17. ALVA PRETELL JA. Eficacia antimicótica del extracto acuoso de Origanum vulgare “orégano” sobre Candida albicans ATCC 10231, comparado con metronidazol estudio in vitro. Trujillo : Universidad Cesar Vallejo , Escuela Academica Profesional de Medicina ; 2018.
18. AYALA JARA CI, CASTILLO SAAVEDRA F, VILLANUEVA SEDANO L, MEDINA ESPINOZA T. Desarrollo y efecto antimicótico in vitro de una crema Tropaeolum majus L. (Tropaeolaceae) sobre Trichophyton rubrum (Arthrodermataceae). Arnaldoa. 2018 Enero - Abril; 25(1).
19. MARTELL ROSALES AR, RODRIGUEZ DEL AGUILA JM. Calidad de esmaltes para uñas que se comercializan en el emporio comercial de Albarracin Trujillo, 2015. Trujillo : Universidad Nacional de Trujillo , Facultad de Farmacia y Bioquimica ; 2015.
20. ARCILLA LOZANO C, LOARCA PIÑA , LECONA URIBE. El oregano: propiedades, composicion y actividad biologica de sus componentes. Queretaro: Universidad Autonoma de Queretaro, Departamento de Ciencia de Alimentos y Nutricion Humana ; 2012.
21. HERNANDEZ DOMINGUEZ L, ABRAHAM JUAREZ M. Aceite esencial de oregano como ptencial nutraceutico. Investigacion y Desarroll en Ciencia y Tecnologia de Alimentos. 2016; 1(2).
22. TAPIERO CUELLAR J, MONTAÑO ESCOBAR Y, GARCIA MENDOZA M, MARIN REINA C, ESCOBAR SALCEDO J. Extraccion , caracterizacion y evaluacion de la actividad antioxidante del aceite esencial de oregano del municipio de Vijes Valle del Cauca. Sena Regional Valle. Centro Agropecuario de Buga. 2016.
23. SOLIS CAMPOVERDE. Evaluacion de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de origanum vulgare y thymus vulgaris, como potenciales bioconservadores en carne de pollo. Riobamba : Escuela Superior Politecnica Chimborazo; 2012.
24. VALVERDE QUINALUISA PY. Efectividad antimicotica del aceite esencial del oregano de las provincias altas del Chimborazo y Santa Elena al 100 % sobre

- CANDIDA ALBICANS. Quito - Ecuador: Universidad Central del Ecuador, Facultad de Odontología; 2017.
25. SALAMANCA GARCIA MA, SANCHEZ BERMUDEZ MY. Extracción y caracterización de la oleoresina del orégano (*origanum vulgare*). Pereira : Universidad Tecnológica de Pererira , Escuela de Tecnología Química ; 2009.
  26. TRAYNOR M, TURNER RB, EVANS CR, JONES SA. Effect of a novel penetration enhancer on the ungueal permeation of two antifungal agents. *Pharm Pharmacol.* 2010; 62(6).
  27. MAMANI NINA RS. EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE ORÉGANO SOBRE ESCHERICHIA COLI, LISTERIA MONOCYTOGENES Y SALMONELLA, EN LA CARNE DE CUY. PUNO; 2016.
  28. MUÑOZ CENTENO. Plantas Medicinales Españolas : *Origanum Vulgare L.* (Lamiaceae) (Orégano). 27th ed. Malaga : Acta Botanica Malacitana ; 2017.
  29. MINISTERIO DE SALUD. Medicamentos Herbarios Tradicionales Salud Md, editor. Santiago - Chile: Diario Oficial ; 2010.
  30. STASHENKO E. Aceites Esenciales. Primera edición ed. Bucaramanga : División de Publicaciones UIS; 2009.
  31. MARTINEZ A. Aceites Esenciales. In MARTINEZ A. Aceites Esenciales. Medellin : Facultad Química Farmacéutica - Universidad de Antioquia; 2001. p. 34.
  32. WANKAT PC. Ingeniería de Procesos de Separación. Segunda edición ed. Indiana : PEARSON; 2015.
  33. SANCHEZ SALDAÑA L, MATOS SANCHEZ R, KUMAKAWA SENA H. Infecciones micóticas superficiales. *Dermatología Peruana.* 2009; 19(3).
  34. MOLINA DE DIEGO A. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. In MOLINA DE DIEGO A. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Valencia : Elsevier Doyma ; 2011. p. 33 -39.
  35. PEREZ DE INESTROSA B, FERNANDEZ M, VALLECILLOS PEREZ M. Onicomycosis. *Medicina general y de la familia.* 2014 Mayo ; 3(5).
  36. ANGULO AG, BRAVO N, FALCO. Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. *Dermatología Venezolana.* 2008; 46(4).
  37. ARÍSTEGUI. Hongos y Actinomicetos Alergénicos. Primera edición ed. Elena G, editor. Bilbao: Revista Iberoamericana de Micología; 2002.
  38. HERNANDEZ SALAZAR P, RAMON FERNANDEZ M, ARENAS R. Dermatofitosis por *Trychophyton Rubrum*. *Revista Iberoamericana de Micología.* 2007 Junio; 2(24): p. 122 - 124.
  39. DEACON JW. Introducción a la micología moderna. Segunda edición ed. Mexico DF: LIMUSA; 1993.

40. OLIVAS E, ALARCON R. Manual de practicas de Microbiología básica y Microbiología de alimentos. Segunda edición ed. MAYOLA R, editor. Ciudad de Juarez; 2004.
41. DIAZ A. Manual de Procedimientos, Banco de Cepas y Genes, Bacteriología y Laboratorio Clínico. Colombia : Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca , Facultad de Ciencias de la Salud ; 204.
42. MONTOYA ROMERO. Las Cepas ATCC. Herramienta indispensable de control de calidad interno en microbiología Loja; 2012.
43. SACSQUISPE CONTRERAS E, VELÁSQUEZ POMAR. Manual de Procedimientos para la Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Difusión de Discos Peru MdSd, editor. Lima: Instituto Nacional de Salud; 2002.
44. CUENCAS SALA. Odontología Preventiva y Comunitaria. Tercera edición ed.: MASSON Editorial ; 2005.
45. ALDAZ PASTOR , AROCAS SACAÑ , DELGADO SANCHEZ. Interacciones Farmacológicas. Primera edición ed. Lourdes G, editor. Madrid ; 2012.
46. VADEMECUM MEDICO DEL PERU Lima: Ediciones Pablo Grimberg; 2012.
47. Administracion Nacional de Medicamento ayT. VADEMECUM - TERBINAFINA. 2005 Marzo.
48. AMIDON GL, BERMEJO M. Formas Farmaceuticas.Preformulacion. Sexta edicion ed. PRICE J, editor. Valencia : TSRL inc; 2003.
49. GARCIA MONTOYA. Desarrollo Farmacocinetico. Fase de Formulación y Compatibilidad. In GARCIA MONTOYA. Optimizacion, validacion y modelización de un proceso de fabricación de comprimidos.Desarrollo de una aplicación interactiva multimedia. Barcelona; 2002. p. 365.
50. SANCHEZ CUEVAS A. Cosmeticos y equipos para los cuidados esteticos de higiene, depilacion y maquillaje. 50th ed. España: ELEARNING S.L.; 2015.
51. GARCIA LOPEZ. Marketing y Cosmetica. Segunda edición ed. Madrid : ESIC Editorial ; 2007.
52. LEIRE AZCONA B. Manos y Uñas Cuidado Dermocosmetico. Farmaceutica comunitaria de Bizkaia. 2003 Marzo; 17(3).
53. MANZANO DEL CERRO. Esmaltes , Tecnicas pictóricas. Cuarta edición ed. Madrid: BBAA; 2013.
54. MAILLAND F. A Hydroxypropyl Chitosan (HPCH) Based Medical Device Prevents Fungal Infections. The Open Dermatology. 2015 Julio; 9(1).
55. LABORATORIOS BAGO. BAGO: Etica al servicio de la salud. [Online].; 2010 [cited 2018 Febrero 11. Available from: <http://www.bagochile.cl/vademecum/privex/>.

