



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“ESTUDIO CLINICO DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL GEL CON
TOCTE, HIGO, DULCAMARA Y SALVIA EN NIÑOS DE LA COMUNIDAD
SANJAPAMBA CON *Malassezia furfur*”**

TESIS DE GRADO

PREVIA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE

BIOQUÍMICO FARMACÉUTICO

PRESENTADO POR

MAYRA ALEXANDRA SILVERS ANGUIETA

RIOBAMBA – ECUADOR

2012

DEDICATORIA

A mi madre Sonia que con su amor dedicación me apoyo, ella ha sido mi mayor inspiración de lucha, constancia, para culminar mi formación académica.

A Frank quien de una manera incondicional me apoyo de una forma desinteresada para hacer realidad mis sueños.

A mi familia y a la de mi novio quien con sus consejos me motivaron a no decaer y cumplir mis metas pese a las adversidades.

A todas las personas que de una u otra manera me brindaron su ayuda para concluir este trabajo.

AGRADECIMIENTO

A Dios principalmente por darme la vida guiarme y darme sus bendiciones en cada una de mis pasos.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

A la Escuela de Bioquímica y Farmacia ya que gracias a la misma fui formada e inculcando en mí valores, día a día me fueron impartiendo sus conocimientos científicos, trabajando en servicio a la comunidad.

A la Dra. Cumanda Játiva por su invaluable colaboración y asesoramiento en la dirección de la presente Tesis.

A el Dr. Jacinto Mera Miembro del Tribunal de Tesis por el gran aporte brindado en la ejecución de este trabajo

A todas las personas que colaboraron de alguna manera para la culminación con éxito 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: **“ESTUDIO CLINICO DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL GEL CON TOCTE, HIGO, DULCAMARA Y SALVIA EN NIÑOS DE LA COMUNIDAD SANJAPAMBA CON *Malasseziafurfur*”**, de responsabilidad dela señorita egresada Mayra Alexandra SilversAnguieta, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Tesis, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dr.Silvio Álvarez
DECANO FAC. CIENCIAS

Dr. Iván Ramos
DIRECTOR DE ESCUELA

Dra. Cumandá Játiva
DIRECTORA DE TESIS

Dr. Jacinto Mera
MIEMBRO DE TRIBUNAL

Lcdo. Carlos Rodríguez
**DIRECTOR CENTRO
DE DOCUMENTACIÓN**

NOTA DE TESIS ESCRITA

Yo, (Mayra Alexandra Silvers Anguieta), 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

(MAYRA ALEXANDRA SILVERS ANGUIETA)

ÍNDICE DE ABREVIATURAS.

mL	mililitros
L	Litros
g	Gramos
Kg	Kilogramo
°C	Grados Celsius
V	Volumen
η	Índice de refracción
HR	Humedad Relativa
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
A	Hongo
B ₀	Aplicación inicial(0 horas)
B ₁	Aplicación (cada 24 horas)
B ₂	Aplicación (cada 48 horas)
R ₁	Repetición 1
R ₂	Repetición 2
R ₃	Repetición 3
C	Características del hongo
E	Efecto del gel
Nº	Numero
T	Tocte
H	Higo
D	Dulcamara
S	Salvia
AE	Aceites Esenciales
UE	Unidades Experimentales
C ₁	Concentración de Salvia 1.5 mL
C ₂	Concentración de Extractos de Tocte,Higo, Dulcamara 1.5 mL
PC	Prueba Control (Neo-Nystasolona)
PB	Prueba Blanco (Crema normal)

ÍNDICES

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	
ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE CUADROS	
ÍNDICE DE GRÁFICOS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
INTRODUCCIÓN	
CAPÍTULO I.....	1
1.MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 QUE ES UN ESTUDIO CLINICO	1
1.3.5 COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	21
1.3.6 USOS Y PROPIEDADES.....	21
1.2 USOS Y PROPIEDADES.....	24
1.2.1 Propiedades Comprobadas.....	24
1.4 DULCAMARA (Solanum dulcamara).....	24
1.6 Salvia (Salvia officinalis)	27
1.6.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	28
1.6.5 USOS Y PROPIEDADES.....	29
1.7 HONGO (Malassezia furfur).....	30
1.7.6 PRONÓSTICO.....	37
1.7.7 TRATAMIENTO.....	38
1.8 GEL.....	39
1.8.3 TIPOS DE GEL.....	41
CAPÍTULO II.....	58
2.1 LUGAR Y PRUEBAS DE ENSAYO.....	58
La presente investigación se desarrolló:.....	58
2.2 FACTORES DE ESTUDIO.....	58

2.3	MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS.....	58
2.3.1	MATERIAL BIOLÓGICO Y VEGETAL.....	58
2.3.2	EQUIPOS.....	58
2.3.3	MATERIALES DE LABORATORIO.....	59
2.3.4	REACTIVOS.....	60
2.4	TÉCNICAS.....	60
2.4.1	PREPARACIÓN POR MACERACION DE LAS PLANTAS.....	60
2.4.2	TAMIZAJE FITOQUIMICO DE LOS EXTRACTOS DE TOCTE, HIGO, DULCAMARA Y SALVIA.....	62
2.4.3	CROMATOGRAFIAS EN SILICA GEL.....	67
2.4.4	CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS.....	67
2.5	BIOENSAYO.....	69
2.6	ELABORACIÓN DEL GEL CON TOCTE, HIGO DULCAMARA Y SALVIA	72
2.7	CONTROL DE CALIDAD DEL GEL	73
2.8	ANALISIS MICROBIOLÓGICO DE COSMÉTICA METODO BAM	73
2.9	ESTABILIDAD DEL GEL POR MEDIO DE TERMORESISTENCIA	73
2.10	METODOLOGIA.....	73
2.10.1	FASE DE CAMPO.....	78
2.10.2	FASE DE LABORATORIO	78
2.10.3	DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	79
2.11	TIPO DE DISEÑO EXPERIMENTAL.....	79
2.12	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	82
2.12.2	ANÁLISIS DE VARIANZA.....	84
2.12.3	PRUEBA DE SEPARACIÓN DE MEDIAS PRUEBA DE TUKEY AL 5%	85
2.12.4	COEFICIENTE DE VARIACIÓN.....	85

