



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD IN VITRO DE *Malassezia globosa*
FRENTA A LOS HIDRODESTILADOS DE *Calendula officinalis*, *Rosmarinus
officinalis* Y *Salix alba*.”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

ALEXIS ROSANA ALULEMA SALGUERO

**RIOBAMBA – ECUADOR
2010**

DEDICATORIA

A mis padres por su sacrificio para darme todo lo que tengo y sobre todo la educación

A mis hermanos por sus consejos y su colaboración en el camino de mi formación profesional

A mis amigos porque aunque son pocos, son verdaderos

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme una familia tan unida

A mi familia por su apoyo incondicional en todos los momentos de mi vida

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo por abrirme las puertas al camino de la profesionalización

A la Dra. Cumandá Játiva por su valiosa colaboración y asesoramiento en la dirección de la presente Tesis

Al Dr. Francisco Portero, Miembro del Tribunal de Tesis por el gran aporte brindado en la elaboración del trabajo

A todas las personas que no son nombradas pero que de una u otra manera colaboraron para la culminación de este trabajo de investigación

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

El Tribunal de Tesis certifica que: El trabajo de investigación: “DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD IN VITRO DE *Malassezia globosa* FRENTE A LOS HIDRODESTILADOS DE *Calendula officinalis*, *Rosmarinus officinalis* Y *Salix alba*”, de responsabilidad de la señorita egresada Alexis Rosana Alulema Salguero, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Cumandá Játiva
DIRECTORA DE TESIS

Dr. Francisco Portero
MIEMBRO DE TRIBUNAL

Dra. Janeth Gallegos
DELEGADA DE LA DECANA

NOTA DE TESIS ESCRITA

Yo, Alexis Rosana Alulema Salguero, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis; y el patrimonio intelectual de la Tesis de Grado, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

ALEXIS ROSANA ALULEMA SALGUERO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

°C	Grados celsius
C ₁₂	Carbono 12
C ₁₄	Carbono 14
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta precisión
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
cm	Centímetro
DA	Dermatitis Atópica
DS	Dermatitis Seborreica
DCA	Diseño completamente al azar
g	Gramo
HCl	Ácido Clorhídrico
i.v.	Intra venoso
Kg	Kilogramo
µm	Micrómetro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
pH	Potencial de hidrógeno
PV	Pitiriasis versicolor
sp	Especie
spp	Especies
UFC	Unidad Formadora de Colonias

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE CUADROS

ÍNDICE DE FIGURAS

ÍNDICE DE ANEXOS

INTRODUCCIÓN

1.	MARCO TEÓRICO.....	1
1.1	Genero <i>Malassezia</i>	1
1.1.1	<i>Malassezia globosa</i>	2
1.1.1.1	Características morfológicas macroscópicas y microscópicas.....	2
1.1.1.2	Características fisiológicas y bioquímicas.....	3
1.1.1.3	Características ecológicas y epidemiológicas.....	3
1.2	Dermatitis seborreica.....	4
1.2.1	Medidas farmacológicas.....	4
1.2.2	Tratamientos tópicos.....	4
1.3	Vegetales utilizados.....	6
1.3.1	Investigaciones previas de la actividad de los vegetales utilizados..	6
1.3.2	<i>Calendula officinalis</i>	7
1.3.2.1	Descripción Botánica.....	8
1.3.2.2	Origen y distribución	8
1.3.2.3	Composición química	8
1.3.2.4	Farmacología y actividad biológica.....	9
1.3.3	<i>Rosmarinus officinalis</i>	9
1.3.3.1	Descripción Botánica.....	10
1.3.3.2	Composición Química.....	10
1.3.3.3.	Farmacología y Actividad biológica.....	11
1.3.4	<i>Salix alba</i>	11
1.3.4.1	Descripción botánica.....	12
1.3.4.2	Composición Química.....	12
1.3.4.3	Farmacología y actividad biológica.....	13
1.4	Fundamentos de los métodos de análisis.....	13
1.4.1	Método de preparación de extractos.....	13
1.4.1.1	Hidrodestilación.....	14
1.4.2	Tamizaje Fitoquímico.....	14
2.3.4	Evaluación de la Actividad Antimicótica.....	26

2.3.4.1	Preparación del Medio de Cultivo (Agar Dixon).....	26
2.3.4.2	Obtención y Aislamiento de <i>Malassezia globosa</i>	26
2.3.4.3	Determinación de la Actividad Antifúngica de los Hidrodestilados (Método de Mitscher).....	29
2.3.5	Diseño Experimental.....	31
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
3.1	Características organolépticas de los hidrodestilados.....	32
3.2	Tamizaje fitoquímico.....	33
3.2.1	<i>Calendula officinalis</i>	33
3.2.2	<i>Rosmarinus officinalis</i>	33
3.2.3	<i>Salix alba</i>	34
3.3	Crecimiento de <i>Malassezia globosa</i> en agar Dixon.....	34
3.4	Determinación de la Actividad Antimicótica.....	35
4.	CONCLUSIONES.....	38
5.	RECOMENDACIONES.....	40
6.	RESUMEN.....	41
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	42
8.	ANEXOS.....	48

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO No. 1	Características organolépticas de los hidrodestilados	32
CUADRO No. 2	Tamizaje fitoquímico de <i>Calendula officinalis</i>	33
CUADRO No. 3	Tamizaje fitoquímico de <i>Rosmarinus officinalis</i>	34
CUADRO No. 4	Tamizaje fitoquímico de <i>Salix alba</i>	34
CUADRO No. 5	Pruebas bioquímicas de crecimiento de <i>Malassezia globosa</i> ...	35
CUADRO No. 6	Descripción de los tratamientos.....	36
CUADRO No. 7	Evaluación de la actividad anti <i>malassezia globosa</i> de los hidrodestilados.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA No. 1	Estructura química de Ketoconazol.....	5
FIGURA No. 2	Flujograma de trabajo.....	29
FIGURA No. 3	Esquema de siembra de microorganismos (Método de Mitscher).....	30

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA No. 1	<i>Malassezia globosa</i> . Azul lactofenol X100.....	2
FOTOGRAFÍA No. 2	<i>Malassezia globosa</i> . Agar Dixon.....	3
FOTOGRAFÍA No. 3	<i>Calendula officinalis</i>	7
FOTOGRAFÍA No.4	<i>Rosmarinus officinalis</i>	10
FOTOGRAFÍA No.5	<i>Salix alba</i>	12

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO No. 1	Toma de muestra de un individuo afectado.....	50
ANEXO No. 2	Cepas de <i>Malassezia globosa</i> en agar Dixon.....	50
ANEXO No. 3	Cambio de caja de las cepas obtenidas en el primer aislamiento.....	51
ANEXO No. 4	Aislamiento de las cepas obtenidas.....	51
ANEXO No. 5	Segundo aislamiento de las cepas obtenidas.....	52
ANEXO No. 6	Prueba bioquímica, catalasa 1.....	52
ANEXO No. 7	Prueba bioquímica, catalasa 2.....	53
ANEXO No. 8	Prueba bioquímica, crecimiento en tween negativo.....	53
ANEXO No. 9	Prueba bioquímica, crecimiento en tween positivo.....	54
ANEXO No. 10	Prueba bioquímica, desdoblamiento de esculina.....	54
ANEXO No. 11	Prueba bioquímica, desdoblamiento de esculina positivo	55
ANEXO No. 12	Prueba bioquímica, desdoblamiento de esculina, comparación entre blanco, positivo y negativo.....	55
ANEXO No. 13	Ensayo de Benedict (cloruro férrico).....	56
ANEXO No. 14	Ensayo de Rosenthaler.....	57
ANEXO No. 15	Ensayo de Sudan iii.....	57
ANEXO No. 16	Ensayo de Baljet.....	58
ANEXO No. 17	Ensayo de Dragendorf.....	58
ANEXO No. 18	Caldo Dixon.....	59
ANEXO No. 19	Evaluación de actividad anti <i>Malassezia globosa</i> , hidrodestilado de <i>Rosmarinus officinalis</i>	59
ANEXO No. 20	Evaluación de actividad anti <i>Malassezia globosa</i> , hidrodestilado de <i>Calendula officinalis</i>	60
ANEXO No. 21	Evaluación de actividad anti <i>Malassezia globosa</i> mezcla de los hidrodestilados de <i>Calendula officinalis</i> y <i>Salix alba</i>	60
ANEXO No. 22	Evaluación de actividad anti <i>Malassezia globosa</i> , blanco	61

INTRODUCCIÓN

Una de las enfermedades dermatológicas que afecta a más del 50% de personas a nivel mundial es la Dermatitis seborreica, esta enfermedad es causada por una levadura conocida como *Malassezia globosa*. La Dermatitis Seborreica (DS), se presenta como descamación e inflamaciones sobre las áreas del cuerpo ricas en glándulas sebáceas, como la cara y el cuero cabelludo, siendo estas el medio idóneo para el desarrollo de dicha levadura. (19)

La mayoría de las especies del género *Malassezia* forman parte de la biota cutánea normal humana y pueden ser aisladas desde diversas áreas del cuerpo, principalmente de aquellas ricas en glándulas sebáceas. Esto se debe a que estos hongos tienen un defecto en la síntesis de los ácidos grasos, que se manifiesta en el requerimiento de ácidos grasos exógenos. Esta parece ser la razón por la cual estos organismos son prevalentes en piel con alta producción seborreica. Bajo la influencia de ciertos factores como son, los factores predisponentes endógenos que incluyen la piel grasa, hiperhidrosis, factores hereditarios, tratamiento con corticosteroides, malnutrición e inmunodeficiencias. Los factores exógenos más importantes son temperatura y humedad relativa elevadas; estos organismos pueden volverse patógenos y participar en diversas enfermedades, tales como Pitiriasis Versicolor (PV), foliculitis, Dermatitis Seborreica, algunas formas de dermatitis atópicas, asociarse a otros procesos dermatológicos como la psoriasis e incluso producir infecciones sistémicas. (1)(2)(3)(4)(5)(6)(7)(8)(9)(10)(11)(12)

Actualmente el tratamiento para las micosis superficiales es tópico mediante la utilización de imidazoles como el Ketoconazol al 2%, pero los principales inconvenientes en su utilización son los efectos sobre el sistema endocrino y reproductor, así como su toxicidad hepática y renal, factores que limitan su uso. Estos antimicóticos tienen un alto costo y el prolongado tiempo que demanda el tratamiento lo encarece aún más, por lo cual muchos de los pacientes, cuando inician la terapia, dejan inconclusa y no llegan a la curación. (4)(18)

El empleo de plantas medicinales y medicamentos herbarios ha tenido un marcado y ascendente auge en el ámbito mundial a partir de que la OMS llamó a introducir recursos medicinales tradicionales en los sistemas de salud en 1977. El hombre las ha utilizado desde su existencia y han sido por siglos los medicamentos tradicionales populares de las grandes mayorías y de diversas etnias y culturas. Recientemente autoridades sanitarias de algunos países destacaron la importancia de aplicar métodos científicos para la selección de las plantas, la estandarización de sus extractos y la comercialización del producto final, que permitan el tratamiento de determinadas afecciones. (20)(21)(22)

Datos etnomédicos indican que para el tratamiento de la Dermatitis Seborreica se aplican hidrodestilados de vegetales como *Calendula officinalis*, *Rosmarinus officinalis* y *Salix alba*, que en este trabajo investigativo se evaluaron in Vitro sobre la cepa de la levadura causante de la enfermedad Dermatitis Seborreica.

La experimentación “*in vitro*” se inicia con el aislamiento del microorganismo del cuero cabelludo del individuo afectado, utilizando agar Dixon como medio de cultivo. Luego la evaluación de inhibición del crecimiento de la cepa se realizó utilizando el método de Mitscher, en el cual se evalúa el crecimiento o no, de las cepas del hongo frente a los diferentes hidrodestilados y sus combinaciones, tomando como referencia la inhibición del crecimiento frente a una solución de Ketoconazol al 2%, la inhibición del microorganismo es el resultado positivo para la verificación de la actividad.