56. CAMARGO GÓMEZ , MOYANO BONILLA J. RECOMENDACIONES PARA EL DESARROLLO DE ESTUDOS DE ESTABILIDAD DE PRODUCTOS COSMÉTICOS Helen G, editor. Bogotá: SAFE; 2018.
57. VIPIN KV, CHANDRAN S, AUGUSTHY A. Formulation and Evaluation of an Antifungal Nail Lacquer for Onychomycosis Kerala: British Biomedical Bulletin ; 2014.
58. DEVLIN TM. Bioquímica. Con aplicaciones clínicas. Cuarta ed. Barcelona : Editorial Reverté; 2006.
59. TAPIA. Mecanismos de acción, reacciones adversas y nuevos antimicóticos. Medwave. 2005 Abril ; 5(4).
60. VILA JATO JL. Formas Farmaceuticas. In VILA JATO JL, editor.. Santiago de Compostela : Editorial Sintesis ; 2001. p. 591.
61. GREGORÍ VALDÉS. Estructura y actividad de los antifungicos. Revista Cubana de Farmacia. 2005 Mayo; 39(2).
62. ESPINOSA MANFUGAS. Evaluación Sensorial de Alimentos Racel T, editor. La Habana: Editorial Universitaria; 2007.
63. COLORADO PERALTA R, RIVERA JM. Química del Olor Segura Medrano S, editor. Veracruz: Universidad Veracruzana; 2019.
64. COSMÉTICOS GGD. Guía de Estabilidad de Productos Cosméticos. Primera Edición ed. Sanitaria ANdV, editor. Brasilia : Athalaia Gráfica ; 2005.
65. RITCHIE E. Mediciones de pH de conformidad con la USP. Pharmacopeial Forum. 2014 Diciembre ; 29(6).
66. GARCÍA RODRÍGUEZ A, GARCÍA SÁNCHEZ , GÓMEZ LUS. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. In Juan P, editor. Microbiología Clínica.; 2000.
67. SANCHEZ DE PRAGER , MARMOLEJO DE LA TORRE F, OTERO BRAVO. MICROBIOLOGIA: Aspectos fundamentales JULIA ZR, editor. Cali: Ferriva S.A; 2000.
68. CHANDRAN S, AUGUSTHY AR, KURIAKOSE MR. Formulation an evaluation of an antifungal nail lacquer for onychomycosis Kerala - India; 2014.
69. TIRADO DF, MONTERO PM, ACEVEDO. Estudio comparativo de Métodos empleados para la Determinación de Humedad de Varias Matrices Alimentarias. Información Tecnológica. 2015; 26(2).
70. RUIZ C, DÍAZ C, ROJAS R. Composición química de aceites esenciales de 10 plantas aromáticas peruanas. Revista de la Sociedad Química del Perú. 2015 Abril - Junio; 81(2).
71. ARENAS PARÍS. MEDICIÓN DE DENSIDAD. 2011th ed. BOGOTÁ: Organización Internacional de Metrología Legal; 2011.

72. FUERTES RUITÓN C, MUNGUÍA CHIPANA. Estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb muña de tres regiones peruanas por cromatografía de gases y espectrometría de masas. *Ciencia e Investigación*. 2001; 4(1).
73. MANRIQUE. Caracterización de grasas y aceites Buenos Aires : Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires ; 2015.
74. BARROS DA SILVA ME. In vitro methods for antifungal susceptibility testing of *Trichophyton* spp. *Mycological Research*. 2006 Noviembre; 110(11).
75. TAROCO R, SEIJA V, VIGNOLI R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. In *Bacteriología y virología médica*. Montevideo ; 2006. p. 663-671.
76. GARROTE GUTIERREZ VH. Efecto antifúngico in vitro del aceite esencial de *organum vulgare* L. sobre *Candida albicans*. Tesis. Lima : Universidad Mayor de San Marcos , Facultad de Medicina ; 2019.
77. SACSQUISPE CONTRERAS R, VELÁSQUEZ POMAR J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. *Boletín*. Lima : Instituto Nacional de Salud, Laboratorio de Bacteriología Especial, Centro Nacional de Salud Pública - INS; 2002.
78. HERRERA HIDALGO M. Interpretación de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños*. 2004; 39(1).
79. MAILLAND. USE OF CHITOSAN FOR THE TREATMENT OF NAIL INFLAMMATORY DISEASES. United States Patent. 2014 Diciembre .
80. RODRIGUEZ ANDRADE C, RIOS SOTO M. Actividad antimicrobiana in vitro del extracto acuoso liofilizado de hojas de *Clibadium surinamense* L.(huaca) Iquitos ; 2013.
81. REINDERT STEVEN , GAELLA BOULET P, LOUIS MAES. Development of a novel in vitro onychomycosis model for the evaluation of topical antifungal activity. Belgium: University of Antwerp, Laboratory of Microbiology, Parasitology and Hygiene; 2015.
82. CATALUNYA UPD. Tiempo de Secado. Escola Politecnica Superior d Enginyera de Manresa. 2015.
83. OCAMPO CIFUENTES JC. Enseñanza-aprendizaje del concepto de acidez y Ph en grado decimo , bajo la metodología de la ingeniería didáctica. Bogotá : Universidad Nacional de Colombia , Facultad de Ciencias: Maestría en Enseñanza de las ciencias Exactas y Naturales; 2018.
84. MAMANI CALLACONDO N. Evaluación antimicrobiana "in vitro" del aceite esencial *Origanum vulgare* , frente a cepas de *Candida albicans*. TACNA: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann; 2016.
85. ACEVEDO D, NAVARRO M, MONROY L. Composición química del aceite esencial de hojas de orégano (*Origanum vulgare*). Cartagena : Universidad de Cartagena , Facultad de Ingeniería de Alimentos; 2013.