CAPÍTULO III.....	86
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	86
3.1 CONTROL DE CALIDAD DEL GEL.....	91
3.2 BIOENSAYO.....	91
3.3 ESTABILIDAD DEL GEL POR MEDIO DE TERMORESISTENCIA.....	91
3.4 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL GEL CON EXTRACTOS DE TOCTE, HIGO, DULCAMARA Y SALVIA EN NIÑOS DE LA COMUNIDAD SANJAPAMBA CON <i>Malassezia furfur</i>	96
3.5 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL GEL Y CONTROL (NEO-NYSTASOLONA) EN NIÑOS DE LA COMUNIDAD SANJAPAMBA CON <i>Malassezia furfur</i>	98
3.6 PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL GEL Y CONTROL (NEO-NYSTASOLONA) EN NIÑOS DE LA COMUNIDAD SANJAPAMBA CON <i>Malassezia furfur</i>	99
CAPÍTULO IV.....	102
4. CONCLUSIONES.....	103
5. RECOMENDACIONES.....	103
CAPÍTULO VI.....	104
6. RESUMEN.....	104
SUMARY.....	105
CAPÍTULO VII.....	106
7. BIBLIOGRAFIA.....	106
CAPÍTULO VIII.....	118
8. ANEXOS.....	118

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N. 1	Clasificación Científica del Tocte.....	20
CUADRO N. 2	Clasificación Científica del Higo.....	23
CUADRO N. 3	Clasificación Científica de la Dulcamara.....	25
CUADRO N. 4	Clasificación Científica de la Salvia.....	28
CUADRO N. 5	Características De La Formulación Del Gel.....	45
CUADRO N. 6	Tratamientos del gel con Tocte (<i>Junglans regia</i>), Higo (<i>Ficus carica</i>), Dulcamara (<i>Solanum dulcamara</i>) y Salvia (<i>Salvia officinalis</i>	80
CUADRO N. 7	Resultados de las Propiedades Físicas, Químicas y Bibliográficas de las Maceraciones de Tocte.....	86
CUADRO N. 8	Resultados de las Propiedades Físicas, Químicas y Bibliográficas de las Maceraciones de Higo.....	87
CUADRO N. 9	Resultados de las Propiedades Físicas, Químicas y Bibliográficas de las Maceraciones de Dulcamara.....	88
CUADRO N. 10	Resultados de las Propiedades Físicas, Químicas y Bibliográficas de las Maceraciones de Salvia.....	89
CUADRO N. 11	Resultado del Análisis Organoléptico, Físico y Microbiológico del Gel con Tocte, Higo, Dulcamara y Salvia.....	91
CUADRO N. 12	Resultado de la Estabilidad del Gel a condiciones de Temperatura de 37°C +/- 2 por 12 horas en la estufa.....	95
CUADRO N. 13	Resultado en porcentaje de la reducción de las manchas con el Gel con Tocte, Higo, Dulcamara y Salvia y el Control en los niños con <i>Malassezia furfuren</i> grupos de 24 niños cada 24 horas y 48 horas respectivamente y 6 niños de control en dosis cada 24 y 48 horasRiobamba Enero del 2012.....	96

CUADRO N. 14	Análisis de Varianza de la Actividad antifúngica del Gel y Control (Neo-nystasolona) en la dosificación cada (24 horas) y (48 horas) respectivamente.....	98
CUADRO N. 15	Prueba de Tukey al 5% Para determinar la Actividad antifúngica del Gel y control (Neo-nystasolona) en la dosificación cada (24 horas) y (48 horas) respectivamente.....	99

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N.1	Rango de aceptación en el análisis de datos de la eliminación del hongo <i>Malassezia furfur</i> con el gel con tocte, higo, dulcamara y salvia Riobamba Enero del 2012.....	100
GRÁFICO N.2	Comparación de Tukey en el análisis de datos de la eliminación del hongo <i>Malassezia furfur</i> con el gel con tocte, higo, dulcamara y salvia frente al control (Neo-nystasolona) Riobamba Enero del 2012.....	101

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N.1	Higo (<i>Ficus carica</i>).....	22
FIGURA N.2	Dulcamara (<i>Solanum dulcamara</i>).....	24
FIGURA N.3	<i>Malassezia furfur</i>	30

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

FOTOGRAFÍA N. 1	Tocte <i>Junglans regia</i>	19
FOTOGRAFÍA N. 2	Descripción botánica del tocte <i>Junglans regia</i>	20
FOTOGRAFÍAS N.3	Higo <i>Ficus carica</i>	23
FOTOGRAFÍA N. 4	Salvia (<i>Salvia officinalis</i>).....	27
FOTOGRAFÍA N. 5	<i>Malassezia furfur</i>	31
FOTOGRAFÍA N. 6	Paciente Pitiriasis Alfa.....	34
FOTOGRAFÍA N. 7	Paciente que inicia la Pitiriasis Alfa.....	36
FOTOGRAFÍA N. 8	Raspado de piel para el examen de KOH.....	69
FOTOGRAFÍA N. 9	Hongo visto en el microscopio lente de 10x examen de KOH.....	69
FOTOGRAFÍA N. 10	Crecimiento de la <i>Malassezia furfur</i> en el agar.....	70
FOTOGRAFÍA N. 11	Prueba positiva para la identificación de la <i>Malassezia furfur</i>	71
FOTOGRAFÍA N. 12	Prueba positiva para la asimilación de Tween.....	71
FOTOGRAFÍA N. 13	Análisis microbiológico del gel (AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES T. Y <i>E. COLI</i>).....	77
FOTOGRAFÍA N. 14	Resultados microbiológicos del gel (AEROBIOS MESÓFILOS COLIFORMES T. Y <i>E. COLI</i>).....	92
FOTOGRAFÍA N. 15	Realización de raspado de piel para el examen de KOH.....	92
FOTOGRAFÍA N. 16	Diversas formas del hongo visto en el microscopio lente de 10x exámen de KOH.	93

FOTOGRAFÍA N. 17	Crecimiento de la <i>Malassezia furfur</i> en el Tween 20, 40, 80.....	93
FOTOGRAFÍA N. 18	Prueba de catalasa positiva en Tween 20, 40,60 para la identificación de la <i>Malassezia furfur</i>	94
FOTOGRAFÍA N. 19	Prueba positiva para el crecimiento del hongo a diferentes temperaturas.....	94
FOTOGRAFÍA N. 20	Resultados de estabilidad del gel por Termoresistencia.....	95
FOTOGRAFÍA N. 21	Aplicación del gel con Tocte, Higo, Dulcamara y Salvia en los niños de la Comunidad Sanjapamba con <i>Malassezia furfur</i>	97
FOTOGRAFÍA N. 22	Eliminación total del hongo <i>Malassezia furfur</i> en el rostro con la dosis cada 24 hora.....	97