Esta investigación tiene como objetivos: determinar la sensibilidad para *Malassezia globosa* “*in vitro*” de hidrodestilados de *Calendula officinalis*, *Rosmarinus officinalis* y *Salix alba*. Obtener los hidrodestilados por arrastre de vapor de agua de cada uno de los vegetales frescos. Aislar “*in vitro*” el hongo *Malassezia globosa*, agente causal de la caspa. Realizar un estudio de sensibilidad del agente causal frente a los hidrodestilados de los tres vegetales, y sus mezclas.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 GÉNERO *Malassezia*

Las especies del género *Malassezia* son organismos levaduriformes que han ido adquiriendo una importancia considerable por su asociación a procesos patológicos como agentes de micosis superficiales o de infecciones sistémicas, siendo hoy consideradas entre los patógenos oportunistas emergentes. Estas levaduras constituyen una parte importante de la biota normal de la piel, tanto de animales como de humanos, aunque pueden comportarse como patógenos oportunistas si encuentran alteraciones de la piel así como un microclima adecuado para su desarrollo. Son importantes algunos factores endógenos y exógenos que pueden influir en su desarrollo; podemos considerar algunos como la temperatura y humedad relativa altas, piel grasa, tratamiento con corticosteroides y problemas de inmunodeficiencia. (15)

Un rasgo fisiológico distintivo que poseen estas levaduras es el de utilizar los lípidos como única fuente de carbono. Esta afinidad por los lípidos varía entre las especies del género, pudiéndose hablar de especies lipodependientes aquellas que necesitan para su desarrollo ácidos grasos de cadena larga (C_{12} a C_{24}) y de levaduras no lipodependientes que pueden crecer en presencia de ácidos grasos de cadenas cortas, generalmente presentes en los medios de cultivo habituales en el laboratorio. (15)

Comúnmente las levaduras lipodependientes son causantes de pitiriasis versicolor (PV) y se han asociado con patologías cutáneas en el hombre tales como dermatitis seborreica (DS), foliculitis y dermatitis atópica (DA). Asimismo, se han relacionado con infecciones

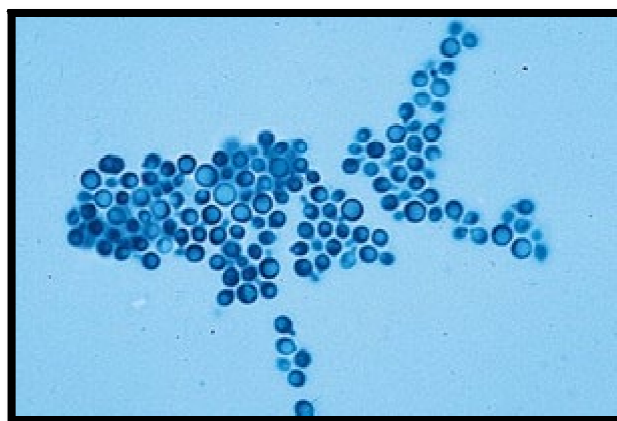
sistémicas principalmente en personas inmunodeprimidas y en neonatos prematuros que han recibido alimentación parenteral rica en lípidos. (15)

1.1.1. *Malassezia globosa*

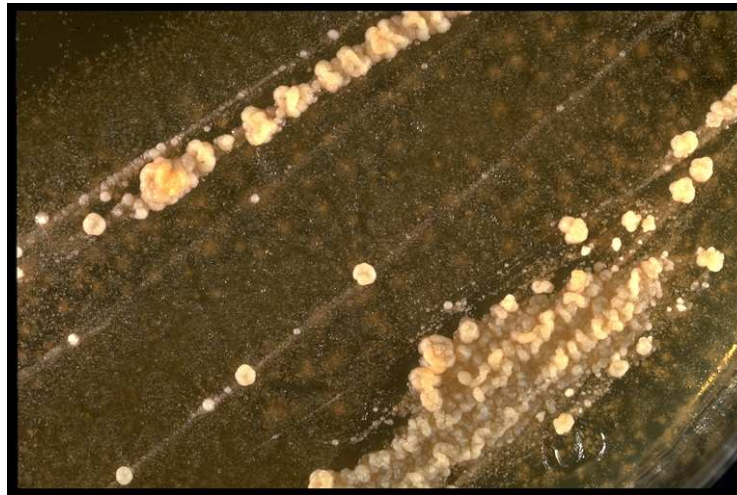
1.1.1.1. Características morfológicas macroscópicas y microscópicas.

En medio Dixon modificado a 32°C después de siete días de incubación las colonias son elevadas, plegadizas y rugosas, de 4 mm de diámetro en promedio. La textura de estas levaduras generalmente es áspera y quebradiza. Presentan células esféricas, con un diámetro que varía entre 2,5 a 8 µm de diámetro, con gemas formadas en una base angosta de la célula. (15)

A diferencia de las otras especies, las cicatrices después de la gemación no se desarrollan en forma prominente. Algunas veces pueden presentar filamentos cortos localizados en el origen de la gema. En ocasiones pueden ocurrir ramificaciones en el punto de unión de la célula madre. (15)



Fotografía. 1 . *Malassezia globosa*. Azul-lactofenol. X100.



Fotografía. 2 . *Malassezia globosa*. Agar Dixon

1.1.1.2. Características fisiológicas y bioquímicas.

Malassezia globosa pertenece a las levaduras que requieren la adición al medio de ácidos grasos de cadena larga para su desarrollo. No crece en agar glucosa/peptona conteniendo Tweens 20, 40 y 80 como única fuente lipídica. Sin embargo, en ocasiones, al igual que *M. obtusa* y *M. restricta*, se forma un anillo de precipitación alrededor del pocillo que contiene Tween 40, sin ningún crecimiento visible. (15)

1.1.1.3. Características ecológicas y epidemiológicas.

Dentro de las especies lipodependientes *M. globosa* se aísla principalmente de casos de PV y DS, ya sea sola o en asociación con otras especies del género *Malassezia*. En individuos con DS, *M. globosa* representó el 72% del total de las cepas aisladas. (15)

En los primeros trabajos relacionados con la caspa, frecuentemente se encontraban dos tipos de hongos, *P. ovale* y *P. orbiculare*, llamados así en base a su morfología (células globosas y redondas, respectivamente). Posteriormente, estas levaduras asociadas con la caspa fueron agrupadas bajo la especie de *M. furfur* serovariedad C (*M. restricta*) y serovariedad B (*M. globosa*), respectivamente. Actualmente, la aplicación de métodos moleculares en la diferenciación de especies de *Malassezia* presentes en cuero cabelludo,

ha demostrado que *M. globosa* es una de las especies predominantes. En este estudio no se encontró ninguna evidencia de *M. furfur sensu stricto*, lo cual indica que es posible descartarla como el principal agente causal de la caspa. (15)

1.2. DERMATITIS SEBORREICA

La dermatitis seborreica (DS) clínicamente se presenta como lesiones descamativas e inflamatorias en áreas del cuerpo ricas en glándulas sebáceas, principalmente frente, surcos nasogenianos, pecho, región externa e interescapular y oídos, ocasionalmente en axilas e ingle. Las lesiones son rojizas y cubiertas de escamas grasosas.

Malassez en 1874 fue el primero en asociar a *Malassezia* con descamaciones del cuero cabelludo. La relación entre DS y *Malassezia* fue también sugerida por Sabouraud en 1932. En los últimos años el género *Malassezia* ha sido considerado importante en la etiología de esta afección, debido a la observación de un alto número de levaduras lipofílicas en los materiales clínicos, de la efectividad de los tratamientos antimicóticos y de la recolonización en los caso de recurrencia.

La caspa es una forma de DS descamativa no inflamatoria, confinada al cuero cabelludo, que a veces puede referir cierto prurito. (12)

1.2.1. MEDIDAS FARMACOLÓGICAS

Los antifúngicos se los puede utilizar de forma tópica o administrarlos sistémicamente. En la mayoría de los caso de las dermatomicosis cutáneas será suficiente el tratamiento tópico, siendo de elección los imidazólicos tópicos y las alilaminas (terbinafina).

1.2.2. TRATAMIENTOS TÓPICOS

No se debe olvidar que hay productos con propiedades antifúngicas inespecíficas y que se pueden usar como coadyuvantes, sobre todo en las micosis cutáneas inflamatorias o con exudación, siendo medidas de bajo coste. los antifúngicos tópicos son sustancias

químicas cuya acción antimicótica se debe a su interacción sobre diversas sustancias que intervienen en el desarrollo y metabolismo del hongo, originando la inhibición de su crecimiento o su muerte.

Entre los antifúngicos tópicos más utilizados están los azoles tópicos que junto a las alilaminas, en la actualidad son los fármacos de elección, para casi todos los tipos de micosis. Son fungistáticos, aunque algunos de ellos, a dosis altas, puede comportarse como fungicida. Se encuentran disponibles en muy diversas formas galénicas (cremas, polvos, geles, soluciones, etc.).

Uno de los principales azoles tópicos es el ketoconazol, es activo por vía oral, pero por esta vía, debido a su moderado efecto hepatotóxico, ha sido sustituido por los modernos antifúngicos. Tiene buena actividad sobre dermatofitos y *Candida*, siendo también útil en la pitiriasis versicolor. Mantiene una gran actividad antiinflamatoria. Se usa en concentraciones al 2% en distintas formas galénicas (crema, gel, polvos, óvulos). En la actualidad se sigue utilizando en la dermatitis seborreica (gel, champú). (5)

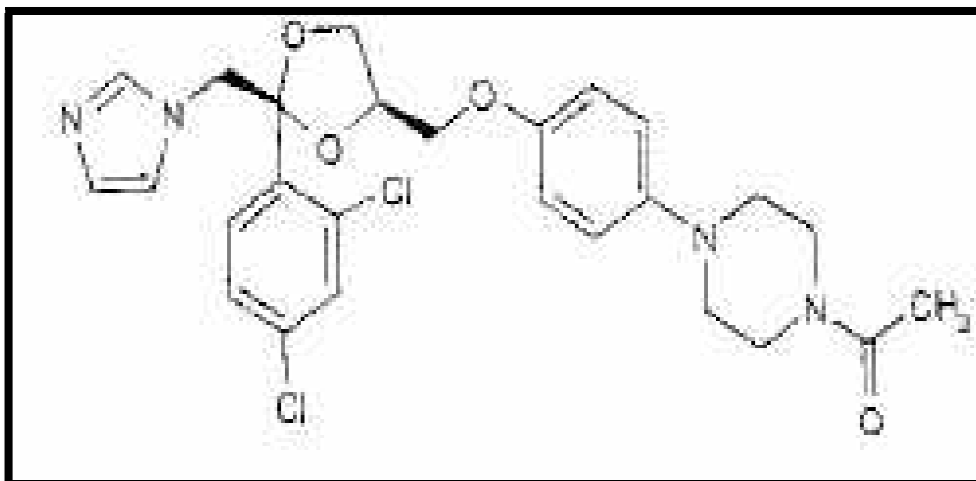


Fig. 1 . Estructura química de Ketoconazol

1.3. VEGETALES UTILIZADOS

1.3.1. INVESTIGACIONES PREVIAS DE LA ACTIVIDAD DE LOS VEGETALES UTILIZADOS

Según Marc Molli Marquès, Técnico Forestal y fitoterapeuta, la Caléndula y el Romero tienen actividad antifúngica, no así el Sauce al que solo le atribuye propiedades analgésicas. Y entre otras propiedades de la caléndula y el romero tenemos:

- Caléndula, (*Calendula officinalis*), flores: acné, irritaciones cutáneas, picaduras, cicatrizante, ulceraciones dérmicas, vulvovaginitis, amenorrea, disquinesia hepatobiliar, parásitos intestinales, antipruriginosa, fungicida.
- Romero, romaní(*Rosmarinus officinalis*): hojas, colerética, colagoga, antiinflamatoria, antioxidante, antibacteriano, antifúngica, hepatoprotectora, inmunoestimulante, estimulante, migrañas, antialopecia, ginecología. (7)
- Así también en el Museo de Sitio de Plantas Medicinales Gallego Otero. Cuba afirma que las Propiedades medicinales conocidas del Romero es: Antiséptico general y su forma de empleo es en Jarabes, lociones, shampoo, cremas (18)

Jean Bruneton afirma que el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* posee actividad in vitro antibacteriana y antimicótica, al igual que el extracto etanólico al 80% de la *Caléndula officinalis*, obtenido a partir de la droga desecada, como la tintura madre homeopática poseen propiedades antibacterianas in vitro.

De acuerdo con el libro Plantas medicinales aprobadas en Colombia Escrito por Ramiro Fonnegra G, Silvia Luz Jiménez R afirma que las propiedades de la caléndula, o de algunos de sus compuestos químicos, comprobadas científicamente: estudios en ratas muestran actividad antiinflamatoria y acción inhibitoria de la infiltración leucocitaria. Las flores de caléndula han demostrado actividad inmunomoduladora. Los polisacáridos de la caléndula estimulan la fagocitosis en células polimorfonucleares humanas in vitro e in vivo. El extracto hidroalcohólico exhibe actividad antibacteriana (frente a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus fecales*), antimicótica frente a *Trichomonas vaginales* y antiviral (frente al virus influenza y virus herpes simple). Advertencias: puede producir irritación e

hipersensibilidad. El uso externo debe ser en dosis bajas a causa de los efectos secundarios tales como irritación de la piel y mucosas, puede, incluso llegar a ser vesicante. (9)

En la Comunicación Corta de la Empresa Laboratorio Farmacéutico "Mario Muñoz" Cuba, se ha realizado el siguiente estudio:

EXTRACTO ACUOSO DE *Calendula officinalis*. ESTUDIO PRELIMINAR DE SUS PROPIEDADES

Por Lic. Bárbara Águila Gil, Lic. Rosa Menéndez Castillo, Ing. Claribel González Roque y Téc. David Fernández Fernández.