86. MAILLAND F. United States Patent POLICHEM , editor. Milan; 2014.
87. Guía de Estabilidad de Productos Cosméticos. Agencia Nacioanl de Vigilancia Sanitaria ANVISA. Calidad de Cosmeticos. 2005 Mayo ; 1.
88. Unidos CfdIE, editor. USP 25: Farmacopea de los Estados Unidos, Revisión; NF 20:. Veinte ed.; 2002.
89. Professional Beauty Association , Investigacion sobre la posibilidad de contaminacion microbiana en el esamlte de uñas. [Online].; 2008 [cited 2019 Enero 25. Available from: [https://probeauty.org/docs/nmc/micro\\_es.pdf](https://probeauty.org/docs/nmc/micro_es.pdf).

## ANEXOS

### ANEXO 1: IDENTIFICACIÓN BOTANICA DE *Origanum vulgare* L (ORÉGANO) HERBARIO VARGAS - UNSAAC

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- APARTADO POSTAL  
N° 921 - Cuzco - Perú
- FAX: 238156 - 238173 - 222312
- RECTORADO  
Calle Igaro N° 127  
Teléfono: 222271 - 224891 - 224181
- CIUDAD UNIVERSITARIA  
Av. de la Cultura N° 733  
Teléfonos: 228661 - 222512 - 222370 -  
222375 - 222226
- LOCAL CENTRAL  
Plaza de Armas s/n  
Teléfono: 227371 - 225721 - 224615
- MUSEO E INSTITUTO DE ARQUEOLOGIA  
Carrera del Almirante N° 103 - Teléfono 237390
- CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA  
San Antonio s/n Cuzco - Teléfono: 271409 - 271437
- COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"  
Av. de la Cultura N° 723  
"Estado Universitario" - Teléfono: 227192

---

### HERBARIO VARGAS (CUZ)

CERTIFICADO DE DETERMINACIÓN TAXONÓMICA N° 0 12-2019-HVC-FCB-UNSAAC

La directora del Herbario Vargas (CUZ) -Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cuzco (UNSAAC), deja constancia que: el señor **Juan Carlos Velázquez Carrasco** con código de matrícula N° 090280 Bachiller de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cuzco, ha presentado a la Dirección del Herbario Vargas CUZ una muestra vegetal herborizada para su determinación taxonómica (expediente N°002557), para el proyecto de tesis intitulado "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ESMALTE DE UÑAS ELABORADO USANDO EL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* (orégano) FRENTE A *Trichophyton rubrum* ATCC 28188". La que al ser diagnosticada por el M. Sc. Alfredo Tupayachi Herrera, utilizando claves dicotómicas, consulta con bibliografía especializada, y comparación con muestras del Herbario, concuerdan con la clasificación del grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group-APG IV, 2016).

N°	FAMILIA	ESPECIES
1	Lamiaceae	<i>Origanum vulgare</i> L.

Se le expide la presente certificación a petición formal de la interesada para los fines que vieran por conveniente.

Cusco, 09 de Julio del 2019

Blga. María Luisa Ochoa Cámara  
Directora del Herbario Vargas (CUZ)



## ANEXO 2. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* (ORÉGANO)

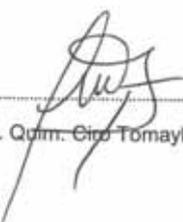
### CERTIFICADO DE ANALISIS

El que suscribe: Responsable del Laboratorio de Fitoquímica de la Escuela Profesional de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, deja Constancia.

Que el Bach. **Juan Carlos Velazque Carrasco**, de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, ha presentado el Laboratorio de Fitoquímica una muestra de aceite esencial de *Origanum vulgare* "Orégano" para su caracterización e identificación de componentes. Dicho material ha sido caracterizado utilizando el Cromatógrafo de Gases modelo THERMO con una columna capilar HP – 5MS (Polimetil xiloxano 19091S – 133) (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) – acoplado a un Espectrofotómetro de Masas. La identificación se basó en la comparación de las señales del espectro de masas de cada componente con los datos complicados en la librería NIST 11 y con base de datos de librería MAINLIB.

Se expide la siguiente constancia a solicitud del interesado para los fines que viera por conveniente.

Cusco, 11 de enero del 2019

  
-----  
Mgt. Quím. Gino Tomaylla Cruz

### ANEXO 3. ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* L. (ORÉGANO)

#### ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO

El que suscribe: responsable del Laboratorio de Bioquímica de la Escuela Profesional de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, deja Constancia.

Que el Bach. **Juan Carlos Velazque Carrasco**, de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, ha presentado el Laboratorio de Bioquímica una muestra de aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "Orégano" para su análisis físicoquímico donde se determinó (densidad, índice de refracción, índice de saponificación, índice de acidez, rotación óptica) donde se obtuvieron los siguientes resultados.

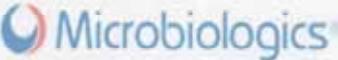
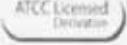
Propiedades	Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L.(orégano)
Densidad	0.8454 g/mL
Índice de refracción	1.3872
Índice de saponificación	0.0102
Índice de acidez	0.8265
Rotación óptica	-0.542

Se expide la siguiente constancia a solicitud del interesado para los fines que viera por conveniente.