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N.1	Tabla de resultados de la reducción de la mancha del hongo <i>Malassezia furfur</i> en los niños.....	112
ANEXO N.2	Análisis de Varianza de un factor la eliminación de la mancha del hongo <i>Malassezia furfur</i> en (15 días). Críticas de Análisis.....	114
ANEXO N. 3	Prueba de Tukey al 5% para el Gel con Extractos Puros de Tocte, Higo, Dulcamara y Salvia Frente al control (Neo-nystasolona) para la Eliminación de la mancha del Hongo <i>Malassezia furfur</i> en (15 días). Críticas de Análisis.....	114
ANEXO N. 4	Prueba de Tukey al 5% para el Gel con Extractos Puros de Tocte, Higo, Tocte Dulcamara y Aceite esencial de Salvia Frente al Control (Neo-nystasolona) para la Eliminación de la mancha del Hongo <i>Malassezia furfur</i> en (15 días). Críticas de Análisis.....	114
ANEXO N. 5	Prueba de Tukey al 5% comparaciones y conclusiones para el Gel con Extractos Puros de Tocte, Higo, Tocte Dulcamara y Aceite esencial de Salvia Frente al Control (Neo-nystasolona) para la Eliminación de la mancha del Hongo <i>Malassezia furfur</i> en (15 días). Críticas de Análisis.....	115
ANEXO N. 6	Valores de la amplitud total estudentizada, q 0.05, para uso de la prueba de Tukey (valor de interpolación).....	115
ANEXO N. 7	Fotos de los niños después del tratamiento con el gel dosis cada 24 horas.....	116
ANEXO N. 8	Fotos de los niños después del tratamiento con el gel dosis cada 48 horas.....	118

INTRODUCCIÓN

El uso de las plantas medicinales se ha venido incrementando en la actualidad como una alternativa válida para enfrentar los procesos de deterioro de la salud, práctica que se ve reforzada por el hecho de ser medicamentos de eficacia comprobada. No obstante en el uso de éstas existe un gran desconocimiento sobre como emplearlas, sus principios tóxicos y su dosificación para lograr los efectos terapéuticos deseados.

En las últimas décadas el auge por las plantas medicinales ha incrementado notablemente no solo en nuestro país sino también a nivel mundial. Por este motivo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) incentiva la obtención de los medicamentos a partir de los recursos naturales. En este marco, algunos laboratorios de Farmacología se han abocado a la obtención de antimicrobianos a partir de recursos microbiológicos y de plantas medicinales como la manzanilla, tocte, dulcamara, romero, salvia, ajo, etc.

Dentro de este contexto, los aceites esenciales (AE) son productos naturales de gran valor e importancia económica. La bioactividad de los AE se investiga a partir de los efectos farmacológicos que son producidos por sus metabolitos, los cuales son obtenidos por arrastre de vapor de agua.

La potencialidad farmacológica de las plantas utilizadas es avalada por el uso popular, que indica baja toxicidad de estas especies, la cual sería particularmente importante en el caso de los antimicóticos, que suelen ser muy tóxicos.

Los vegetales en su biosíntesis producen metabolitos secundarios con estructuras específicas como furano cumarinas y enzimas en el Higo (*Ficus carica*); Flavonoides taninos las familias juglandaceae y laminaceas a la que pertenece la Salvia (*Salvia officinalis*) que posee aceite esencial, glucósidos de luteol y apigenol, ácidos fenólicos.

La Dulcamara es nativa de Europa y Asia, es una planta que pertenecen al género Solanum, crece en todo tipo de terrenos, contiene saponinas, glucósidos y ácidos dulcamarico y dulcamaretico, dotado de propiedades antimicrobianas. La cual es usado medicinalmente para afecciones de la piel, alergias, herpes e inflamaciones de la garganta.

Por experiencias en comunidades rurales que el cocimiento de las hojas y corteza del Tocte (*Juglans regia*), se dice que es excelente antifúngico, antibacteriano y cicatrizante para eliminar los hongos ya que en su estructura química contiene taninos, quinonas, ácidos fenólicos, naftoquinonas, catequinas y derivados flavónicos.

Esta investigación fue desarrollada en el Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo y con los niños de la Comunidad Sanjapamba con *Malassezia furfur* este estudio tiene por objeto preparar los extractos vegetales mediante método de maceración, de esta forma poder definir la actividad antimicótica del gel con los extractos de Tocte (*Juglans regia*), Higo (*Ficus carica*) Dulcamara (*Solanum dulcamara*) y Salvia (*Salvia officinalis*) a una determinada concentración en la mancha blanquecina en el rostro característica del hongo (*Malassezia furfur*), elaboración del gel con la ayuda de los principios activos presentes en los extractos vegetales y evaluar estadísticamente el efecto antifúngico del gel.

Los resultados que se obtuvieron en el estudio son positivos en el tratamiento de la eliminación del hongo *Malassezia furfur*.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO.

1.1 QUE ES UN ESTUDIO CLINICO

Los estudios de prometedores medicamentos nuevos y su experimentación en pacientes se conocen como ensayos clínicos, se realiza sólo cuando hay razones para creer que este puede ser beneficioso para el paciente. (3)

Los ensayos clínicos con frecuencia demuestran tener beneficios reales. Los investigadores realizan estudios sobre nuevos tratamientos para conocer su utilidad, el mecanismo de acción, si la efectividad es mayor que otros medicamentos ya disponibles, los efectos secundarios y si son mayores o menores que el convencional, si supera los beneficios a los efectos secundarios y en qué pacientes fue el más útil.(3)

Un estudio clínico es una investigación en el que personas participan como voluntarios. Ya que es una de las etapas finales para evaluar nuevos enfoques prometedores para la prevención, diagnóstico y terapia de enfermedades.(3)

Cuando uno se inscribe en un estudio, recibe un nuevo fármaco y / o procedimiento, o la norma estándar de atención. Los investigadores luego evalúan el efecto de la nueva terapia y lo comparan con el estándar. Los nuevos descubrimientos tienen un papel importante en el futuro del tratamiento, así como en adelantar el nivel general de la atención disponible. (12,3)

Puede encontrarse tantas definiciones de ensayo clínico como enfoques posibles tiene el tema, aunque predomina el enfoque epidemiológico y el finalista (su uso para investigar fármacos). Desde la más simple, que lo define como "una prueba científica de un fármaco, aceptada por el enfermo y amparada por la ley" a las más complejas; de las más amplias a las más restrictivas, hay una amplia variedad. (7)

Podemos decir que el ensayo clínico consiste en un estudio experimental y prospectivo en el cual el investigador provoca y controla las variables y los sujetos (pacientes, la mayoría de los casos) son asignados de forma aleatoria a las distintas intervenciones que se comparan. Debido a que es el tipo de estudio epidemiológico que presenta menores errores sistemáticos o sesgos, constituye la mejor prueba científica para apoyar la eficacia de las intervenciones terapéuticas. El elemento esencial del ensayo es la existencia de un grupo de comparación o grupo de control, que permite probar si la nueva intervención (por ejemplo un nuevo fármaco) es mejor que las ya existentes o no interviene un (placebo). (13)