En el cual se afirma que al extracto acuoso de caléndula obtenido se le realizó análisis farmacológico preliminar para comprobar sus propiedades, teniendo como respuesta que el extracto responde como antimicótico ante hongos dermatofitos. (9)

1.3.2. *Calendula officinalis*

Nombre científico:	<i>Calendula officinalis</i>
Nombre común:	Caléndula, maravilla
Familia:	Asteraceae



Fotografía.3 . *Calendula officinalis*

1.3.2.1.Descripción Botánica

Planta herbácea, anual, de color verde claro y de 30 a 60 cm de altura. En los primeros estadios la planta está conformada por una roseta basal de hojas, posteriormente desarrolla tallos angulosos y pubescentes a menudo ramificados desde la base. Las hojas son oblongolanceoladas o espatuladas, alternas de hasta 13 cm de largo. En los extremos de los tallos se encuentran los capítulos florales cuyo diámetro oscila entre 3 y 6 cm y están formados por flores liguladas marginales y tubulares en el centro. El involucre es gris-verdoso en forma de platillo de 1,5 a 3 cm de diámetro, el receptáculo desnudo, plano o ligeramente prominente, su fruto es en aquenio. (3)

1.3.2.2.Origen y distribución

Se plantea que es originaria de Egipto y cultivada en Europa en el siglo XII, luego se extendió por el resto del mundo. Existe subespontánea por toda la región mediterránea, crece fácilmente durante los meses de verano en las islas Británicas y goza de gran fama como planta ornamental cultivada en patios, jardines, macetas, etcétera. (3)

Extensamente se cultiva desde el siglo XVII en Europa, específicamente en Inglaterra y por sus propiedades medicinales en más de 10 países, entre ellos, Alemania, Colombia, Costa Rica, España, Estados Unidos, Francia, Hungría, Japón, Kuwait, México, Polonia, Rumania, Suecia, Suiza, Unión Soviética. (3)

En Cuba, refiere Roig (1974), su introducción es de fecha desconocida, mencionando su cultivo como planta medicinal y ornamental.³ Es reconocida como flor de calidad media por la Empresa de Flores del Ministerio de Agricultura, el que suele emplearla como relleno de coronas y en ambientación de parques y avenidas. (3)

1.3.2.3.Composición química

Sobre el contenido químico en las inflorescencias de la caléndula existen numerosas referencias, entre otros componentes se han detectado la presencia de aceites esenciales (en 0,2 a 0,3 %), ácido salicílico, ácido fenólico, esteroides, carotenoides muy abundantes, glucósidos, flavonoides, taninos, un principio amargo llamado calendulina, una saponina

triterpénica, pigmentos, xantofilas, mucílagos, umbeliferona, esculetina y escopoletina, etcétera. (3)

1.3.2.4. Farmacología y actividad biológica

Las cabezuelas o las flores liguladas de caléndula son ampliamente utilizadas por sus propiedades antiinflamatoria, espasmódica, emenagoga, colagoga, sedativa, sudorífica, vulneraria y bactericida contra *Staphylococcus aureus*; los extractos de las flores se recomiendan en el tratamiento de leucorrea. En aplicación interna se usa para estimular la actividad hepática y por tanto la secreción biliar, en tratamiento de úlceras gástricas; y externamente, la decocción, tintura o pomada se emplean en escaras, úlceras varicosas, erupciones cutáneas. Se usa en forma de infusión como componente de tres compuestos, en forma tópica, en tintura, y para la preparación de medicamentos tales como gel antiulceroso, supositorios vaginales y emulsión acuosa para el tratamiento de afecciones de la piel. En Francia se reporta la actividad antitumoral y citotóxica de los extractos de caléndula. (16)

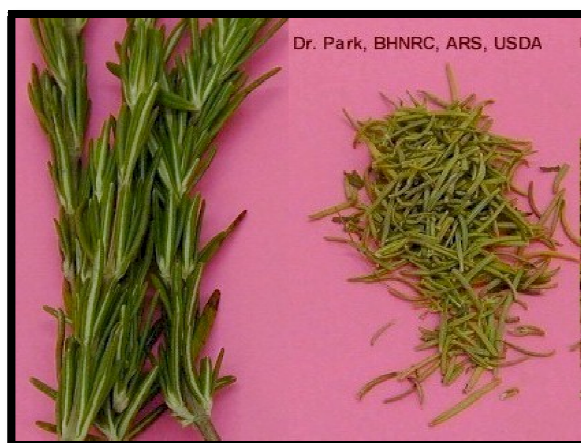
Además de su uso medicinal se refiere su empleo en cosméticos, en la preparación de champús, cremas y como colorante y en la industria alimentaria en la confección, fabricación de galletas, caramelos, licores, como colorante natural de la mantequilla o como sucedáneo del azafrán. (16)

1.3.3. *Rosmarinus officinalis*

Nombre científico: *Rosmarinus officinalis*

Nombre común: Romero

Familia: Labiadas.



Fotografía. 4 . *Rosmarinus officinalis*

Hábitat: Crece espontáneamente en los matorrales mediterráneos en compañía de otras plantas como el tomillo (*Thymus vulgaris*), el espliego (*Lavanda sp*) y las jaras (*Cistus sp*). (17)

1.3.3.1. Descripción Botánica

Arbusto perenne muy aromático de la familia de las labiadas de hasta 3 metros. Tallos erectos y ramificados .Hojas lineares de un verde brillante al haz y de una gran pilosidad blanquecina al envés. Flores bilabiadas de color azul pálido con los estambres más largos que los pétalos y con el labio superior de la corola curvado.

1.3.3.2. Composición Química

La droga contiene entre 10 y 25 mL/Kg de un aceite esencial cuyos constituyentes principales son alcanfor, cineol, α -pineno, borneol y canfeno en proporciones variables dependiendo del origen y el estadio vegetativo. Los compuestos fenólicos se encuentran representados por flavonoides (heterósidos del luteolol, diosmetol y flavonas metoxiladas en C-6 y C-7) y por ácidos fenólicos, sobre todo derivados cafeicos: ácidos cafeico, clorogénico y rosmarínico. Este último es el éster del ácido cafeico y del ácido α -hidroxi-dihidrocafeico. El romero se caracteriza también por la presencia de diterpenos tricíclicos: ácido carnosólico y carnosol (mayoritarios), rosmanol, epirosmanol,

isorosmanol, rosmarinidifenol, rosmari-quinona, rosmadial, etc., así como por la de triterpenos (ácido ursólico y oleanólico, amirinas).

1.3.3.3. Farmacología y Actividad biológica

La droga es un reputado colerético, lo que ha sido parcialmente confirmado en experimentación animal (tintura vía i.v. 1-2g/Kg), asimismo es diurética. La evaluación del extracto acuoso de la droga sobre un cultivo de hepatocitos revela la actividad protectora de este extracto sobre la peroxidación inducida por hidroperóxido de terbutilo. La actividad espasmolítica de los extractos se atribuye al aceite esencial principalmente al borneol. El aceite esencial es in vitro antibacteriano y antifúngico. El ácido rosmarínico es antiinflamatorio (edema inducido por carragenina); inhibe la activación del factor C3 del complemento. La actividad antioxidante de los extractos de romero (tanto los clásico como los obtenidos por dióxido de carbono supercrítico) se ha evidenciado sobre diferentes modelos y con diversos productos alimenticios (lípidos, carne, charcutería, etc.). Esta actividad se debe en parte al ácido rosmarínico pero sobre todo a los o-difenoles diterpenicos, cuya eficacia es superior a la de los antioxidantes sintéticos utilizados en la actualidad.

Los ácidos fenólicos son responsables del efecto hidrocolerético, colagogo, hepatoprotector y diurético, acción reforzada por la presencia de los flavonides que, además tienen una actividad espasmolítica. El aceite esencial es responsable de su acción tónica general, estimulante del sistema nervioso, aperitiva, carminativa, espasmolítica, antiséptica, fungistática, emenagoga, expectorante.

El uso tópico es antiinflamatorio, cicatrizante analgésico y estimulante del cuero cabelludo, el aceite esencial es rubefaciente. (21)

1.3.4. *Salix alba*

Nombre científico: Salix alba

Nombre vulgar: Sauce llorón

Familia: salicáceas



Fotografía. 5 . *Salix alba*

1.3.4.1.Descripción botánica

Árbol corpulento, que puede alcanzar los 10 m de altura, de tronco tortuoso y grueso, a veces inclinado, ramas principalmente gruesas y ramillas jóvenes delgadas, flexibles y péndulas, que pueden llegar hasta el suelo; su corteza es gruesa y hendida, de color café .

Sus hojas son caedizas, alternas sobre las ramillas, simples, lanceoladas, de 8 a 16 cm de longitud, de borde aserrado.

Sus flores son dioicas: las masculinas en pequeñas inflorescencias curvas de 2 cm de largo; las femeninas son colgantes y más gruesas. Su floración ocurre en primavera.(17)

1.3.4.2.Composición Química

Los sauces se utilizan por su corteza, rica en compuestos fenólicos fácilmente identificables por CCF y CLAR: proantocianidoles dímeros y trímero, flavonoides (1-4%, flavonas) y glucósidos de fenoles y ácidos fenólicos (entre 1 y 11% según la especie, la procedencia y la edad del árbol). El salicósido (glucósido del alcohol salicílico) va acompañado por salicortina y por sus derivados benzoilados (tremulacina, populina) así como por heterósidos con genina en C6-C3 (triandrina, vimalina). Los derivados de tipo salicortina, termolábiles, se transforman parcialmente en salicósido cuando la droga se deseca a temperatura elevada. Prácticamente todos los autores están de acuerdo en atribuir las propiedades antiinflamatorias tradicionalmente reconocidas en la droga, al ácido salicílico formado por oxidación del alcohol salicílico que proviene por su parte de

la hidrólisis, a nivel intestinal, del salicósido nativo o de la degradación lenta de la salicortina. (17)

1.3.4.3. Farmacología y actividad biológica

Ya en la antigüedad, Hipócrates utilizaba las hojas del sauce para aliviar los problemas relacionados con el dolor y es que no hay que olvidar que la salicina se transforma en ácido salicílico en el organismo y que ayuda a reducir la sensación de dolor; es importante también el hecho de que además de servir como analgésico, la salicina presenta propiedades antiinflamatorias. Todo ello hace que el sauce sea un remedio alternativo a la conocida aspirina, si bien este tratamiento es de acción más lenta.

Además de como analgésico, también se puede utilizar para bajar la fiebre, gracias a las propiedades antipiréticas de la salicina. Y como anticoagulante, ya que esta planta hace más fluida la sangre y ayuda a prevenir ciertas enfermedades cardiovasculares, así como la formación de trombos. Edward Bach utilizó las flores de sauce para tratar a las personas resentidas, amargadas, con sentimiento de ser víctimas de su destino. La toma de Willow ayuda a estas personas a perdonar y perdonarse, liberarse de su papel de víctima y asumir la plena responsabilidad de su propio destino. (23)

1.4. FUNDAMENTOS DE LOS MÉTODOS DE ANÁLISIS

Se detalla a continuación los fundamentos de cada una de las técnicas o métodos que se efectúan en este trabajo.

1.4.1. MÉTODO DE PREPARACIÓN DE EXTRACTOS

Los métodos y técnicas operatorias a seleccionar para realizar la extracción y/o aislamiento de principios activos de un material vegetal dependen de diversos factores, siendo entre ellos fundamentalmente.

- Tipo de sustancia para adecuar el proceso.
- Contenido de agua.
- Grado de fragmentación.
- La temperatura y su influencia sobre alteraciones químicas.
- Estabilidad o labilidad del producto.
- Selección del disolvente para una separación óptima.
- Cambios en la relación de partición sólido/líquido.
- Recuperación del soluto según la proporción de partición.
- Formación de emulsiones.
- Costo del proceso.
- Trabajo involucrado, reproducibilidad y factibilidad.
- Eficacia del proceso extractivo escogido.

1.4.1.1.Hidrodestilación

La hidrodestilación es un proceso de obtención de metabolitos por arrastre de vapor de agua, procedimiento que se considera útil cuando existe la presencia de aceites esenciales, sesquiterpenos, flavonoides metoxilados e inclusive alcaloides de bajo peso molecular.