Cusco, 5 de enero del 2019

  
.....  
Mgt. Quím. Ciro Tomaylla Cruz

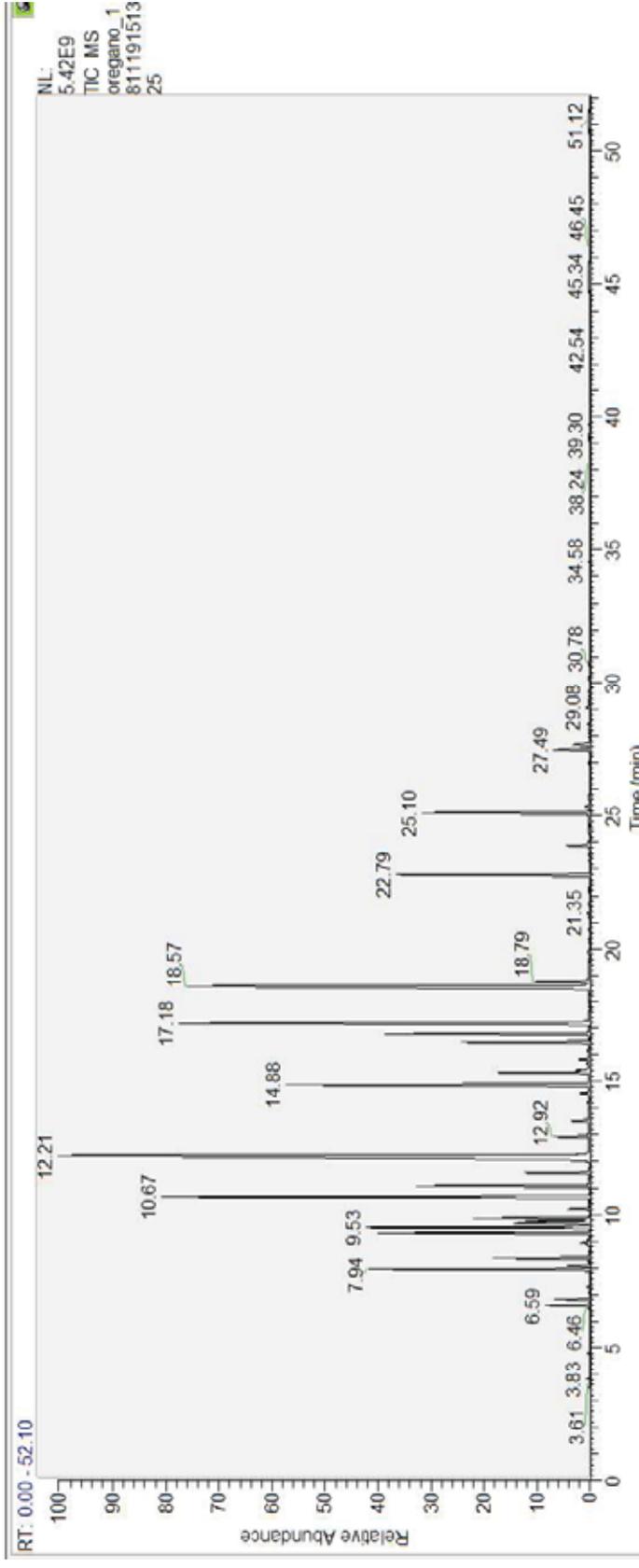
**ANEXO 4. CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE *Trichophyton rubrum* ATCC 28188**

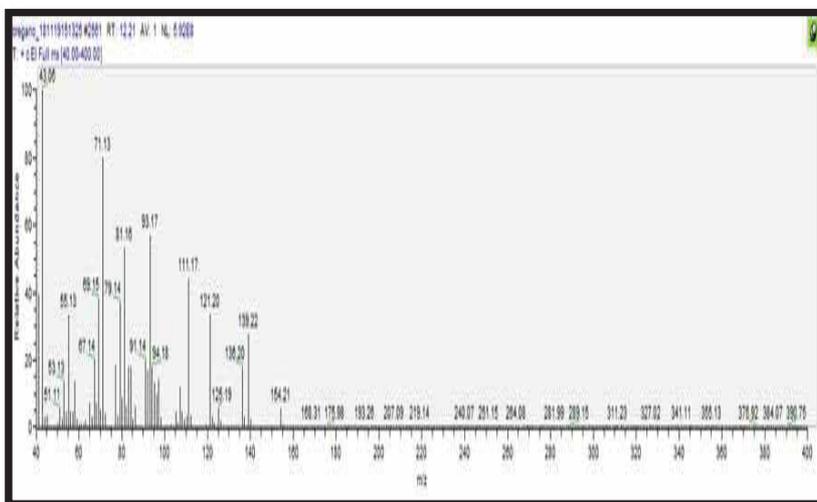
	
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release	
<b>Specifications</b> Microorganism Name: <i>Trichophyton rubrum</i> Catalog Number: 0444 Lot Number: 444-81** Reference Number: ATCC® 28188™** Purity: Pure Passage from Reference: 2	<b>Expiration Date:</b> 2020/1/31 <b>Release Information:</b> Quality Control Technologist: Tracy A Blenker Release Date: 2018/3/29
<b>Performance</b>	
<b>Macroscopic Features:</b> Large, white colonies with "fuzzy" appearance and smaller, dark wine-red colonies which turn white with dark wine-red reverse as culture ages. At 14 days, colonies and reverse may not be completely white.	<b>Medium:</b> Malt Extract Agar
<b>Microscopic Features:</b> 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.	<b>Method:</b> Lactophenol Blue (1)
<b>ID System: MALDI-TOF</b> See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> Dermatophyte Test Medium: positive (good growth at 7 days with agar turning deep pink)
 Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE	
<p>**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are 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> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;">   <small>ATCC Accredited Reference Material Producer CERT #2655.01</small> </div> <div style="text-align: center;">   <small>ATCC Licensed Derivative</small> </div> <div style="text-align: center;"> <small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">   <small>ATCC Accredited Testing Cert #2655.01</small> </div> <div style="text-align: center;"> <small>(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small> </div> </div>	

**ANEXO 5. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROFOTOMETRIA DE MASAS (CG - SM) DE Origanum vulgare L. (ORÉGANO)**