Un ensayo clínico se inicia cuando surge una hipótesis a partir de estudios no controlados observacionales, descriptivos o retrospectivos, o de ensayos preclínicos. Frecuentemente se descubren en investigaciones preclínicas posibilidades terapéuticas que no tienen ningún beneficio. Muchas veces se realizan actividades médicas cuya utilidad no ha sido demostrada mediante un ensayo clínico, sin embargo llevarlo a la práctica es difícil, sobre todo por el costo económico y de tiempo. Después de ser diseñado debe ser aprobado por un comité de bioética, los pacientes que forman parte deben conocer los objetivos del estudio, sus riesgos y beneficios y firmar el consentimiento informado y podrán abandonar el estudio cuando quieran. Estos finalizan cuando acaban los plazos de tiempo

definidos en el protocolo, o cuando de forma prematura son perjudiciales o beneficiosos los efectos en el brazo experimental.(14)

El estudio clínico que posee el nivel de evidencia más alto para demostrar que el procedimiento médico que se realiza es el más adecuado con los conocimientos científicos que existen en ese momento, debido al diseño del estudio, donde las variables estadísticas están controladas para evitar los sesgos. Así pues, junto con los estudios de meta análisis son la base de lo que se conoce como Medicina Basada en la Evidencia, que no es más que el respaldo de las prácticas clínicas con pruebas consistentes desde el punto de vista científico.(14)

1.1.1CLASIFICACION

- Ensayo clínico ideal

La adecuada combinación de las características de los distintos tipos de ensayos clínicos nos permitirá ir construyendo un ensayo clínico ideal, formado por las clases más potentes, fiables, rigurosas o reproducibles. Aunque el ensayo clínico ideal será aquel que, como se verá, mejor se adapte a las condiciones de cada intervención. (3)

- Estudio controlado

El ensayo clínico es un estudio experimental en el que en el diseño de investigación están definidas las variables y los mecanismos de control de dichas variables, cuya función es evitar los sesgos y las variables de confusión. Existe un grupo con el que se compara la intervención experimental. Este grupo sufre también una intervención con un procedimiento placebo o con un procedimiento estándar de referencia, ya validado para la

situación objeto de estudio. Para que ambos grupos sean comparables todos los factores pronósticos, tanto los conocidos (mediante los criterios de selección) como los desconocidos (mediante la asignación aleatoria), deben estar repartidos por igual entre los grupos antes de iniciar el tratamiento. Puede existir más de un grupo de intervención experimental cuando queremos probar más de una hipótesis, así como más de un grupo de control cuando existe más de una intervención validada que se sabe eficaz. Esto se suele hacer cuando se quiere estratificar la eficacia de las intervenciones. A cada grupo, tanto de intervención como de control, se les llama brazos del estudio.(7)

- Estudio prospectivo: Según la temporalidad, es decir, el momento en el que se define el estudio respecto al tiempo, los estudios pueden ser:
- Estudio retrospectivo: es un estudio longitudinal en el tiempo que se analiza en el presente, pero con datos del pasado.
- Estudio transversal: es un estudio que se realiza con los datos obtenidos en un momento puntual. Es útil para sacar una "instantánea" de la situación existente en un momento dado, como en los estudios de prevalencia.
- Estudio prospectivo: es un estudio longitudinal en el tiempo que se diseña y comienza a realizarse en el presente, pero los datos se analizan transcurrido un determinado tiempo, en el futuro. Las fechas de inicio y terminación se han definido previamente en el protocolo de investigación.
- Estudio aleatorio: Lo podemos encontrar frecuentemente bajo el término *randomizado*, neologismo inglés que en ocasiones hasta se declina como si fuera un verbo castellano: *randomizar*. La aleatorización significa que los casos son distribuidos al azar en cada brazo del estudio. El objetivo es conseguir que los diferentes grupos sean comparables u homogéneos, evitar el sesgo del

investigador en la asignación de casos a los grupos y garantizar que los test estadísticos tendrán valores de significación estadística válidos. Existen varias alternativas metodológicas de aleatorización, que deben ser consideradas en la fase de planificación del estudio, y cuya idoneidad depende de las características del ensayo a efectuar. En Medicina y otras ciencias biológicas, las técnicas de aleatorización más usadas son: (7)

- Aleatorización simple

Consiste en la asignación a cada uno de los brazos con una probabilidad constante y conocida de antemano. Un ejemplo sería en un estudio con dos brazos tirar una moneda al aire. Si sale cara se asigna a un brazo y si sale cruz se asigna al otro brazo. La probabilidad sería constante y conocida: $1/2$. En la actualidad se suele efectuar la asignación utilizando programas de ordenador y se realiza antes del inicio del estudio bien con una tabla o con un generador de números aleatorios oculto al investigador.(7)

- Aleatorización por grupos

También conocida como aleatorización por agregados o *clusterdesign* (del inglés, diseño agrupado), esta técnica agrupa a sujetos heterogéneos entre sí en grupos que se consideran como sujetos individuales de cara al estudio. La homogeneización se realiza entre los grupos seleccionados al igual que la selección del grupo de control. Esta técnica es buena para valorar la utilidad de programas de educación, salud u otros proyectos en los que exista un gran número

de factores pronósticos con la presencia de varios gradientes en los mismos. Así, si por ejemplo queremos valorar la eficacia de un anuncio televisivo para evitar los accidentes de tráfico, los factores pronósticos serían muy variados (edad, sexo, raza, grupo cultural, conducir con o sin licencia, etc.) al igual que los gradientes presentes (antigüedad en la licencia, nivel cultural, duración de la conducción, etc.). Igualmente habría que tener en cuenta la interacción de los individuos en el trabajo, la compra o el colegio, al hablar del anuncio entre ellos. Las técnicas habituales serían muy inexactas o prácticamente imposibles de implementar. En este caso se podría coger como sujetos individuales los pueblos. Se realizaría el estudio en cada pueblo y se compararían los resultados entre ellos. Así, en unos se divulgaría el anuncio televisivo, mientras que en otros no (grupo de control), siendo la selección de los pueblos por sus características similares. Otros ejemplos de grupos podrían ser colegios, o empresas, etc.(7)