1.4.2. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El cribado o tamizaje fitoquímico tiene como objetivo general la determinación cualitativa de los principales grupos fitoquímicos presentes en un extracto vegetal. (21)

La extracción de los metabolitos secundarios del vegetal se lo realiza con un solvente que solubilice al mayor número de componentes, a este extracto se lo somete a reacciones sensibles (de coloración), reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con los resultados de las pruebas in vitro, ya que en ocasiones la actividad biológica está

dada por el fitocomplejo y en otras por un determinado compuesto conocido como marcador. (21)

Las técnicas de determinación cualitativa más corrientemente utilizadas incluyen la determinación de la presencia de alcaloides, flavonoides, taninos, antracenos, esteroides insaturados, saponinas, glicósidos cardioactivos, taninos y otros grupos fenólicos. (21)

1.4.2.1. Ensayo de Dragendorff:

Utilizado para detectar la presencia de alcaloides. (21)

1.4.2.2. Ensayo de Lieberman-Buchard:

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroide, en ambos tipos de productos debe poseer un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6. (21)

1.4.2.3. Ensayo de Borntrager:

Es útil para detectar la presencia de quinonas. (21)

1.4.2.4. Ensayo de Baljet:

Es útil para reconocer la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar resultado positivo. (21)

1.4.2.5. Ensayo de Sudan III:

Permite conocer en un extracto la presencia de compuestos grasos. (21)

1.4.2.6. Ensayo de Wagner:

Se parte de la solución ácida, de igual forma que en los casos anteriores. A esta solución, se le adiciona 2 o 3 gotas de reactivo de Wagner y se reporta los resultados de igual forma que en la reacción anterior. (21)

1.4.2.7. Ensayo de Fehling:

Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. (21)

1.4.2.8. Ensayo de Espuma:

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esterooidal como triterpénica. (21)

1.4.2.9. Ensayo del Cloruro férrico:

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. (21)

1.4.2.10. Ensayo de Ninhidrina:

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general. (21)

1.4.2.11. Ensayo de Shinoda:

Permite reconocer la presencia de flavonoides en el extracto de un vegetal. (21)

1.4.2.12. Ensayo de Antocianidinas:

Permite conocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia C6-C3-C5 del grupo de los flavonoides. (21)

1.4.2.13. Ensayo de Mucílagos:

Permite reconocer en los extractos de vegetales la presencia de esta estructura tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae. (21)

1.5. AISLAMIENTO DE HONGOS

La mayoría de enfermedades micológicas superficiales se diagnostican al observar las lesiones, y mediante el examen directo, a partir de la muestra de escamas obtenidas mediante el raspado directo o mediante la aplicación de un trozo de cinta adhesiva transparente y aplicada sobre un potea objetos. El cultivo no suele ser necesario, utilizándose sólo para fines de investigación. (8, 13)

Para realizar este estudio investigativo se realizó el cultivo del hongo levaduriforme *Malassezia globosa*, ya que es el principal agente causal de la caspa, para poder hacer el estudio de sensibilidad *in vitro* frente a los hidrodestilados de las tres plantas mencionadas. (8, 13)

1.6. ANTIBIOGRAMA

Antes de establecer el tratamiento de una enfermedad de etiología microbiana, es conveniente efectuar un antibiograma, es decir, un estudio de la sensibilidad del germen productor de la infección a los antimicrobianos. (2)

Hace años, al empezar los primeros estudios *in vitro* sobre la sensibilidad de un microorganismo a los antibióticos, sólo se obtenía una apreciación cualitativa, sin ningún rigor científico, declarando al microorganismo como sensible o resistente, según que su crecimiento fuera inhibido o no por unas arbitrarias concentraciones del fármaco. En la actualidad, el antibiograma es una técnica perfectamente estandarizada que permite, *in vitro*, definir claramente los conceptos de sensibilidad y resistencia, relacionándolos con lo que ocurre *in vivo*. Un microorganismo se considera sensible a un determinado antibiótico cuando éste puede alcanzar niveles plasmáticos iguales por lo menos a la concentración mínima inhibitoria (CMI), en el lugar de la infección. Se considera como CMI, la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo. Un microorganismo se considera resistente a un antibiótico cuando la concentración máxima de antimicrobiano que se puede conseguir en el lugar de infección (líquidos, tejidos o suero) no es suficiente para afectarle, y que por efectos secundarios tóxicos es imposible elevar las dosis. (2)

CAPÍTULO II

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. LUGAR DE LA INVESTIGACIÓN.

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología Clínica de la Escuela de Bioquímica y Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y en el laboratorio Clínico de SOLCA Chimborazo.

2.2. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Cepas del agente causal de Dermatitis Seborreica *Malassezia globosa* procedentes de veinte pacientes diferentes, que sufren de dicha enfermedad micótica.

2.2.2. MATERIAL DE LABORATORIO

- Erlenmeyer
- Mecheros
- Pipetas
- Cajas petri
- Portaobjetos y cubre objetos
- Probetas
- Algodón

2.2.3. EQUIPOS

- Autoclave (Hirayama)
- Balanza de precisión (Metter)
- Baño María (Mettmert)
- Estufa (Mettmert)
- Microscopio (Bausch – Lomb)
- Refrigeradora (Hotpoint)
- Termostato (CENCO)
- Equipo de extracción por arrastre de vapor

2.2.4. REACTIVOS

- Agua destilada
- Alcohol etílico
- Ácido clorhídrico concentrado
- Azul de Metileno
- Reactivo de Dragendorff
- Cloroformo
- Anhídrido acético
- Ácido sulfúrico concentrado
- Hidróxido de sodio
- Reactivo de Baljet
- Solución de sudan III
- Glicerina
- Reactivo de Wagner
- Reactivo de Fehling
- Tricloruro férrico al 5%
- Solución de Ninhidrina al 5%
- Cinta de magnesio metálico
- Alcohol amílico
- Reactivo de Kedde

- Agar Dixon modificado
- Peróxido de hidrógeno de 10 vol.
- Twen 20, 40, 80

2.3. METODOLOGÍA

2.3.1. PREPARACIÓN DE HIDRODESTILADOS

- Limpiar de impurezas y trocear la planta.
- Colocar en el equipo de destilación.
- Añadir agua a razón de 3 litros por 1 Kg de planta.
- Destilar y recoger el destilado de las tres primeras horas por ser el más concentrado.

2.3.2. DETERMINACIÓN DE CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

- Para identificar el aspecto se coloca en tubos de ensayo las muestras, observar a contraluz la presencia de partículas y/o turbidez mediante visualización directa.
- Indicar el color mediante el tinte que presenta la muestra.
- El olor se lo determina mediante la degustación del sentido del olfato.

2.3.3. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

El Tamizaje Fitoquímico es la determinación cualitativa de metabolitos secundarios. (21)

2.3.3.1. Ensayo de Dragendorff:

Utilizado para detectar la presencia de alcaloides se debe tomar en cuenta que si el extracto está disuelto en solvente orgánico, este debe evaporarse en baño de agua y el residuo redisolverse en 1 mL de ácido clorhídrico al 1% en agua. Si se trata de un extracto acuoso a la alícuota se le añade 1 gota de ácido clorhídrico concentrado, (calentar suavemente y dejar enfriar hasta acidez).

Para el ensayo, a la solución acuosa ácida se le añade 3 gotas del reactivo de Dragendorff, y se observa. (21)

- Opalescencia: (+)
- Turbidez definida: (++)
- Precipitado: (+++)

2.3.3.2. Ensayo de Lieberman-Buchard:

Permite reconocer en un extracto la presencia de triterpenos y/o esteroide, en ambos tipos de productos debe poseer un núcleo de androstano, generalmente insaturado en el anillo B y la posición 5-6.

Para ello, si la alícuota no se encuentra en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de maría y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla bien. Por la pared del tubo de ensayo se dejan resbalar 2-3 gotas de ácido sulfúrico concentrado sin agitar. Un ensayo positivo se tiene por un cambio rápido de coloración.

- Rosado-azul muy rápido
- Verde intenso- visible aunque rápido.
- Verde oscuro-negro-final de la reacción. (21)

2.3.3.3. Ensayo de Borntrager:

Es útil para detectar la presencia de quinonas.

Si la alícuota no se encuentra en cloroformo debe evaporarse el solvente en baño de maría y el residuo redisolverse en 1 mL de cloroformo. Se adiciona 1ml de hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o amonio al 5 % en agua. Se agita mezclando las fases, y se deja en reposo hasta su ulterior separación.

El ensayo es positivo cuando la fase acuosa alcalina (superior) se colorea de rosado, en este caso se reporta (++) , o, rojo para lo cual se reporta (+++). (21)

2.3.3.4. Ensayo de Baljet:

Es útil para reconocer la presencia de compuestos con agrupamiento lactónico, en particular Cumarinas, aunque otros compuestos lactónicos pueden dar resultado positivo. Si la alícuota de la muestra a probar no está en alcohol, debe evaporarse el solvente en baño de agua y redisolverse en 1 mL de alcohol. Seguidamente, se añade 1 mL del reactivo. La prueba es positiva, cuando aparece una coloración o precipitado de color rojo (++) y (+++) respectivamente. (21)

2.3.3.5. Ensayo de Sudan III:

Permite conocer en un extracto la presencia de compuestos grasos, para ello, cuando un extracto etéreo se evapora a sequedad en presencia de una solución de Sudan III al 0.6% en glicerina-agua(1:1).

La aparición de gotas oleosas de color rojo oscuro, indica la presencia de lípidos y/o aceites Esenciales. (21)

2.3.3.6. Ensayo de Wagner:

Se parte de la solución ácida, de igual forma que en los casos anteriores. A esta solución, se le adiciona 2 o 3 gotas de reactivo de Wagner y se reporta los resultados de igual forma que en la reacción anterior. (21)

2.3.3.7. Ensayo de Catequinas:

Para ello, tomar de la solución alcohólica obtenida, una gota con la ayuda de un capilar y aplique la solución sobre papel de filtro. Sobre la mancha aplique solución de Carbonato de Sodio.

La aparición de una mancha verde, a la luz UV, indica positiva la prueba. (21)

2.3.3.8. Ensayo de Resinas:

Para detectar este tipo de compuestos, adiciones a 2 mL de la solución alcohólica, 10 mL de agua destilada. La aparición de un precipitado, indica un ensayo positivo. (21)

2.3.3.9. Ensayo de Fehling:

Permite reconocer en un extracto la presencia de azúcares reductores. Para ello, si la alícuota del extracto no se encuerara en agua, debe evaporarse el solvente en baño de agua y el residuo redisolverse en 1-2 mL de agua. Se adicionan 2 mL del reactivo y se calienta en baño de agua 5-10 minutos la mezcla. El ensayo se considera positivo si la solución se colorea de rojo o aparece precipitado rojo. El reactivo se prepara de la siguiente forma:

Solución A: se pesa 35g de sulfato cúprico hidratado cristalizado y se disuelve con agua hasta un volumen total de 1000mL.

Solución B: se pesa 150g de tartrato de sodio y potasio y 40g de hidróxido de sodio y se disuelve con agua hasta un volumen total de 1000mL.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar. (21)

2.3.3.10. Ensayo de Espuma:

Permite reconocer en un extracto la presencia de saponinas, tanto del tipo esteroideal como triterpénica. De modo que si la alícuota se encuentra en alcohol, se diluye con 5 veces su volumen en agua y se agita la mezcla fuertemente durante 5-10 minutos.

El ensayo se considera positivo se aparece espuma en la superficie del líquido de más de 2mm de altura y es persistente por más de 2 minutos. (21)

2.3.3.11. Ensayo del Cloruro Férrico:

Permite reconocer la presencia de compuestos fenólicos y/o taninos en un extracto vegetal. Si el extracto de la planta se realiza con alcohol, el ensayo determina tanto fenoles como taninos. A una alícuota del extracto alcohólico se le adicionan 3 gotas de solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9% en agua). Si el extracto es acuoso, el ensayo determina fundamentalmente taninos.

A una alícuota del extracto se añade acetato de sodio para neutralizar y tres gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica, un ensayo positivo puede dar la siguiente información general:

- Desarrollo de una coloración rojo – vino, compuestos fenólicos en general.
- Desarrollo de una coloración verde intensa, taninos del tipo pirocatecólicos.
- Desarrollo de una coloración azul, taninos del tipo pirogalotánicos. (21)

2.3.3.12. Ensayo de Ninhidrina:

Permite reconocer en los extractos vegetales la presencia de aminoácidos libres o de aminas en general.

A la fracción disuelta en 1mL de Etanol se le adiciona 1mL de solución de Ninhidrina al 5%. Se calienta en baño de agua de 5 a 10 minutos.

Si aparece una coloración azul o violeta el ensayo es positivo. (21)

2.3.3.13. Ensayo de Shinoda:

Permite reconocer la presencia de flavonoides en el extracto de un vegetal. Si la alícuota del extracto se encuentra en alcohol, se diluye con 1 mL de ácido clorhídrico concentrado y un pedacito de cinta de magnesio metálico. Después de la reacción se espera 5 minutos, se añade 1mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen.

Si la alícuota del extracto se encuentra en agua, se procede de igual forma, a partir de la adición del ácido clorhídrico concentrado.

El ensayo se considera positivo, cuando el alcohol amílico se colorea de amarillo, naranja, carmelita o rojo; intensos en todos los casos. (21)

2.3.3.14. Ensayo de Kedde:

Permite reconocer en un extracto la presencia de glicósidos cardiotónicos. Una alícuota del extracto en etanol se mezcla con 1mL del reactivo y se deja reposar durante 5-

10 minutos. Un ensayo positivo es en el que se desarrolla una coloración violácea, persistente durante 1-2 horas. El reactivo de Kedde se prepara de la siguiente forma:

- Solución 1: ácido 3,5 dinitrobenzónico al 2% en metanol.
- Solución 2: Hidróxido de potasio al 5,7% en agua.