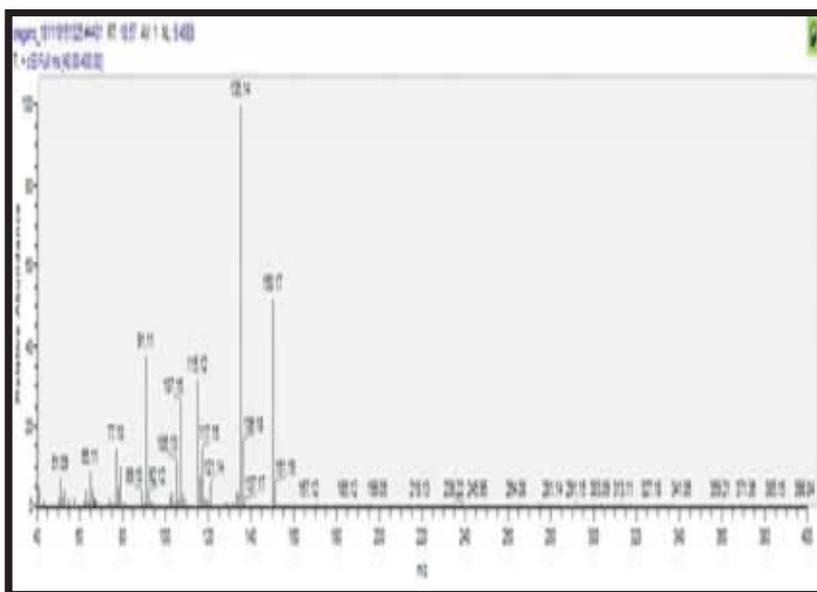
oregano\_18119151325

11/19/18 15:15:12

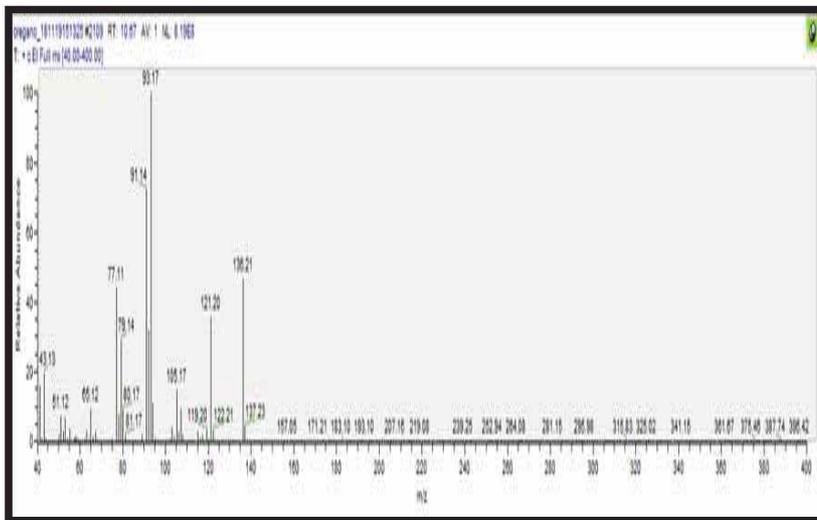




Espectro de la estructura de Terpenoil, cis -  $\alpha$   
**TR: 18.46**

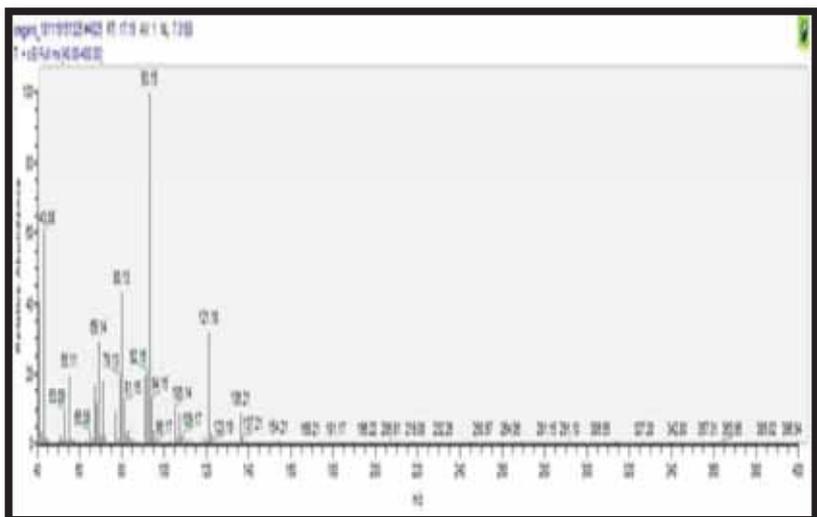


Espectro de la estructura de thymol  
**TR: 12.38**



Espectro de la estructura de c-terpinen

TR: 9.22



## ANEXO 6: CALCULOS DE LAS PROPIEDADES FISICOQUIMICOS DEL ACEITE ESENCIAL DE *ORIGANUM VULGARE* (ORÉGANO)

Densidad del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano)

$$D = \frac{4.27 \text{ g}}{5 \text{ mL}}$$
$$D = 0,854 \text{ g/mL}$$

Índice de acidez del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano)

$$IA = \frac{4.418 \times 56.11}{300 \text{ mg}}$$
$$IA = 0,826 \text{ mg}$$

Índice de saponificación del aceite esencial del *Origanum vulgare L.* (orégano)

$$IS = \frac{54.74 \times 0.1 \times 56.11}{300 \text{ mg}}$$
$$IS = 10,24$$

Rotación óptica del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano)

$$\text{Rotación óptica} = - 0.542$$

Índice de refracción del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* (orégano)

$$IR = 1.3872$$

## ANEXO 7. CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL ESMALTE DE UÑAS ANTIMICÓTICO.

### CONTROL MICROBIOLÓGICO DEL ESMALTE DE QUITOSANO AL 2% CON 70% DE ACEITE ESENCIAL DE *ORIGANUM VULGARE* (OREGANO)

**Solicitante:** Br. Juan Carlos Velazquez Carrasco

Para la tesis de investigación Intitulada "Evaluación de la actividad antimicótica del aceite esencial del *Origanum vulgare* (Orégano) frente a cepas ATCC de *Trichophyton rubrum*, y elaboración de una forma cosmética"

**Muestra:** Esmalte de quitosano al 2% con 70% de aceite esencial de *Origanum vulgare*

**Lugar y fecha:** Cusco 7 de febrero del 2019

**Indicadores microbiológicos:**

1. **Criterio imperativo:** Presencia de *Salmonella spp* (Agar SS)
2. **Criterio indicativo de higiene:** Número de Coliformes fecales- *Escherichia coli* (Caldo lactosado verde brillante bilis 2%)
3. **Criterio de alerta o límites críticos**
  - 3.1 Recuento de microorganismos Aerobios Mesófilos Viabiles (Agar Plate Count)
  - 3.2 Recuento de hongos y levaduras (agar sabouraud)

**Reporte de resultados de control biológico esmalte de quitosano al 2% con 70% de aceite esencial de *Origanum vulgare* (Orégano)**

CRITERIOS	REECUENTO EN LA DILUCION $10^{-1}$	LIMITES BIOLÓGICOS PERMISIBLES (LMP)	OBSERVACIONES
Criterio imperativo	Ausencia de salmonella spp	Ausencia de salmonella spp	La muestra cumple los LMP
Criterio indicativo de higiene	Numero de coliformes fecales <i>Escherichia coli</i> : ausencia	<i>Escherichia coli</i> : Ausencia	La muestra cumple los LMP
Criterio de alerta o límites críticos	Recuento de microorganismos aerobios mesófilos viabiles $< 10^{-2}$ UFC	$10^{-4}$ - $10^{-3}$ UFC	La muestra cumple los LMP
	Recuento de hongos y levaduras $10^{-2}$ UFC	$10^{-2}$ - $10^{-3}$ UFC	La muestra cumple los LMP

El método es el de la IMCSF (Comisión Internacional de Especializaciones Microbiológicas para Alimentos) Laboratorio General de calidad de Agua Ministerio de Salud.