1.1.1.1 ASPECTOS ÉTICOS DE LOS ENSAYOS CLÍNICOS

Los criterios éticos son indispensables dentro de todo ensayo clínico. Los participantes deben estar informados y dar su consentimiento informado cuando son incluidos dentro de un ensayo. Los pacientes deben estar advertidos de los eventuales riesgos de una forma exhaustiva. Los ensayos clínicos deben pasar por un comité de ética. Este comité verificará el interés científico y médico del estudio, la relación riesgo/beneficio, la conformidad con las buenas prácticas metodológicas sobre todo a las que conciernen al promotor y al investigador principal del estudio y la presencia de un seguro que permita indemnizar a los participantes en el estudio en caso de daño. Las relaciones financieras

entre los investigadores y los promotores del estudio, cuando existan deben ser anunciadas. Los conflictos de intereses deben ser evitados.(19)

Ezekiel Emanuel refiere siete requisitos que deben guiar la evaluación del marco ético de las propuestas de investigaciones clínicas. Estos requisitos especiales se hacen necesarios porque los sujetos de investigación pasan a ser el medio por el cual se obtiene el conocimiento y en esta condición, el hombre puede ser explotado al exponerlo al riesgo de ser perjudicado en pos del bien de otros. En este contexto, estos requisitos reducen al mínimo el riesgo de explotación y les asegura ser tratados con respeto. (19)

Estos siete requisitos proporcionan un marco sistemático y racional para determinar si una investigación clínica es ética. A su vez, éstos han sido elaborados para guiar el desarrollo y la ejecución de los protocolos y su revisión. Los requisitos han sido elaborados para ser universales, sin limitaciones a una situación en particular, un país o un grupo de investigación. (19)

1.1.1.2 ESTUDIOS CLÍNICOS: ENSAYO CLÍNICO FARMACOLÓGICO

Dado que los animales de laboratorio se presentan como cepas con variabilidad biológica limitada, los estudios realizados con ellos no pueden ser suficientes para determinar sin dudas que un fármaco determinado tendrá las características deseadas de eficacia y seguridad en poblaciones humanas; esto no solo depende de las diferencias entre las especies, sino también de la posibilidad de reacciones que no pueden ser adecuadamente determinadas en animales (cefalea, depresión, etc.).(7)

Por esta razón, antes de su posible aprobación, un fármaco debe ser probado en seres humanos, a través de una metodología que distingue tres fases, considerando el estudio y seguimiento de un fármaco después de su comercialización como una cuarta fase. (7)

1.2 LAS PLANTAS COMO FUENTES DE ANTIFÚNGICOS

Durante el curso de la evolución, algunos hongos han empezado a interactuar activamente con las plantas vivas. La mayoría de estas interacciones son ventajosas para las plantas, así, para su crecimiento y desarrollo, como en el caso de mycorrhizae y endofitos. Una pequeña minoría de especies fúngicas han desarrollado más y han roto el fino balance de beneficio mutuo para empezar a ser patógenos de las plantas. (20)

Sin embargo en la mayoría de poblaciones de las plantas hay individuos que son resistentes a la infección fúngica. (20)

La interacción entre plantas y sus patógenos es compleja y podría ser muy específica para una combinación dada de la planta y los hongos. Las estrategias de defensa de las plantas contra sus patógenos son múltiples e incluyen el uso de químicos antifúngicos. Cuando una espora fúngica entra en contacto con la superficie de la planta, el microclima (temperatura, humedad, condiciones de luz, etc.) tiene que ser correcto antes de germinar. Luego rompe varias líneas de defensa armadas por las plantas antes de alcanzar una célula viva. Estos incluyen: *barreras mecánicas*, tales como una cutícula gruesa; y *barreras químicas*, tales como compuestos de exudado, los cuales inhiben la germinación de la espora y la elongación del tubo germinativo. (20)

Estos compuestos son parte del arsenal de compuestos antifúngicos constitutivos (o preformados) producidos por plantas llamados también metabolitos preinfeccionales,

prohibitinas o fitoanticipinas. Si todas estas armas de las plantas no son suficientes para detener la germinación de la espora fúngica y penetra la hifa a través de la epidermis, la planta usualmente responde por bloqueo o demoramiento del avance del invasor. Especies reactivas de oxígeno son frecuentemente señales de peligro dentro de la célula o para las células vecinas, disparando varias reacciones. Estas incluyen:

- Reforzamiento estructural de la pared celular.
- La respuesta hipersensitiva.
- Desarrollo de resistencia sistémica adquirida.
- La acumulación de nuevos antifúngicos químicos los cuales son llamados fitoalexinas.

"El término FITOALEXINA es usualmente restrictivo a compuestos antibióticos los cuales requieren expresión *de novo* de las enzimas involucradas en su ruta biosintéticas"(Anderson 1991). Esta es una vía muy económica para contraatacar patógenos, porque los recursos energéticos y de carbón son desviados a la síntesis de fitoalexinas sólo en un periodo temprano de la infección, y sólo en su sitio. Plantas no puestas a prueba pueden usar estos recursos para procesos más básicos de vida tales como desarrollo de flores y producción de semillas, o acumulación de carbohidratos de reserva en su órgano de almacenamiento.(20)

Algunas plantas no producen fitoalexinas cuando son retados por patógenos, pero liberan toxinas que son normalmente almacenadas como glicósidos menos tóxicos en las vacuolas de sus células, ej. Glicósidos fenólicos e iridioides, glucosinolatos y saponinas. Si la integridad de las células es rota cuando es penetrada por la hifa fúngica, el glicósido empieza a tomar contacto con enzimas hidrolíticas presentes en otros compartimientos de

la célula, liberando la aglicona tóxica. Aunque esta aglicona liberada después del ataque fúngico no está presente en la planta intacta y es producido como nuevo, ello es estrictamente hablando no fitoalexina, porque las enzimas involucradas (glucosidasas) están ya presentes en la planta sana y no son formadas *de novo*.

Las fitoalexinas han sido encontradas en

- Gimnospermas
- Angiosperma (monocotyledonae y dicotyledonae)

Todas las clases estructurales mayores tales como fenólicos, terpenoides y alcaloides, están representados, y las estructuras son frecuentemente únicas en el ámbito de la familia, por ej. la mayoría de fitoalexinas producidas por miembros de la familia Leguminosae son isoflavonoides mientras que indoles conteniendo azufre son encontrados únicamente en las crucíferas. Sin embargo, en algunas otras familias, una variedad de fitoalexinas correspondientes a diferentes grupos de compuestos son producidos, ejemplo en *Graminae*, *Compositae* y *Moraceae*. (4)

El término fitoanticipina (acuñado por J.W. Mansfield) tiene la siguiente definición "son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular que están presentes en las plantas antes de ser injuriadas por microorganismos o son producidos después de la infección únicamente de compuestos preexistentes" (4).