Las soluciones se tienen preparadas de forma independiente y se mezcla igual cantidad en volumen de cada una de ellas justo en el momento de realizar el ensayo. Dicha mezcla es la que se adiciona a la alícuota a evaluar. (21)

2.3.3.15. Ensayo de Antocianidinas:

Permite conocer en los extractos vegetales la presencia de estas estructuras de secuencia C₆-C₃-C₅ del grupo de los flavonoides. (21)

Se calienta 2mL del extracto etanólico por 10 minutos con 1 mL de HCl concentrado. Dejar enfriar y luego adicionar 1mL de agua y 2mL de alcohol amílico. Agitar y dejar separar las 2 fases. La aparición de color rojo marrón en la fase amílica, indica ensayo positivo. (21)

2.3.3.16. Ensayo de Mucílagos:

Permite reconocer en los extractos de vegetales la presencia de esta estructura tipo polisacárido, que forma un coloide hidrófilo de alto índice de masa que aumenta la densidad del agua donde se extrae. Para ello una alícuota del extracto en agua se enfría a 0-5 °C, si la solución toma una consistencia gelatinosa el ensayo es positivo.(21)

2.3.4. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA

2.3.4.1. Preparación del Medio de Cultivo (Agar Dixon)

Pesar:

- Extracto de Malta 36.0 g
- Peptona 6.0 g
- Agar 12.0 g
- Buey de bilis disecada 20.0 g
- Tween 40 10.0 mL
- Monooleato de glicerol 2.0 mL
- Acido oleico 2.0 mL
- Agua destilada 1000 mL
- Disolver los ingredientes por 15 minutos en un poco de agua.
- Agregar el volumen restante y hervir.
- Autoclavar a 121 °C por 15 minutos.
- Repartir en tubos de vidrio o cajas petri estériles. (20)

2.3.4.2. Obtención y Aislamiento de *Malassezia globosa*

Se obtiene muestras de pacientes examinados, para lo cual se realiza una limpieza previa de la zona afectada, con alcohol al 70% y raspado con bisturí estéril y sembrando en una caja petri que contiene el agar Dixon. (20)

- Examen Directo Microscópico

Se realiza en las escamas obtenidas con cinta adhesiva transparente la cual se aplica en el área afectada, se tiñen con azul de metileno para hacer recuento de levaduras por campo microscópico, aplicándose una escala arbitraria:

0 = Sin levaduras por campo.

(+) = 1 a 4 levaduras por campo.

(++) = 5 a 10 levaduras por campo.

(+++)= Sobre 11 levaduras por campo.

La micromorfología también se considera en la identificación, ya que puede ser de gran utilidad, como en el caso de la típica forma de la *M. globosa*. En otras especies, como la *M. furfur*, puede tener formas variables y la característica forma de botellita puede presentar variaciones esféricas, ovoides o cilíndricas, difíciles de reconocer y cuya interpretación es dependiente del examinador. (20)

- **Cultivo**

La muestra obtenida se siembran en la superficie de un medio de Dixon modificado y se incuban a 32°C por 7 días.

Una vez obtenido el primer aislamiento, se hacen pases a otra placa de agar Dixon para obtener cultivos frescos y así realizar las pruebas bioquímicas de igual forma se mantiene las cepas de caldo Dixon a 32°C como reserva. (20)

- **Identificación**

Las colonias obtenidas deben ser sometidas a las siguientes pruebas fisiológicas: reacción de catalasa, desdoblamiento de la esculina y capacidad de utilizar Tween 20, 40, 80 como única fuente de lípidos. Se sigue el flujograma de trabajo graficado en la Figura 7 .

- Reacción de catalasa

Se determina aplicando una gota de agua oxigenada al 3% sobre las colonias que previamente se han colocado en un portaobjetos. El resultado es positivo (+) si se forman burbujas de gas.

- Desdoblamiento de esculina

Se cultivan levaduras en un medio con esculina. La reacción positiva (+) corresponde al viraje a negro de la esculina al desdoblarse ésta en esculitina y glucosa.

- Crecimiento en Tween

A 16 ml de Sabouraud dextrosa agar estéril se agrega una suspensión de las levaduras en estudio en 1 ml de agua destilada estéril. La suspensión se aplica en placa de Petri de 9 cm de diámetro; una vez solidificado el medio se realizaran 3 orificios de 2 mm y se llenan con Tween 20, 40 y 80, respectivamente. Se incuba la placa a 32°C por una semana, después de lo cual se examinaron con lupa las zonas de desarrollo o inhibición.

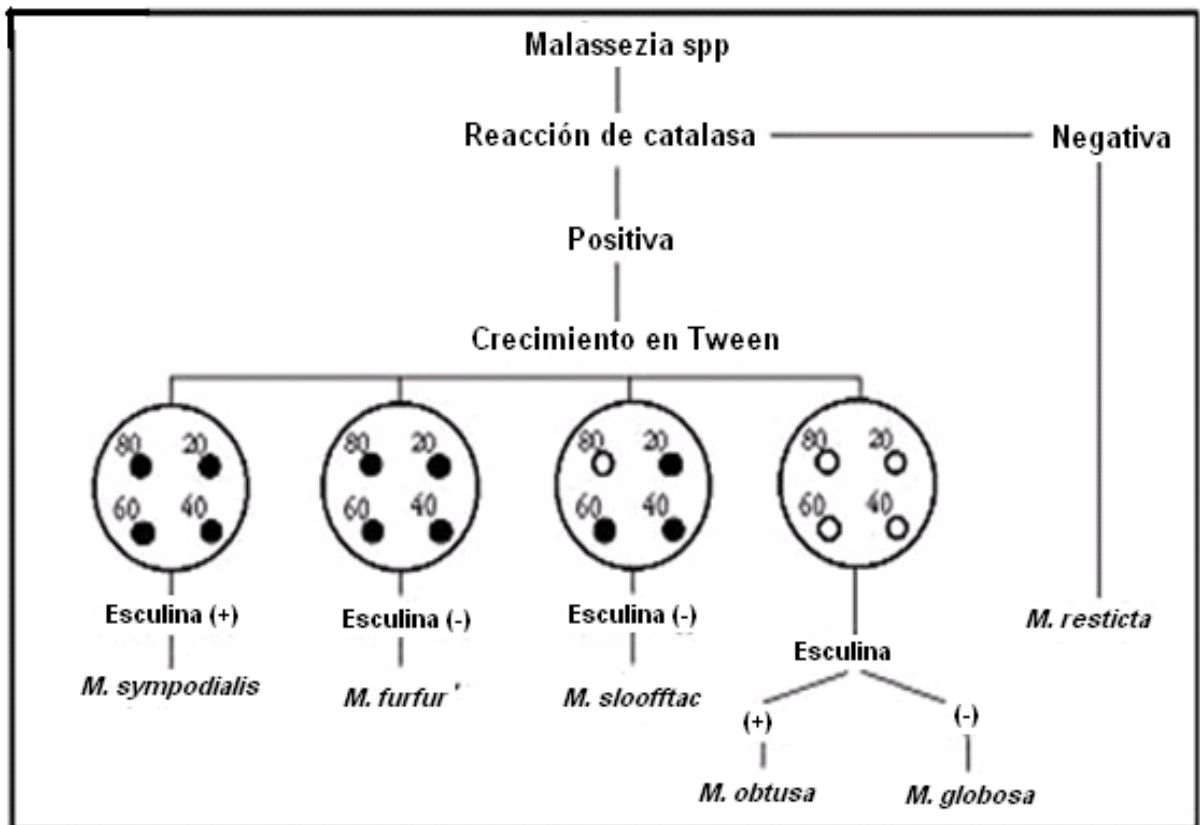


Fig. 2 . Flujoograma de trabajo

2.3.4.3. Determinación de la Actividad Antifúngica de los Hidrodestilados (Método de Mitscher)

- Cultivo de *Malassezia globosa*

Con un asa estéril se transfieren una o dos asadas, de *Malassezia globosa* de un tubo inclinado a un erlenmeyer codificado y cerrado que contenga 10mL de caldo Dixon estéril. Este envase se marca y se incuba a 32°C por 7 días, con agitación constante.

- Preparación de Muestras para el Ensayo

- Extractos Crudos

Se pesa con precisión 20mg de extracto crudo y se disuelve en una cantidad apropiada de agar Dixon, lo cual es repartido a una caja petri marcada. Esto debe realizarse asépticamente. Después que las cajas se han preparado, se dejan a temperatura ambiente o refrigerada si es necesario. (21)

- Preparación de Stock de Ketoconazol

Como patrón se pesan 200mg de ketoconazol y se disuelven en 10 mL de agua destilada estéril, y se esteriliza por filtración. (21)

Se toma 0.1mL de la solución y se le añade asépticamente a una caja petri codificada, y se adiciona 10 mL de Agar dixon. (21)

- Siembra de Microorganismos

Las cajas petri que se han preparado anteriormente, no deben tener contaminación. La superficie de cada caja se marca con una línea que representa al microorganismo que posteriormente será sembrado. Con un asa estéril entre una aplicación y otra, se toma una asada de cada microorganismo en su turno. El asa con el microorganismo es entonces sembrado en un patrón radial de cada caja petri siguiendo la plantilla de la Figura 8:

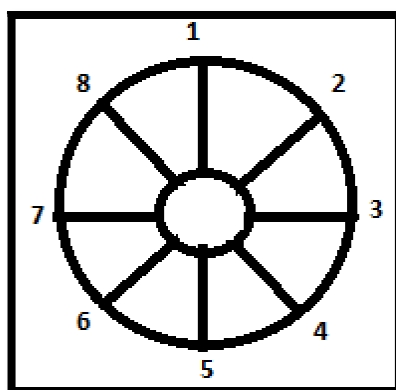


Figura. 3. Esquema de siembra de microorganismos (Método de Mitscher)

Las suspensiones de los microorganismos deben ser agitadas de tiempo en tiempo, para evitar la sedimentación. (21)

La siembra es más segura si se lleva a cabo desde la región cercana al límite de la caja hacia el punto cerca de la zona clara de centro de la caja. La siembra no debe llegar exactamente al centro de la caja pues hay peligro de contaminación cruzada por pasar sobre una línea de microorganismos previamente sembrada. (21)

Cuando las cajas se hayan sembrado con todos los microorganismos, se incuban a 32°C por 7 días. Las cajas se incuban boca abajo para evitar que las gotas de agua condensadas puedan caer sobre los microorganismos y dispersen su crecimiento. (21)

- Revisión de las Cajas

Las cajas se sacan de la incubadora y se examinan el día 7. Existe actividad antibiótica cuando no hay crecimiento visible en las cajas rayadas. La concentración inhibitoria mínima (CMI) es la menor concentración de las disoluciones en la cual no hay crecimiento del microorganismo. La presencia de pocas colonias en una raya es señal de resistencia. La presencia de pocas colonias aisladas en la caja, lejos de las líneas rayadas, es señal de contaminación. (21)

2.3.5. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utiliza un diseño completamente al azar (DCA) ya que las condiciones en las que se efectúa el experimento son completamente homogéneas.

Son 72 determinaciones resultantes de 9 tratamientos y 4 repeticiones que se realizan sobre 2 cepas de *Malassezia globosa*, para determinar la actividad antifúngica de los hidrodestilados de las plantas mencionadas anteriormente, utilizando como blanco Agar Dixon sin inóculo, y como control de sensibilidad una solución de Ketoconazol al 2%.

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se analizan los datos obtenidos en cada una de las pruebas realizadas para cumplir con los objetivos y que se indicaron en la respectiva metodología.

3.1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LOS HIDRODESTILADOS

CUADRO No. 1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LOS HIDRODESTILADOS

Hidrodestilados	Aspecto	Color	Olor
<i>Calendula officinalis</i>	Líquido aceitoso	Transparente ligeramente turbio	Penetrante Característico
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Líquido aceitoso	Ligeramente verde turbio	Penetrante Característico
<i>Salix alba</i>	Líquido aceitoso	Blanquecino	Penetrante

Los hidrodestilados son líquidos de color verde en caso de que se utilice la parte aérea y transparente cuando se utiliza las flores. El olor es característico al vegetal sirviendo de referencia para identificar su pertenencia.

Para el caso de la Calendula se utilizaron solo las flores, mientras que para el Romero y el Suce se utilizaron las hojas, y parte de los tallos.

3.2. TAMIZAJE FITOQUÍMICO

En el sustento teórico se indican los metabolitos secundarios presentes en los vegetales utilizados para comprobar la actividad biológica.

3.2.1. *Calendula officinalis*

En el hidrodestilado de *Calendula officinalis* se determina que hay la presencia de agrupamientos lactónicos y aceites esenciales, ya que las pruebas de Baljet y Sudan III resultaron positivas.

CUADRO NO. 2. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE *Calendula officinalis*

Pruebas	Resultado
Ensayo de Dragendorff	(-)
Ensayo de Baljet	(+)
Ensayo de Sudan III	(+)
Ensayo del Cloruro férrico	(-)
Ensayo de Shinoda	(-)
Ensayo de Rosenthaler	(-)

(+): positivo; (-): negativo

3.2.2. *Rosmarinus officinalis*

En el hidrodestilado de *Rosmarinus officinalis* se determina que hay la presencia de agrupamientos lactónicos, aceites esenciales y terpenoides, ya que las pruebas de Baljet, Sudan III, y Rosenheid resultaron positivas.