**Conclusión:** La muestra cumple con los criterios de los Límites Microbiológicos Permisibles



*Hospital Regional - Cusco*  
LABORATORIO  
de Bacteriología y Microbiología

**ANEXO 8. FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE LA ESPECIE VEGETAL.**

<b>Especie vegetal:</b> <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano) <b>Fecha:</b>	
<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>DETALLES</b>
<b>Nombre científico</b>	<i>Origanum vulgare</i> L.
<b>Nombre común</b>	Orégano
<b>Familia</b>	Lamiaceae
<b>Género</b>	Origanum
<b>Especie</b>	<i>Vulgare</i>
<b>Característica principal</b>	
<b>Descripción general</b>	
<b>Lugar de recolección</b>	
<b>Región</b> <b>Provincia</b> <b>Distrito</b>	<b>Apurímac</b> <b>Andahuaylas</b> <b>Andahuaylas</b>
<b>Altitud</b>	2.836 ms. n. m.
<b>Temperatura</b>	
<b>partes usadas</b>	
<b>Raíz</b> ( )	<b>Flores</b> ( )
<b>Tallo</b> ( )	<b>Frutos</b> ( )
<b>Hojas</b> ( X )	<b>Corteza</b> ( )
<b>Recolector</b>	
<b>Observaciones</b>	

**ANEXO 9. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare L.* (ORÉGANO)**

<b>PESO DE HOJAS SECAS</b>	<b>ACEITE EXTRAÍDO</b>	<b>% DE RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL</b>

**ANEXO 10. CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICOS DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare L.* (ORÉGANO)**

<b>CARACTERISTICAS</b>	<b>RESULTADOS</b>
<b>OLOR</b>	
<b>COLOR</b>	
<b>SABOR</b>	

**ANEXO 11. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DEL ACEITE ESENCIAL DE**  
*Origanum vulgare L.* (ORÉGANO)

SOLVENTE	ACEITE ESENCIAL DE OREGANO
Agua destilada	
Metanol	
Etanol al 40 %	
Etanol al 70 %	
Etanol al 90 %	
Etanol absoluto	
Acetona	
Acetato de etilo	
Cloroformo	
Dimetilsulfoxido	
Benceno	
Hexano	

**Leyenda:**

Totalmente soluble : +++

Parcialmente soluble : ++

Muy poco soluble : +

Insoluble : -

**ANEXO 12. FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA (CMI)**

CONCENTRACIÓN	DIAMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm)			
	I	II	III	PROMEDIO
<b>ACEITE ESENCIAL OREGANO (%)</b>				
<b>100</b>				
<b>95</b>				
<b>90</b>				
<b>85</b>				
<b>80</b>				
<b>75</b>				
<b>70</b>				
<b>50</b>				
<b>25</b>				
<b>12.5</b>				
<b>TERBINAFINA</b>				
<b>DIMETILSULFOXIDO</b>				

**ANEXO 13. FICHA DE RECOLECCIÓN DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD FISICOQUÍMICOS Y ORGANOLÉPTICOS**

ORGANOLÉPTICOS Y FISICOQUÍMICOS	
<b>Aspecto</b>	
<b>Color</b>	
<b>Olor</b>	
<b>sabor</b>	
<b>pH</b>	

## ANEXO 14. ARCHIVO FOTOGRÁFICO



**Fotografía 1**

Ubicación de la especie en estudio,  
Andahuaylas, Apurímac.



**Fotografía 2**

Recolección de *Origanum vulgare* L.



**Fotografía 3**

Proceso de secado del *Origanum*  
*vulgare* L.



**Fotografía 4**

Obtención de hojas secas de  
*Origanum vulgare* L.



**Fotografía 5**

Extracción del aceite esencial de *Origanum vulgare L.* mediante el método de arrastre por vapor



**Fotografía 6**

Obtención del aceite esencial mediante decantación



**Fotografía 7**

Cepas ATCC, *Trichophyton rubrum*.



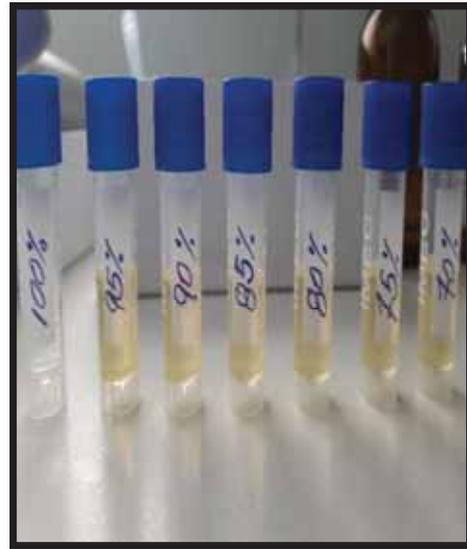
**Fotografía 8**

Activación de la cepa de *Trichophyton rubrum* en agar Sabouraud



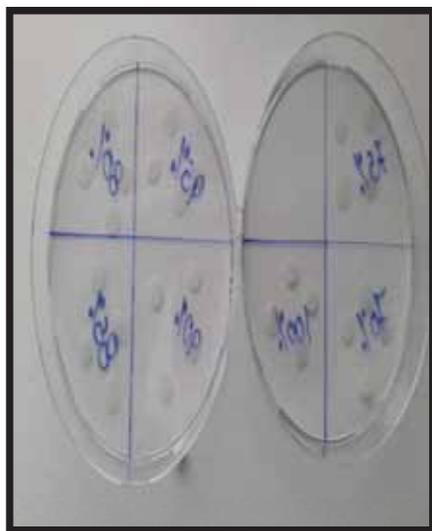
**Fotografía 9**

Preparación del inóculo de acuerdo a la escala 0.5 de McFarland



**Fotografía 10**

Preparación de las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Origanum vulgare* L.



**Fotografía 11**

Preparación de los discos a diferentes concentraciones del aceite esencial



**Fotografía 12**

Preparación del medio de cultivo Agar Sabouraud



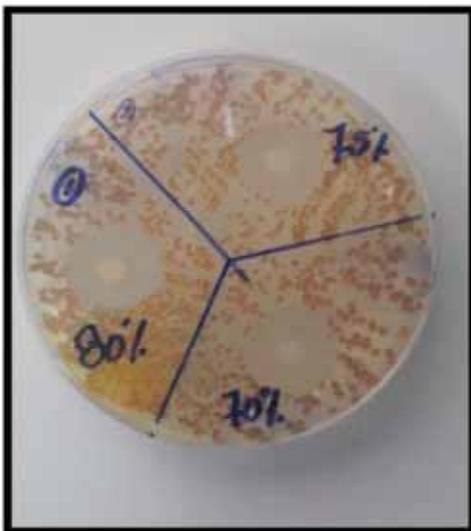
**Fotografía 13**

Plaques con agar Sabouraud



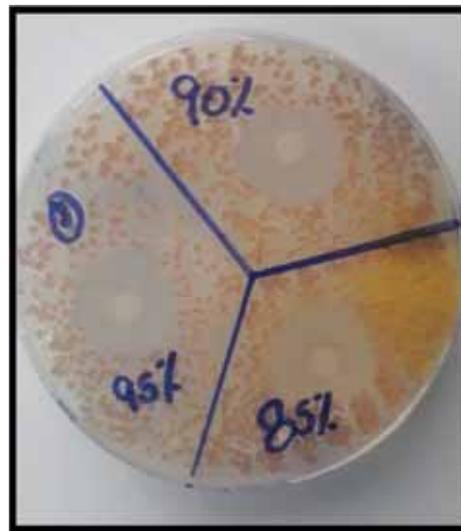
**Fotografía 14**

Incubación a 26 °C durante 7 días



**Fotografía 15**

Resultados de las concentraciones de aceite esencial 70%, 75% y 80 %



**Fotografía 16**

Resultados de las concentraciones de aceite esencial 85%, 90% y 95%



**Fotografía 18**

Resultados de las concentraciones de aceite esencial al 100% y el DMSO.