La naturaleza y nivel de inhibidores preformados para los cuales un potencial patógeno es expuesto, variará dependiendo de factores tales como genotipo del huésped, edad y condiciones ambientales. (4)

Un gran número de compuestos constitutivos de plantas han sido reportados con actividad antifúngica. Ejemplos bien conocidos incluyen: fenoles y glicósidos fenólicos; lactonas insaturadas, compuestos de azufre, saponinas, glicósidos cianogénicos, glucosinolatos, resorcinoles 5-alquilados y dienos. (4)

1.2.1 AGENTES ANTIFÚNGICOS

Polienos antibióticos: Los polienos se unen a los esteroides de membrana (fundamentalmente ergosterol) y esta unión genera la formación de canales acuosos por los que la célula fúngica pierde iones, univalentes y divalentes, y moléculas carbonadas. Está representado por la Anfotericina B, sola y anfotericina B formulaciones lipídicas, y la nistatina. (38)

Azoles y derivados: Inhiben la síntesis de ergosterol, por la inhibición de la enzima citocromo P450 14- α demetilasa y de esta forma se acumulan esteroides metilados que resultan tóxicos para las células, llevando a perturbación de la membrana celular, fungistasis. Está representado por fluconazol, ketoconazol, voriconazol, ravuconazol, itraconazol, posaconazol. (4)

Alilaminas y tiocarbamatos: Las alilaminas bloquean la síntesis de ergosterol, por la inhibición de la escualeno epoxidasa, permitiendo la acumulación de escualeno (que es tóxico para las células). Está representado por la terbinafina. (38). La naftifina y el tolnaftato, son tiocarbamatos de uso tópico. (4)

Morfolininas: Inhibe la esterol reductasa e isomerasas, y está representado por la amorolfina. (38)

Análogos de Nucleósido: Representada por la fluoropirimidina flucitosina (5-fluorocitosina), la cual es transportada hacia el hongo susceptible por una citosina permeasa y luego sufre desaminación a su forma activa (5-fluorouracilo) por la citosina deaminasa, la cual inhibe la síntesis macrocelular de ADN y ARN.

Equinocandinas: Inhiben la síntesis de β -1,3-glucan (el mayor polímero estructural de la pared celular), permitiendo la susceptibilidad de células fúngicas y lisis osmótica. Están representados por caspofungina, micafungin y anidulafungin. (4)

Los agentes antifúngicos actualmente disponibles, son: tóxicos, interaccionan droga-droga, tienen problemas farmacocinéticos, y desarrollan resistencia. (38)

1.2.1.1 MECANISMOS DE RESISTENCIA

Cambios en la interacción fármaco-diana (aumento del número de copias de la diana o modificaciones debido a mutaciones). Por ejemplo la modificación del gen ERG-11 a nivel molecular (mutación genética, conversión y sobreexpresión). (4)

Incapacidad del fármaco para alcanzar la diana dentro de la célula, que puede ser debida a la existencia de barreras de permeabilidad o a sistemas de bombeo activo del compuesto al exterior. Ejemplo la bomba CaMDR1 en *Candida albicans*, cuyo sustrato es el fluconazol (91)

Alteración en la biosíntesis de esteroides. Ejemplo, por pérdida de función de la mutación Δ -5,6-desaturasa, y está relacionada con mutaciones en el gen ERG3, se presenta en *Candida albicans* resistente a fluconazol y puede haber resistencia cruzada a anfotericina B. (38)

Reducción en la concentración intracelular de enzimas blancos. Ejemplo, por citocromo P450 14- α -demetilasa mutada, relacionada con puntos de mutación del gen ERG11; se observa en la *Candida albicans* resistente a fluconazol. (4)

Adicionalmente a los compuestos explicados, a continuación revisaremos brevemente los compuestos antifúngicos emergentes, que actúan en los siguientes niveles:

- **Pared Celular Fúngica**

Síntesis de Glucan: Inhibido por lipopéptidos equinocandinas y papulocandinas.

Síntesis de Citin: Polioxinas y nikkomicinas.

Síntesis de Manan: Pradimicina y benanomicinas.

Síntesis de Glucoproteínas Fúngicas: La reacción, catalizada por Dol-P-Man: proteína O-D-manosiltransferasa es propuesta como un nuevo blanco.

- **Membrana Citoplasmática fúngica**

Síntesis de Esfingolípidos: Aunque muchos pasos en las rutas biosintéticas de esfingolípidos en humanos y hongos son similares, hay enzimas claves que son únicas en los hongos: inhibidores de la Serina palmitoiltransferasa: (Esfingofunginas, viridifunginas, lipoxamicina), inhibidores de la ceramida sintasa (Fumonisin B1 y austrolofungina), inhibidores de la inositol fosfoceramida sintasa (Aureobasidinas, khafrefungina y rustimicina), e inhibidores de la elongación de ácidos grasos (Minimoidin).

Síntesis de Fosfolípidos: Se investiga la síntesis de fosfatidilserina, la cuál es sintetizada de CDP-diacilglicerol en hongos. (23)

Síntesis de Esteroles: Están representados por los antifúngicos clásicos (alilaminas, tiocarbamatos, azoles, morfolinas) (4)

Bombas protónicas: Está representada por folimicinas y bafilomicinas. (4)

- **Síntesis de ADN y proteínas**

Factores de Elongación: Las sordarinas inhiben la síntesis de proteínas por bloqueo de la función del factor de elongación 2 (FE2).

Topoisomerasas: Los compuestos que inhiben el ADN y las topoisomerasas son la pentamidina y bisbenzimidazoles. (11)

Nucleasas: Los compuestos aromáticos dicatiónicos son derivados de pentamidina. (23)

N-Mirosil Transferasa: Entre sus representantes tenemos a una nueva amida di péptida imidazol sustituida y un nuevo inhibidor no peptídico biológicamente activo. (23)

Vías de Señales de Transducción: Cárdenas et al. Se enfocó en el mecanismo de acción de cinco productos naturales, ciclosporina A(CsA), FK506, rapamicina, wortmannina y geldanamicina en señalización; los cuales tienen como blanco a las señales de transducción mediada por calcineurina. (4)

Metabolismo intermedio: Aquí tenemos inhibidores de la síntesis de aminoácidos, como la cispentadina.