CUADRO No. 3. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE *Rosmarinus officinalis*

Pruebas	Resultado
Ensayo de Dragendorff	(-)
Ensayo de Baljet	(+)
Ensayo de Sudan III	(+)
Ensayo del Cloruro férrico	(-)
Ensayo de Shinoda	(-)
Ensayo de Rosenthaler	(+)

(+): positivo; (-): negativo

3.2.3. *Salix alba*

En el hidrodestilado de *Salix alba* se determina que hay la presencia de flavonoides y terpenoides.

CUADRO No. 4. TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE *Salix alba*

Pruebas	Resultado
Ensayo de Dragendorff	(-)
Ensayo de Baljet	(-)
Ensayo de Sudan III	(-)
Ensayo del Cloruro férrico	(-)
Ensayo de Shinoda	(+)
Ensayo de Rosenthaler	(+)

(+): positivo; (-): negativo

3.3. CRECIMIENTO DE *Malassezia globosa* EN AGAR DIXON

Una vez aislado el microorganismo de interés en agar Dixon, se realizaron las pruebas bioquímicas para comprobar si se trata o no del m.o. mencionado.

CUADRO No. 5. PRUEBAS BIOQUÍMICAS DE CRECIMIENTO DE *Malassezia globosa*

N° Muestra	Crecimiento en Agar Dixon	Catalasa	Esculina	Crecimiento en Tween		
				20	40	80
1	+	+	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-
3	+	+	-	-	-	-
4	+	+	-	-	-	-
5	+	+	-	-	-	-
6	+	+	-	-	-	-
7	+	+	-	-	-	-
8	+	+	-	-	-	-
9	+	+	-	-	-	-
10	+	+	+	+	+	-
11	+	+	-	-	-	-
12	+	+	-	-	-	-
13	+	+	-	-	-	-
14	+	+	-	-	-	-
15	+	+	-	-	-	-
16	+	+	-	-	-	-
17	+	+	-	-	-	-
18	+	-	+	+	+	-
19	+	+	-	-	-	-
20	+	+	-	-	-	-

+: Positivo; -: negativo

3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA

Como se mencionó anteriormente se realizaron nueve tratamientos en total, los cuales se describen a continuación:

CUADRO No. 6. DESCRIPCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

Tratamientos	Descripción	Proporción %
1	Hidrodestilado de <i>Rosmarinus officinalis</i>	100
2	Hidrodestilado de <i>Calendula officinalis</i>	100
3	Hidrodestilado de <i>Salix alba</i>	100
4	Mezcla de Hidrodestilado de <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Salix alba</i> y <i>Calendula officinalis</i>	33:33:33
5	Mezcla de <i>Calendula officinalis</i> <i>Rosmarinus officinalis</i>	50:50
6	Mezcla de <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Salix alba</i>	50:50
7	Mezcla de <i>Salix alba</i> y <i>Calendula officinalis</i>	50:50
8	Ketoconazol (como control)	2
9	Blanco	

Una vez aislado e identificado el hongo se lo conservó en caldo Dixon a 32°C, para posteriormente realizar las pruebas de sensibilidad con los diferentes tratamientos, los cuales se evaluaron por el método de Mitscher, usando una concentración de extracto crudo de 20mg, y se obtuvieron los siguientes resultados.

CUADRO No. 7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTI *Malassezia globosa* DE LOS HIDRODESTILADOS

HIDRODESTILADO	ACTIVIDAD
Hidrodestilado de <i>Rosmarinus officinalis</i>	A
Hidrodestilado de <i>Calendula officinalis</i>	I
Hidrodestilado de <i>Salix alba</i>	A
Mezcla de Hidrodestilado de <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Salix alba</i> y <i>Calendula officinalis</i>	A
Mezcla de <i>Calendula officinalis</i> <i>Rosmarinus officinalis</i>	A
Mezcla de <i>Rosmarinus officinalis</i> , <i>Salix alba</i>	A
Mezcla de <i>Salix alba</i> y <i>Calendula officinalis</i>	P
Ketoconazol (como control)	A

A: activo ; P: parcialmente activo; I: inactivo

De acuerdo a los resultados obtenidos en la evaluación antifúngica de hidrodestilados; los tratamientos activos frente crecimiento de *M. globosa* son los siguientes en comparación con el Ketoconazol al 2% : hidrodestilados de *Rosmarinus officinalis*, *Salix alba*, combinación de Hidrodestilados de *Rosmarinus officinalis*, *Salix alba* y *Calendula officinalis*, combinación de Hidrodestilados de *Rosmarinus officinalis* y *Salix alba*, combinación de *Rosmarinus officinalis* y *Calendula officinalis*.

La combinación de Hidrodestilados de *Salix alba* y *Calendula officinalis*, es parcialmente activa frente al crecimiento de *M. globosa*. Mientras que el hidrodestilado de *Calendula officinalis* es inactivo frente al crecimiento de este hongo.

CAPÍTULO IV

4. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo los hidrodestilados por arrastre de vapor de agua de cada uno de los vegetales frescos, todos son líquidos con olor característico al vegetal. El tamizaje fitoquímico de los hidrodestilados determinan que: en *Calendula officinalis* hay la presencia de sesquiterpenolactonas (Baljet +) y aceites esenciales (Sudan III +); en *Rosmarinus officinalis* hay sesquiterpenolactonas (Baljet +), aceites esenciales (Sudan III +), y terpenoides (Rosentaler +); en *Salix alba* hay flavonoides (Shinoda +) y terpenoides (Rosentaler +).
2. Se muestreó a 20 pacientes que padecían de dermatitis seborreica obteniéndose 18 cepas confirmadas “*in vitro*” del hongo *Malassezia globosa*, agente causal de la caspa.
3. Los resultados expresados en el cuadro N°7 de las pruebas antimicóticas que se realizaron a las dos cepas de *Malassezia globosa* frente a los hidrodestilados y sus mezclas así como frente al Ketoconazol indican que “*in Vitro*” tienen actividad antimicótica 20mg de cada hidrodestilado de Romero (*Rosmarinus officinalis*), Sauce (*Salix alba*), mezcla de Romero, Sauce y Caléndula (*Rosmarinus officinalis*, *Salix alba* y *Calendula officinalis*), mezcla de Romero y Sauce (*Rosmarinus officinalis* y *Salix alba*), mezcla de Romero y Caléndula

(*Rosmarinus officinalis* y *Calendula officinalis*), al mismo nivel que el ketoconazol al 2%; mientras que la mezcla del Hidrodestilado de Sauce (*Salix alba*) y Calendula (*Calendula officinalis*) son parcialmente activos frente al crecimiento de *Malassezia globosa*.

CAPÍTULO V

5. RECOMENDACIONES

1. Determinar el grupo fitoquímico responsable de la actividad antimicótica “*in vitro*” de los vegetales que inhiben el crecimiento de *Malassezia globosa*.
2. Aprovechar los conocimientos y tecnología aplicando ensayos “*in vivo*” para verificar la actividad antimicótica de los vegetales identificados en esta experimentación.
3. Diseñar la forma farmacéutica más adecuada para poder aprovechar las propiedades de dichos vegetales

CAPÍTULO VI

6. RESUMEN

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Microbiología Clínica de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. El objetivo de la misma es identificar la actividad antifúngica de tres vegetales: *Rosmarinus officinalis* (A), *Salix alba* (B) y *Calendula officinalis* (C) y sus mezclas (AB, BC, AC, ABC) para *Malassezia globosa*, agente causal de la caspa, ya que esta enfermedad es una de las que afecta a más del 50% de la población mundial, y se quiere encontrar algún tratamiento de origen natural. Se procedió a aislar e identificar el agente causal de la caspa en medio Dixon modificado incubado a $32^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por un periodo de siete días, después se conservan las cepas en caldo Dixon. Para determinar la actividad antifúngica se utilizó el Método de Mitscher que consiste en mezclar los hidrodestilados con el medio Dixon e incubar las cepas de *Malassezia globosa*. Los hidrodestilados de los vegetales A, B y C se extraen por arrastre de vapor. Los resultados de la determinación “*in vitro*” de la actividad antifúngica frente al blanco son positivos para hidrodestilados de: A (100%), B(100%), ABC (33%, 33%, 33%), AB (50%, 50%), AC (50%,50%), ya que tienen una reacción similar a la actividad que ejerce el ketoconazol al 2% sobre las cepas. Se concluye que los hidrodestilados mencionados anteriormente tienen actividad antifúngica para el hongo *Malassezia globosa*.

SUMMARY

This research was conducted at the Laboratory of Clinical Microbiology, Faculty of Science of the Polytechnic of Chimborazo. The purpose of it is to indentify the antifungal activity of three plants: *Rosmarinus officinalis* (A), *Salix alba* (B) and *Calendula officinalis* (C) and their mixtures (AB, BC, AC, ABC) for *Malassezia globosa*, the cusative agent dandruff, since this disease is one that affects more tan 50% of the world, and you want to find a natural treatment. We proceeded to isolate and identify the causative agent of dandruff in modified Dixon médium and incubated at 32 °C +/- 1°C for a period of seven days, then strain broth keep Dixon. To determine the antifungal activity was used Mitscher method of mixing the hydrodistilleds Dixon with the médium or incubating the strains of *Malassezia globosa*. The hydrodistilleds of plants A, B and C is extracted by steam distillation. The results of determining in vitro antifungal activity against the target are positive hydrodistilleds of: A (100%), B (100%), ABC (33%, 33%, 33%), AB (50%, 50%), AC (50%, 50%), as they have a similar reaction to the activity exerted by ketoconazole 2% of the strains. We conclude that the above hydrodistilleds have antifungal activity for the fungus *Malassezia globosa*.

CAPÍTULO VII

7. BIBLIOGRAFÍA

- (1) **ÁGUILA, B. MENÉNDEZ, C. GONZÁLEZ, C. FERNÁNDEZ, D.**
Extracto Acuoso de *Calendula officinalis*: estudio preliminar de sus propiedades. (publicación pdf)
http://bvs.sld.cu/revistas/pla/vol5_1_00/pla08100.pdf
20091115
- (2) **ALVAREZ, V. BOQUET, E. FEZ, I.** Manual de Técnicas en Microbiología Clínica. Madrid, 1993. pp. 226, 227. (Hojas fotocopiadas).
- (3) **BRUNETON, J.** Farmacognosia, Plantas Medicinales, Química De Sustancias. España, Editorial Morata. 1991. Pp. 86, 87, 88, 89.
- (4) **CAPILLA, J.** Estudios In Vitro e In Vivo sobre la Actividad de Nuevos Antifúngicos frente a Hongos Filamentosos Oportunistas. Universidad ROVIRA i VIRGILI, Facultad de Medicina i Ciències de la Salut, Departamento de Ciències Mèdiques Bàsiques. 2003.
<http://www.tesisenxarxa.net/TDX-0329104-143244/index.html>
20090710
- (5) **CABALLERO, F. JURADO, J. LOPÉZ, A.** Guía de Buena Práctica Clínica en Infecciones Fúngicas., Madrid, Editorial IM&C
<http://www.cgcom.org/publicaciones>
20090710

- (6) **CELIS, A. CEPRO, M.** Polimorfismos Genéticos de Aislamientos del Género *Malassezia* obtenidos en Colombia de Pacientes con Lesión Dermatológica y sin ella. Revista Biomédica. Colombia. (publicación pdf)
<http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v25n4/v25n4a07.pdf>
20090618
- (7) **COMSERPRO.** 2005
<http://www.comserpro.com/calendula.php>
20090618
- (8) **CRESPO, V. DELGADO, V.** Atlas de Micología Cutánea: el laboratorio en las micosis cutáneas. Madrid. S. edit. 2007. pp 40-50. E-book.
- (9) **FONNEGRA, R. JIMÉNEZ, S.** Plantas Medicinales Aprobadas en Colombia. Segunda edición. Colombia. 2004. S. edit. pp. 72, 73, 74. E-book.
- (10) **GARAU, M.** Estudio In Vitro de la Sensibilidad de *Malassezia spp.* 2003
http://www.cibernetia.com/tesis_es/CIENCIAS_DE_LA_VIDA/MICROBIOLOGIA/LEVADURAS/1
20100607
- (11) **GIUSIANO, G. MANGIATERRA, M. SOSA, M. TOMA VANACORE, S.** Actividad Antifúngica del Extracto de *Coniza bonariensis* frente a *Malassezia furfur*. Argentina. 2006. (publicación pdf)
<http://www.unne.edu.ar/Web/cyt/cyt2006/03-Medicinas/2006-M-025.pdf>
20100520

- (12) **GIUSIANO, G. CARRILLO, A.** Afecciones Dérmicas Asociadas a *Malassezia*. (publicación pdf)
www.unne.edu.ar/med_regional/boletin/2005/boletin15.pdf
20090710
- (13) **GUEVARA, M. URCIA, F. CASQUERO, J.** Manual de Procedimientos y Técnicas de Laboratorio para la Identificación de los Principales Hongos Oportunistas Causantes de Micosis Humanas: serie de normas técnicas N.º 44. Perú 2007. pp. 56,57. E-book
- (14) **HERNÁNDEZ, F. MÉNDEZ, L. BAZÁN, E. Y OTROS.** Especies de *Malassezia* Asociadas a Diversas Dermatosis y a Piel Sana en Población Mexicana. Revista Iberoamericana de Micología. 2003. (publicación pdf)
<http://www.reviberoammicol.com/2003-20/141144.pdf>
20090710
- (15) **HERNÁNDEZ, J.** Caracterización Molecular de Especies del Género *Malassezia* (Departament de Sanitat i d' Anatomia animal Facultat de Veterinària Universitat Autònoma de Barcelona). 2005. (publicación pdf)
http://www.tdr.cesca.es/TESIS_UAB/AVAILABLE/TDX-1026105-120351/jhe1de1.pdf
20090710
- (16) **LASTRA, H. PIQUET, R.** Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos: *Calendula officinalis* Rev Cubana Farm 1999.
http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol33_3_99/far07399.htm
20100601
- (17) **LEÓN, E.** Guía de Plantas: romero
<http://www.internatura.org/guias/plantas/romero.html>
20100602