**Fotografía 17**

Observación y medición de los halos de inhibición formados por el aceite esencial de *Origanum vulgare* L.



**Fotografía 19**

Insumos para la preparación de la película de quitosano



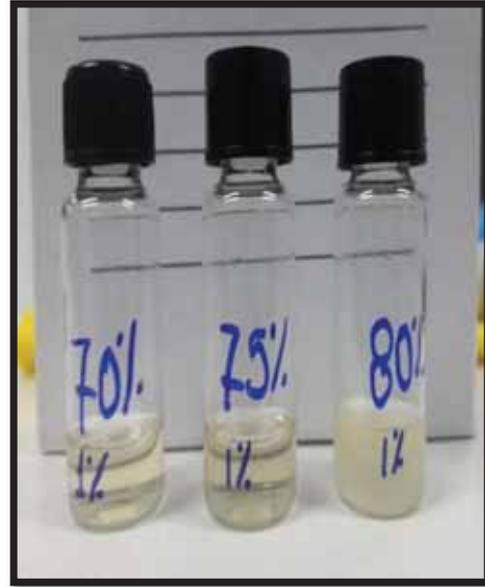
**Fotografía 20**

Preparación de la película de quitosano, agitación durante 12 horas



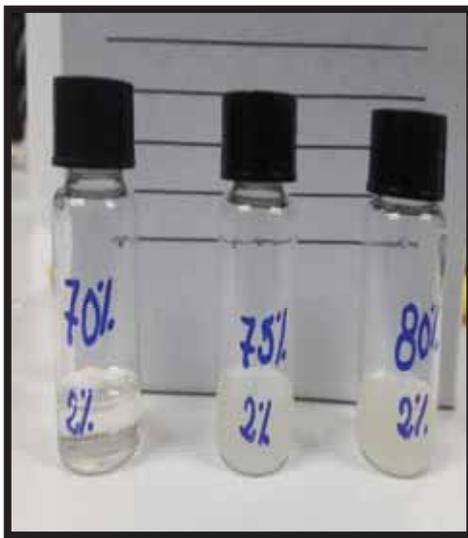
**Fotografía 21**

Insumos para la preparación del esmalte



**Fotografía 22**

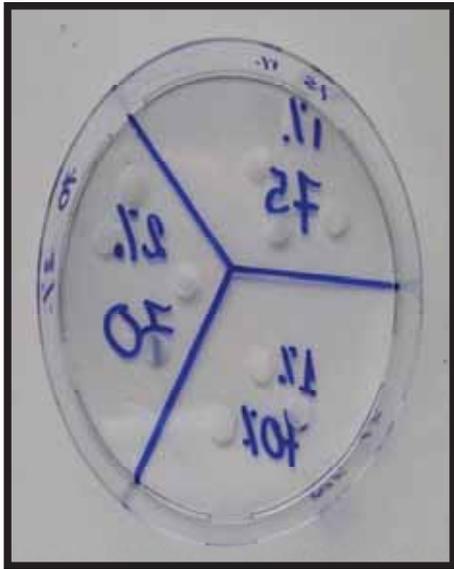
Elaboración del esmalte al 1 % de quitosano con diferentes concentraciones de aceite esencial 70%,75% y 80%



**Fotografía 23**

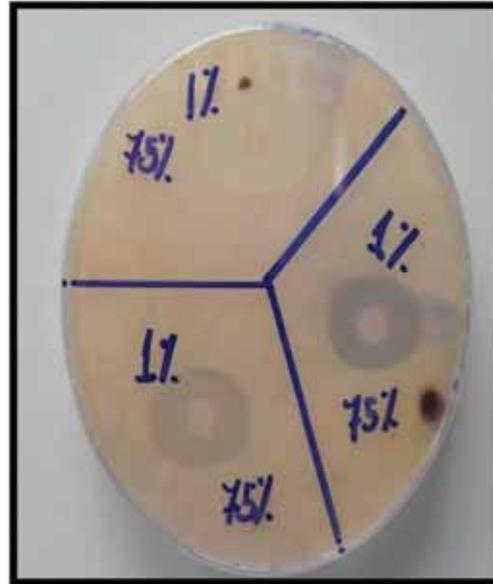
Elaboración del esmalte al 2 % de quitosano con diferentes concentraciones de aceite esencial 70%,75% y 80%

## Pruebas de inhibición del esmalte formulado



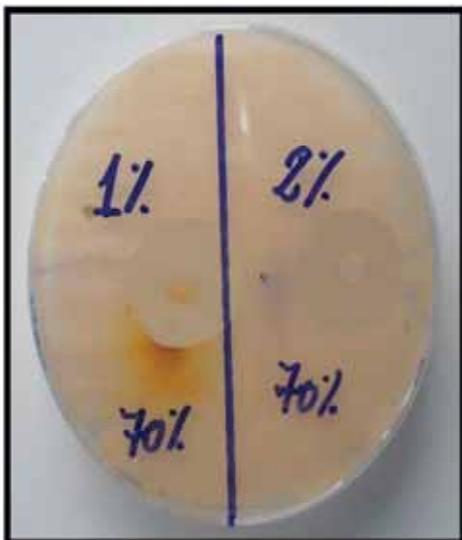
**Fotografía 24**

Preparación de los discos de sensibilidad



**Fotografía 25**

Formación de halos a diferente concentración



**Fotografía 26**

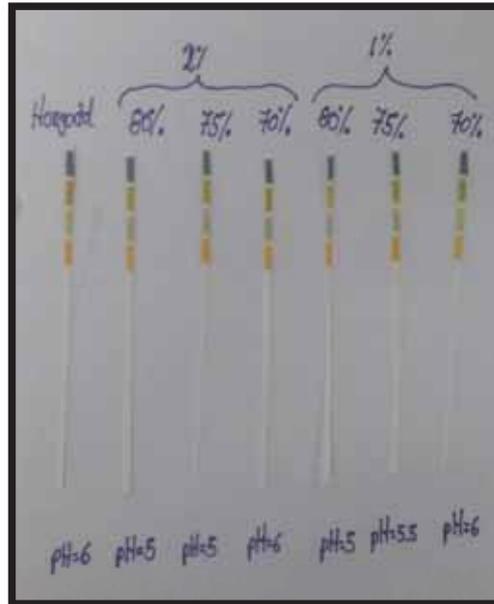
Formación de halos a diferente concentración