Inhibición de Micro túbulos: Está representado por el Benomil. (11)

Inhibidores del Transporte de Electrones Mitocondriales: UK2A, UK3A

Estos compuestos son nuevas guías para modificaciones sintéticas que podrían condicionar el descubrimiento de futuras drogas antifúngicas. (11, 91)

1.2.1.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS METABOLITOS ANTIFÚNGICOS

En cuanto los mecanismos de acción de los metabolitos todavía quedan muchas interrogantes. Se ha probado que los terpenos son los principales responsables de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales. Su efecto antimicrobiano está basado en su habilidad para dañar las biomembranas. En función de sus características lipofílicas interactúan con las enzimas de la membrana e interfieren procesos vitales como la ósmosis, la síntesis de esteroides y fosfolípidos (Lucini *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que los alcoholes fenólicos (timol, carvacrol, eugenol) son los más fuertes inhibidores de los procesos enzimáticos. (23)

Esto se atribuye a su característica lipofílica y sus grupos OH libres. Se ha encontrado que los alcoholes no fenólicos (geraniol, linalol) tienen un efecto menor que los alcoholes fenólicos y su efecto es reducido por la esterificación de los grupos OH (Knoblock *et al.*, 1989; Pepeljnjak *et al.*, 2003). Se conoce que el cineol reduce la división celular y que el limoneno y el α -pineno inhiben el consumo de oxígeno (Peñuelas *et al.*, 1996); también se sabe que el 1-8 cineol inhibe la respiración mitocondrial, la fosforilación oxidativa y la síntesis de ADN (Koitabashi *et al.*, 1996). Los isotiocianatos reaccionan con las proteínas

de los hongos ocasionando su inactivación mediante su unión al grupoamino del aminoácido lisina o con el grupo sulfhidrilo de la cisteína (Tiznado-Hernández *et al.*, 2006). El principal mecanismo de actividad antifúngica de las saponinas es debido a su habilidad de formar complejos con los esteroides en las membranas de los hongos lo cual ocasiona la desintegración de la membrana (Glauert *et al.*, 1962; Morrissey y Osbourn, 1999). Los compuestos fenólicos se ha demostrado que inhiben las enzimas reaccionando con los grupos sulfhidrilos de los aminoácidos (Murphy, 1999). Las quinonas, flavonas, flavonoides, taninos y flavonoles forman complejos con los aminoácidos nucleofílicos de las proteínas lo que conduce a su inactivación (Murphy, 1999). Dentro de los alcaloides los llamados cuaternarios se les atribuyen la propiedad de intercalarse en el ADN lo que ocasiona múltiples efectos en el microorganismo. Muchos hongos fitopatógenos (a excepción de los biotróficos) secretan enzimas hidrolíticas que se difunden en las células del hospedero antes del avance de los microorganismos, lo cual puede ser inhibido por radicales libres de fenoles oxidados que funcionan como inhibidores no específicos, así como taninos, cianidina, delfinidina y malvidina (Schlösser, 1980). (23)

El ácido gálico actúa sobre la polifenoloxidasas de algunos hongos saprófitos y fitopatógenos ocasionando la acumulación de productos de oxidación. Los tulipidos del tulipán se considera que actúan inactivando las enzimas con grupos SH del hongo *Fusarium oxysporum* Schlechtend fsp. Tulipae W. L. Gordon (Overeem, 1976). La alicina del ajo actúa uniéndose a los grupos tiol de las proteínas (Slusarenko, 2008). Las proteínas y los polipéptidos antifúngicos tienen mecanismos de acción muy variados, que incluyen la degradación de polímeros de la pared celular, de los canales de la membrana, la degradación de los ribosomas y la inhibición de la síntesis de ADN. Existen muchas proteínas cuyo modo de acción todavía no se conoce (Selitrennikoff, 2001). (23)

1.2.1.3 PERSPECTIVAS DEL USO DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Si bien podemos decir que ha habido grandes avances en el conocimiento de los metabolitos antifúngicos, el universo por estudiar todavía es grande, tanto en el aspecto de propiedades químicas como biológicas.

A pesar de existir pocas evidencias experimentales, se puede afirmar que una alta diversidad química en una especie vegetal permite una mayor capacidad de defensa. Así como en el control biológico de hongos fitopatógenos donde ha sido difícil obtener productos comerciales estables y eficientes, después de alrededor de cincuenta años de investigación intensa, en el caso de los productos naturales para el control de plagas y enfermedades, también se han tenido ese tipo de dificultades.

Quizá el problema estriba en que en ambos casos se ha pretendido generar productos similares a los agroquímicos o medicamentos sintéticos en sus etapas iniciales, es decir común solo principio activo, pero esto ya se ha visto que en la naturaleza no funciona, por lo que los productos naturales deberían estudiarse en combinaciones diversas para abrir nuevas perspectivas.

También está la otra vertiente de codificar genes de las proteínas antifúngicas para poder crear plantas genéticamente modificadas que incrementen su resistencia al ataque de hongos, tarea en la cual están diversas empresas transnacionales, pero con el problema todavía no superado de su no aceptación hasta que se clarifiquen los riesgos que implican este tipo de materiales. (23)

1.2.2 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS VEGETALES ANTIFUNGICOS

1.2.2.1 Ventajas

2. Son muy conocidos por el agricultor y generalmente se encuentran en su mismo medio.
3. Fácil administración.
4. Eficacia en micosis no extensas.
5. Buena tolerabilidad con escasos efectos secundarios.
6. Buena relación coste-eficacia.(118)

1.2.2.2 Desventajas

1. Escasa eficacia en determinadas infecciones extensas de piel y uñas y cuando está afectado el cabello.
2. Cuando está afectado el folículo piloso o las uñas, su eficacia depende de otras medidas como la limpieza, descostrado y depilación de los pelos afectados, o el desbridamiento en las onicomycosis.
3. Larga duración del tratamiento que requiere disciplina y una gran motivación por parte del paciente.(118)

1.2 TOCTE (*Junglansneotropica*)



FOTOGRAFIA N. 1 TOCTE *Junglans neotropica*
 FUENTE: <http://www.ecoaldeia.com/plmd/nogal.htm>

1.3.1 NOMBRE COMÚN O VULGAR

Cedro, nogal

1.3.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Éste es un árbol notable por el gran tamaño que alcanzan los ejemplares maduros, los cuales llegan a tener unos 30 metros de altura y más de 1 metro de diámetro del tronco. Las hojas del nogal son compuestas y, al machacarlas entre los dedos, revelan un delicioso y distintivo aroma dulzón. (31)

De lejos, esta especie guarda cierto parecido con los cedros (*Cedrela*); al igual que estos, los nogales mudan de hojas cada año, permaneciendo varias semanas completamente desprovistos de follaje. Las flores y los frutos, las flores femeninas y masculinas de los nogales son producidas en ramas separadas. Las inflorescencias masculinas son largas y colgantes y liberan su polen al viento, que ayuda a transportarlo. Los frutos de los nogales son globosos y bastante grandes, de unos 6 cm de diámetro, con la cáscara café y una pulpa oscura que rodea la dura semilla. Esta pulpa ha sido empleada desde hace

mucho tiempo por sus propiedades tintóreas, pues suelta un colorante café oscuro o negro que sirve para teñir telas y para teñir el cabello. La almendra de los frutos de nogal es comestible y es muy buscada como alimento por roedores, como ardillas (*Sciurus*), ñeques (*Dasyprocta*) y Borugos (*Agouti*).⁽³¹⁾

1.3.3 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

CUADRO N. 1 Clasificación Taxonómica del Tocte.