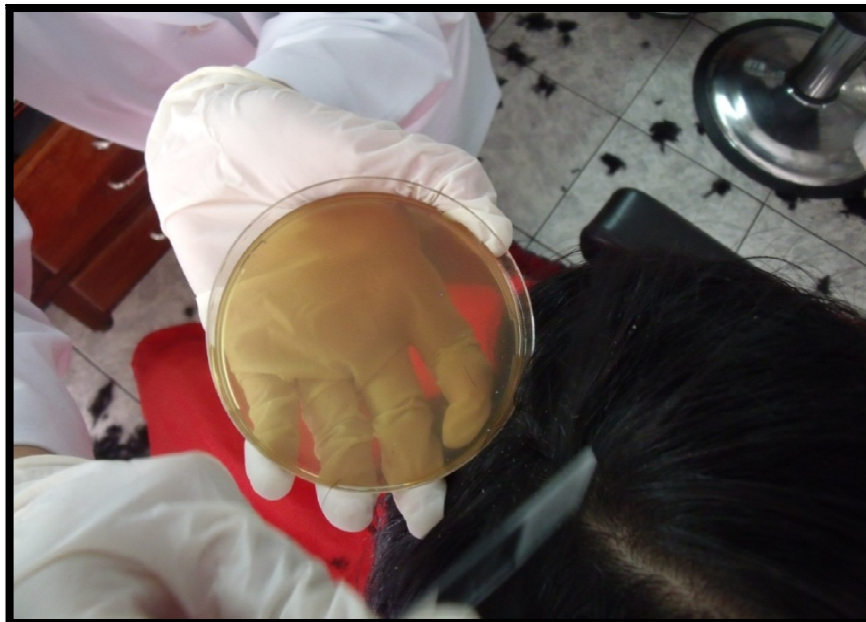
- (18) **MARQUÈS, M.**
http://www.marcmoll.net/pageID_7297340.html
20090619
- (19) **OCHOA, M.** Estudio de las Especies de *Malassezia*, Relacionadas con Patología Cutánea, Pitiriasis Versicolor en Panamá. (tesis doctoral). 2006. (publicación pdf).
<http://0-hera.ugr.es.adrastea.ugr.es/tesisugr/1645778x.pdf>
20090710
- (20) **RENDIC, E. DÍAZ, C. FICH, F.** Caracterización de Especies del Género *Malassezia* en Pacientes con Dermatitis Seborreica y en Controles. Rev Méd Chile 2003.
http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S003498872003001100010&script=sci_arttext
20090712
- (21) **SANCHEZ, C. PINZON, R. GUPT, M.** CYTED, Manual de Técnicas de Investigación. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma Química Fina Farmacéutica. Proyecto. Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas de la Región. 1995. Pp. 63, 64, 65, 66, 67. (hojas fotocopiadas).
- (22) **SOLÍS, P. GUERRERO, N. GATTUSO, M. CÁCERES, A.** Manual de Caracterización y Análisis de Drogas Vegetales y Productos Fitoterapéuticos. Proyecto OEA/AUCD/AE-089/03. pp. 48-60. (hojas fotocopiadas).
- (23) **SHARAPIN, N. MACHADO, L. PINZÓN, R. Y OTROS.** Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. 2000. pp. 27,28. (hojas fotocopiadas).

(24) Web Oficial del Museo de Sitio de Plantas Medicinales Gallego Otero. Cuba

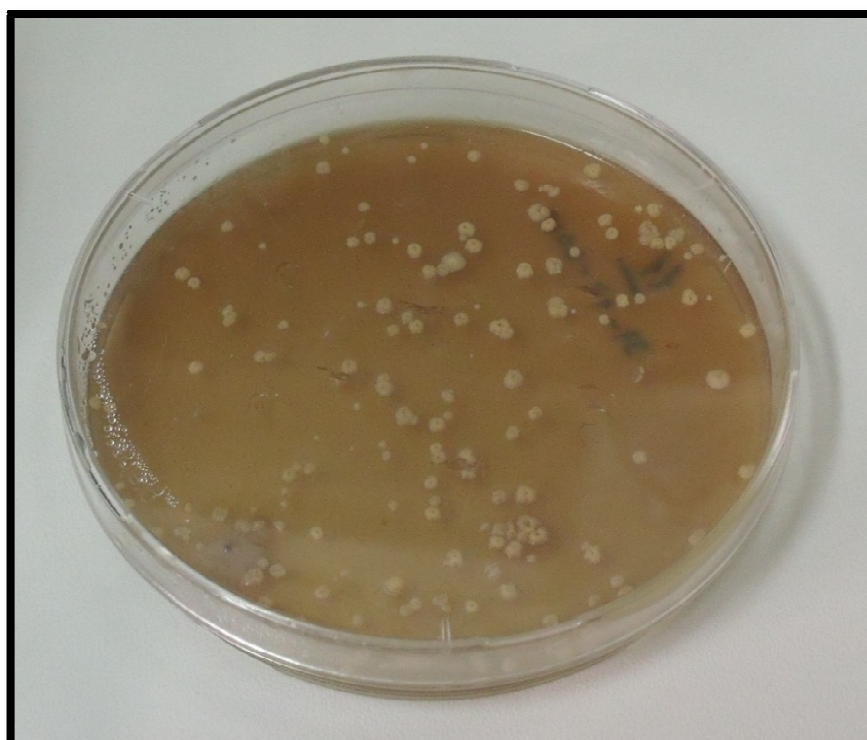
<http://www.azurina.cult.cu/sitios/patrimonio/museos/gallego/plantas/r/romero.htm>

20090619

8. ANEXOS



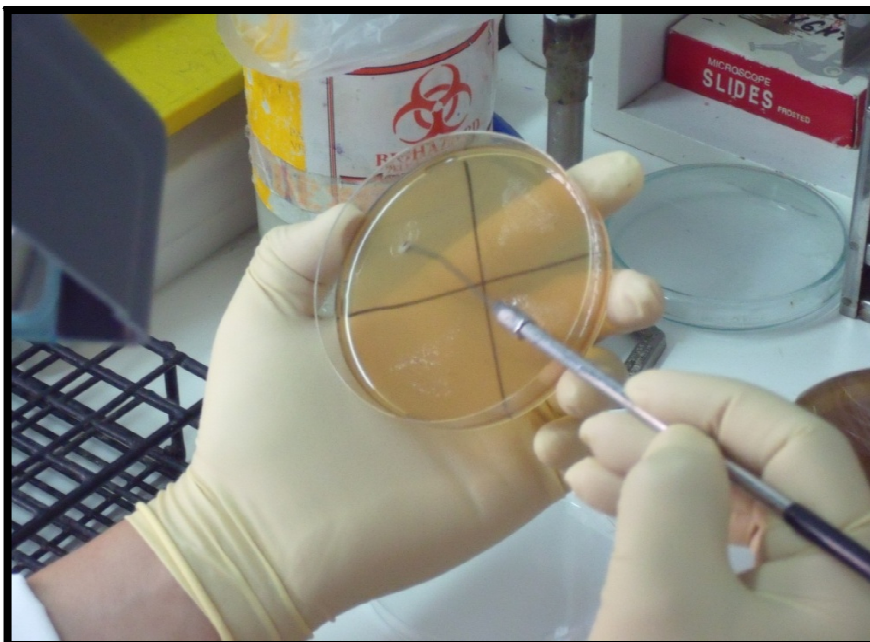
ANEXO No. 1 TOMA DE MUESTRA DE UN INDIVIDUO AFECTADO



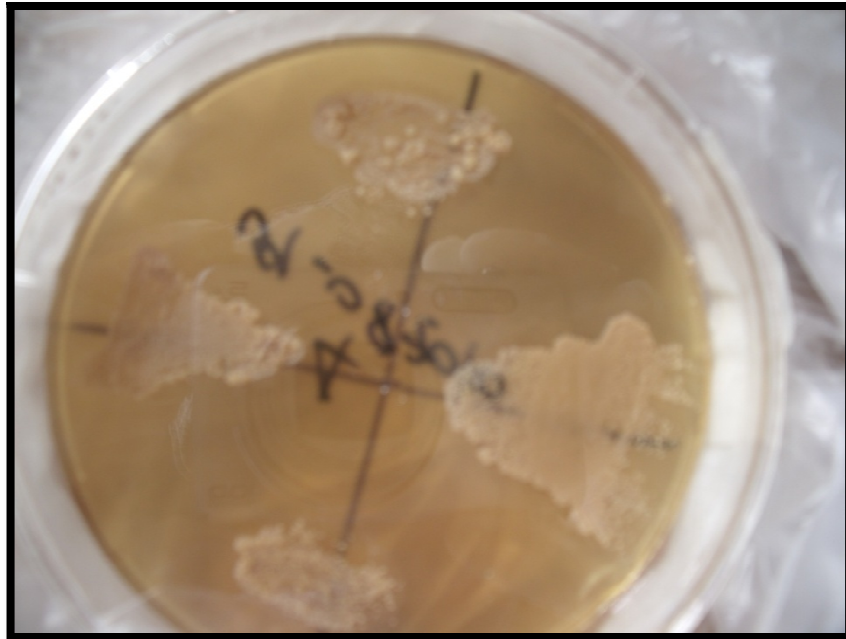
ANEXO No.2 CEPAS DE *Malassezia globosa* EN AGAR DIXON