## PRUEBAS ORGANOLÉPTICAS Y FÍSICOQUÍMICAS DEL ESMALTE



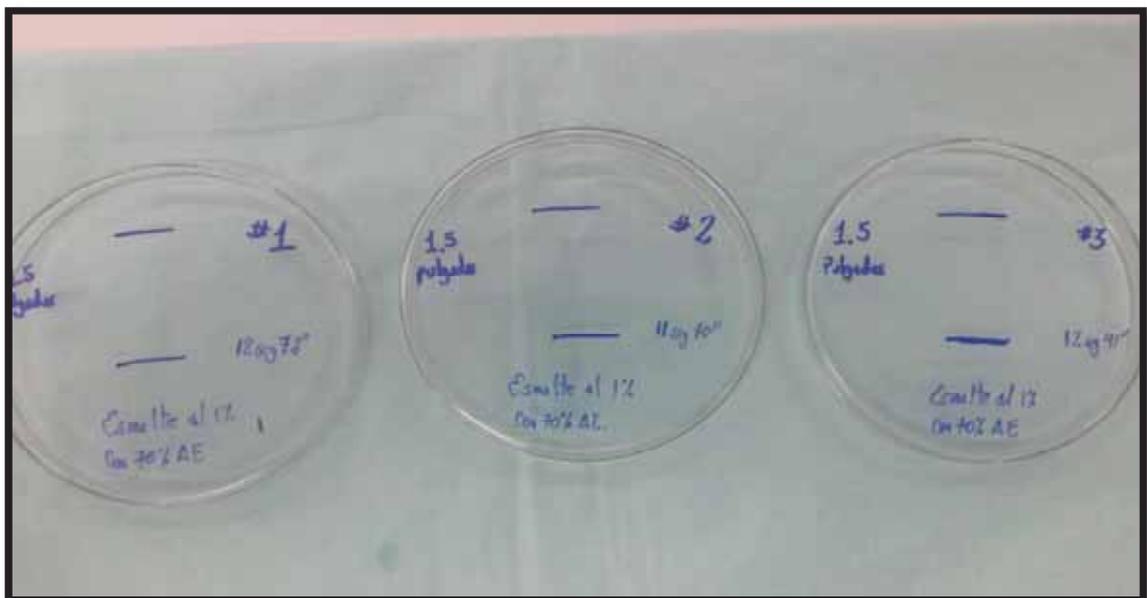
Fotografía 27

Tiempo de secado



Fotografía 28

Medición del pH del esmalte



Fotografía 29

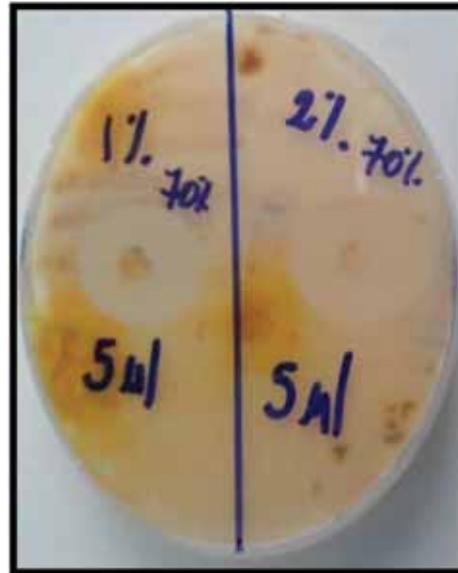
Suavidad para fluir

## MODELO DE PENETRACIÓN DE UÑA



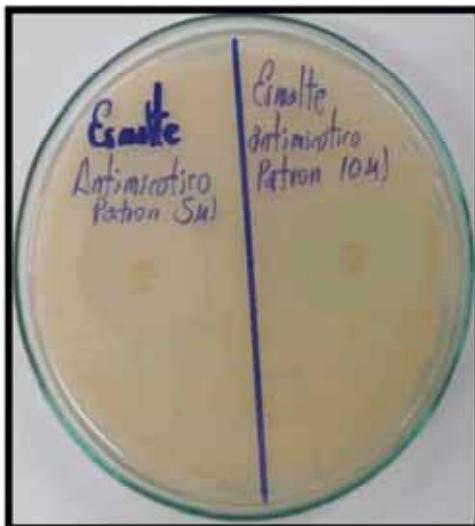
Fotografía 30

Discos de uñas, a diferente concentración de esmalte



Fotografía 31

Formación de halos de inhibición a diferente concentración del esmalte



Fotografía 32

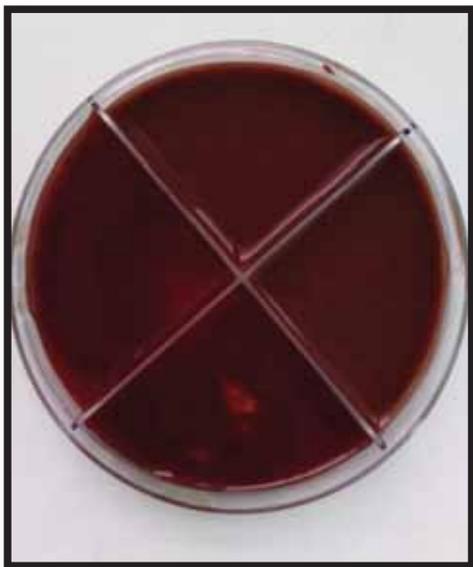
Formación de halos del esmalte patrón



Fotografía 33

Medición de halos del esmalte patrón

## ANALISIS MICROBIOLÓGICO DEL ESMALTE



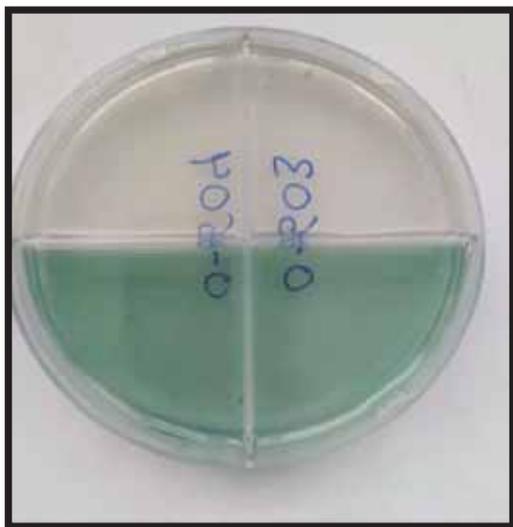
**Fotografía 34**

Agar sangre y chocolate para la determinación de *staphylococcos* y *streptococcos*



**Fotografía 35**

Agar Mac conkey para determinación de enterobacterias



**Fotografía 36**

Cled (verde) para *Escherichia coli* y *pseudomona*