ANEXO No. 3 CAMBIO DE CAJA DE LAS CEPAS OBTENIDAS EN EL PRIMER AISLAMIENTO



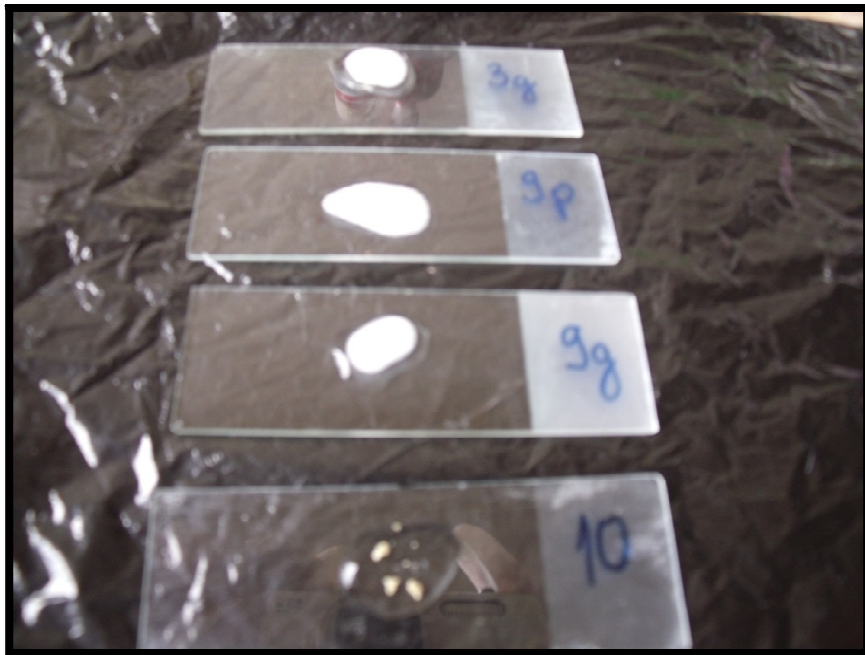
ANEXO No. 4 AISLAMIENTO DE LAS CEPAS OBTENIDAS



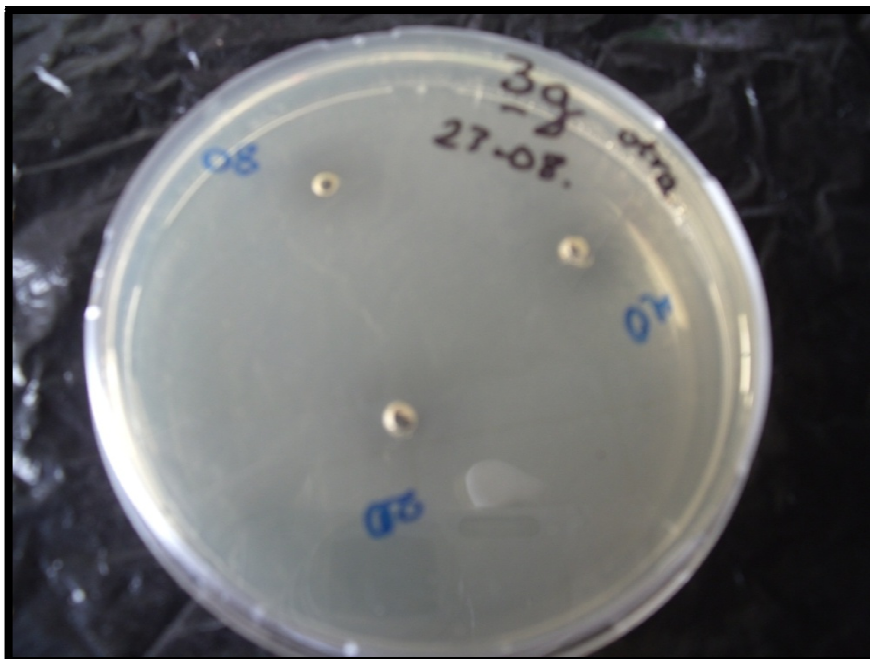
ANEXO No. 6 SEGUNDO AISLAMIENTO DE LAS CEPAS OBTENIDAS



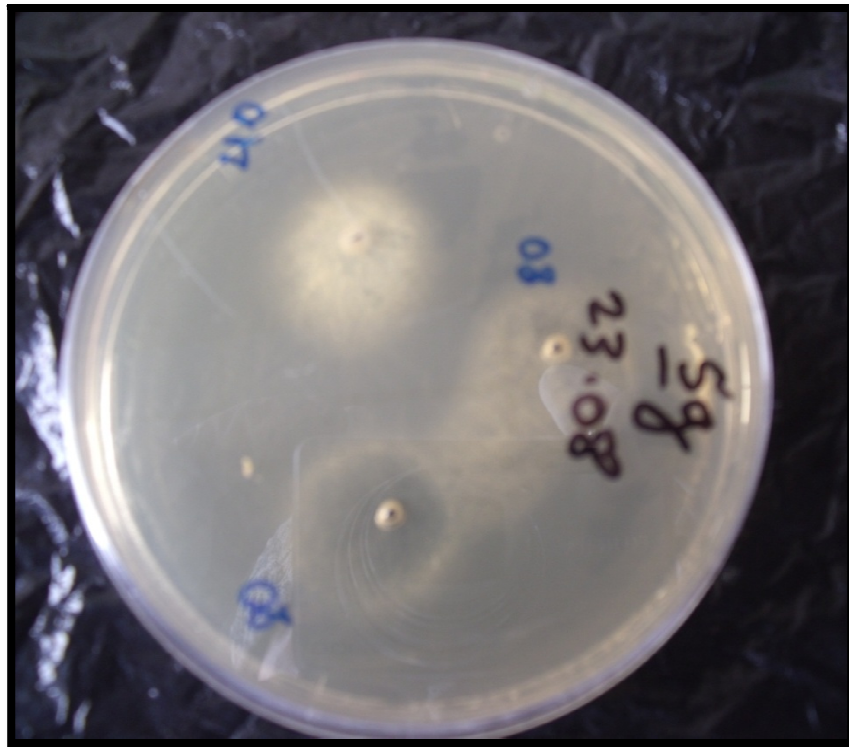
ANEXO No. 7 PRUEBA BIOQUÍMICA, CATALASA 1



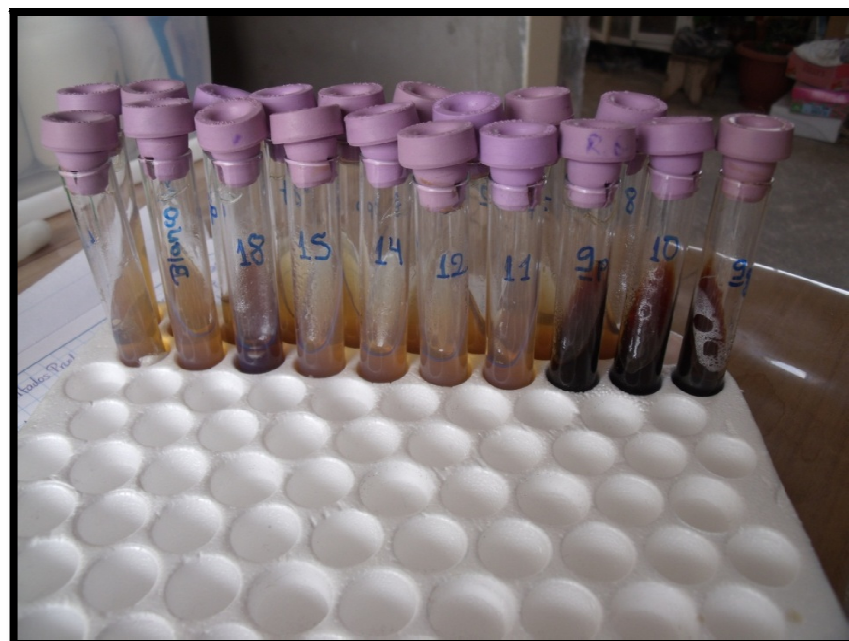
ANEXO No.8 PRUEBA BIOQUÍMICA, CATALASA 2



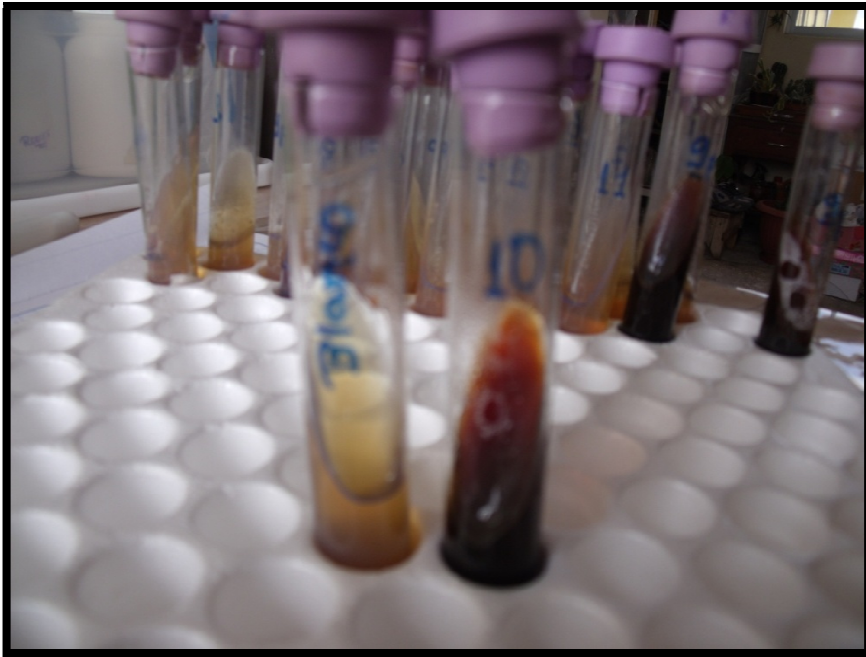
ANEXO No. 9 PRUEBA BIOQUÍMICA, CRECIMIENTO EN TWEEN NEGATIVO



ANEXO No. 10 PRUEBA BIOQUÍMICA, CRECIMIENTO EN TWEEN POSITIVO



ANEXO No. 11 PRUEBA BIOQUÍMICA, DESDOBLAMIENTO DE ESCULINA



ANEXO No. 12 PRUEBA BIOQUÍMICA, DESDOBLAMIENTO DE ESCULINA POSITIVO



ANEXO No. 13 PRUEBA BIOQUÍMICA, DESDOBLAMIENTO DE ESCULINA, COMPARACIÓN ENTRE BLANCO, POSITIVO Y NEGATIVO



ANEXO No. 14 ENSAYO DE BENEDICT (CLORURO FÉRRICO)



ANEXO No. 15 ENSAYO DE ROSENTALER



ANEXO No. 16 ENSAYO DE SUDAN III



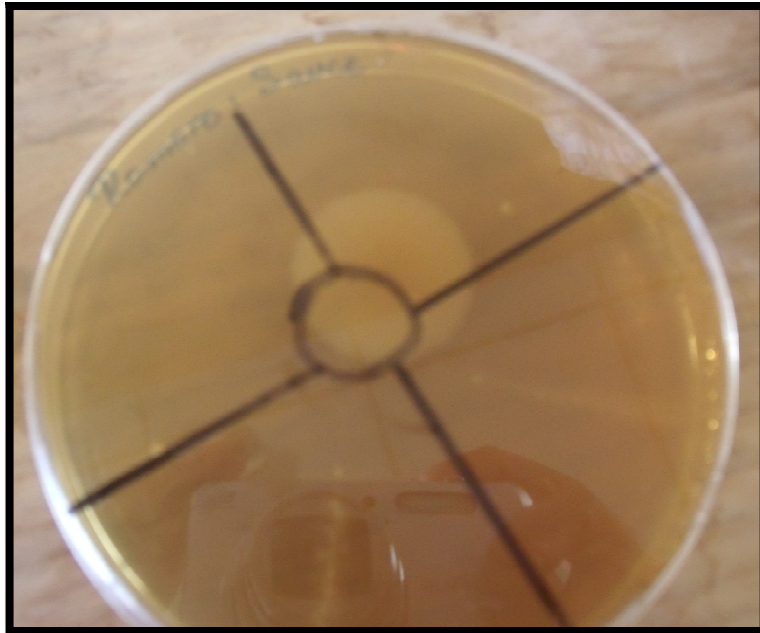
ANEXO No. 17 ENSAYO DE BALJET



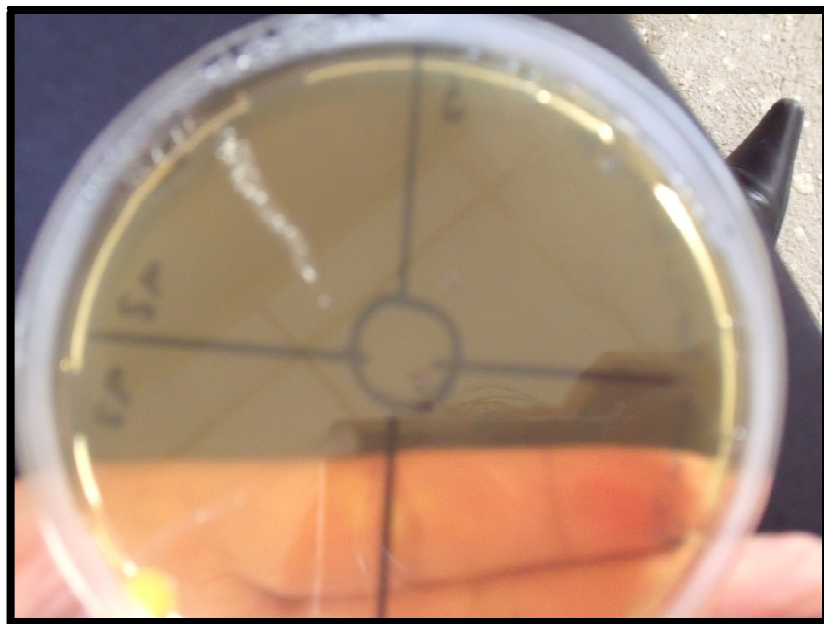
ANEXO No. 18 ENSAYO DE DRAGENDORF



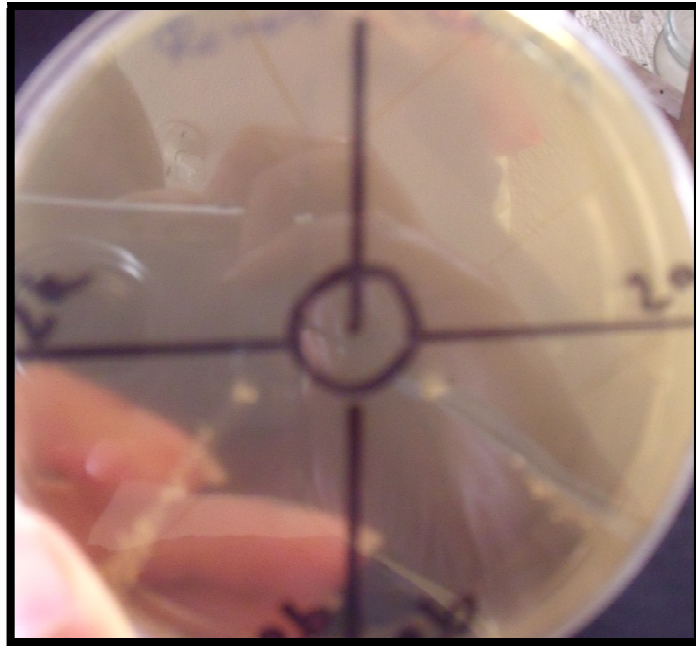
ANEXO No. 19 CALDO DIXON



ANEXO No. 20 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTI *Malassezia globosa*, HIDROESTILADO DE *Rosmarinus officinalis*



ANEXO No. 21 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTI *Malassezia globosa*, HIDRODESTILADO DE *Calendula officinalis*



ANEXO No. 22 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTI *Malassezia globosa* MEZCLA DE LOS HIDRODESTILADOS DE *Calendula officinalis* y *Salix alba*



ANEXO No. 23 EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTI *Malassezia globosa*, BLANCO