Clasificación Taxonómica



Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Fagales

Familia: Juglandaceae

Género: *Juglans*

Especie: *J. neotropica*

FUENTE: http://es.wikipedia.org/wiki/Juglans_neotropica

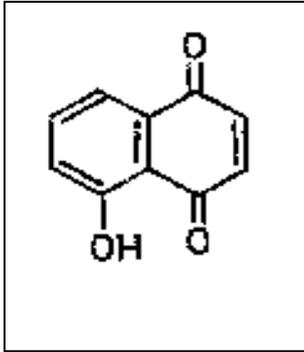
FOTOGRAFIA N. 2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL TOCTE *Juglans neotropica*

FUENTE: <http://www.ecoaldeas.com/plmd/nogal.htm>

1.3.4 ORIGÉN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

El tocte o los nogales (*Juglans*) son un grupo de árboles que se distribuyen en forma silvestre por Norteamérica, el sur de Europa y Asia y, en la región Neotropical, a través de las montañas de Centroamérica y los Andes desde Venezuela hasta el norte de Argentina. En Ecuador sólo se encuentra una única especie, *Juglans*. ⁽³³⁾

1.3.5 COMPOSICIÓN QUÍMICA.



JUGLONA

Derivados naftoquinónicos: Juglona (hojas), Hidrojuglona (hojas), Glucósidos (hojas)

Flavonoides: Hiperósido, Juglandina, Derivados de quercetina, Kaempferol.

Aceite esencial (0,03%): Terpenos monocíclicos, Taninos catéquicos (1%).

En el pericarpio: Agua (hasta un 80%), Glicósido (hidrojuglona: 2%), Taninos (hasta Un 9%), Aminoácidos, Acido ascórbico (1%).

En la semilla: Derivados polifenólicos, Acido gálico, Acido elágico, Taninos, Aceite con Propiedades secantes (50%), Glicéridos, Hidroxitriptamina (117)

1.3.6 USOS Y PROPIEDADES.

1.3.6.1 Medicinales.

Antifúngico, Antiséptico, Queratinizante sobre la piel, Astringentes (hojas y pericarpio), Hipoglucemiante, Antisudoral, Tranquilizante, Antitumoral, Astringente, Tonificante capilar

1.3.6.2 UTILIZACIÓN EN LA PIEL.

La juglona tiene efecto antifúngico, irritante, antiséptico y queratinizante. Las hojas jóvenes y frescas contienen más juglona que las viejas y secas. Por vía externa, las decocciones son útiles en el tratamiento de muchas afecciones de la piel (eccema, acné, dermatitis herpetiforme, escrofuloderma). También se utiliza como astringente debido a su contenido en taninos. (39)

1.4 HIGO (*Ficus carica*).

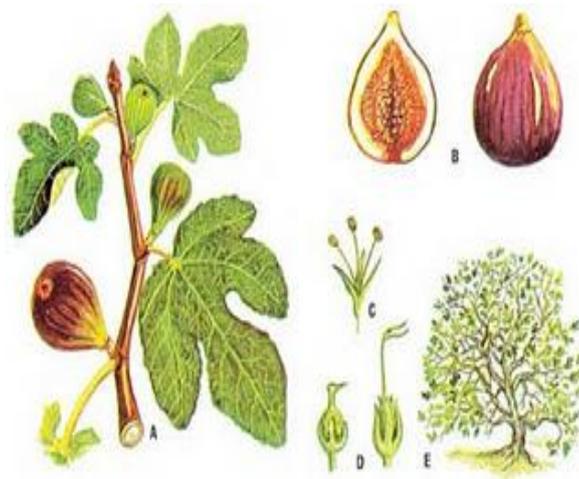


FIGURA N. 1 HIGO *Ficus carica*.
FUENTE: <http://avellaneda.com.es/saucoenflor.jpg>

1.4.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

La higuera es un árbol típico de secano en los países mediterráneos, de la familia de las moráceas.

1.4.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

CUADRO N. 2 Clasificación Taxonómica del Higo

Clasificación Taxonómica



Especie: *F. carica*

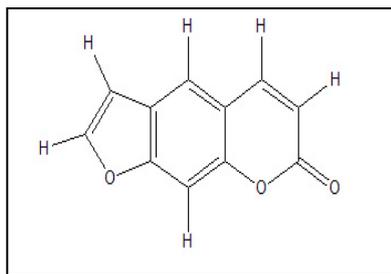
Fuente: http://es.wikipedia.org/wiki/Ficus_carica

FOTOGRAFIA N. 3 HIGO *Ficus carica*

FUENTE: <http://es.wikipedia.org/wiki/Higo>

1.4.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA.

Soraleno



- Azúcares, sales de hierro, calcio, manganeso, bromo, vitaminas A1, B1, B2, C y D; goma.
- Las hojas y siconos verdes poseen un látex con una mezcla de enzimas: ficina, con actividad proteolítica; contienen furocumarinas (psoraleno, bergapteno).
- Las semillas contienen abundantes mucílagos. (26)

1.4.4 USOS Y PROPIEDADES.

1.4.4.1 Propiedades Comprobadas.

Es un alimento energético, laxante, demulcente y balsámico. La ficina le confiere propiedades antiinflamatorias y digestivas.

- Estreñimiento.
- Afecciones respiratorias: resfriados, gripe, faringitis, bronquitis; enfisema, asma.
- Irritaciones gastrointestinales: gastritis, colitis.
- Inflamaciones locales: estomatitis, gingivitis, faringitis, abscesos, forúnculos, quemaduras.
- El látex se emplea popularmente como antiverrucoso.
- Para aquellas personas que realizan esfuerzos físicos o para los niños, el fruto ofrece un gran aporte de azúcar. (31)

1.5 DULCAMARA (*Solanum dulcamara*)



FIGURA N. 2 DULCAMARA (*Solanum dulcamara*).

FUENTE: http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Illustration_Solanum_dulcamara0.jpg

1.5.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Es una planta herbácea perenne del género *Solanum*, nativa de Europa y Asia. Crece en todo tipo de terrenos con una altura promedio de dos metros, aunque podría alcanzar los cuatro, el tamaño de sus hojas varía entre 4 y 12 cm de largo, en forma de una flecha y lobuladas. Las flores se presentan en racimos con cinco pétalos púrpuras y estambres amarillos. La fruta es una baya roja ovoide. (32)

1.5.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

CUADRO N. 3 Clasificación Taxonómica de la Dulcamara

Clasificación Taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

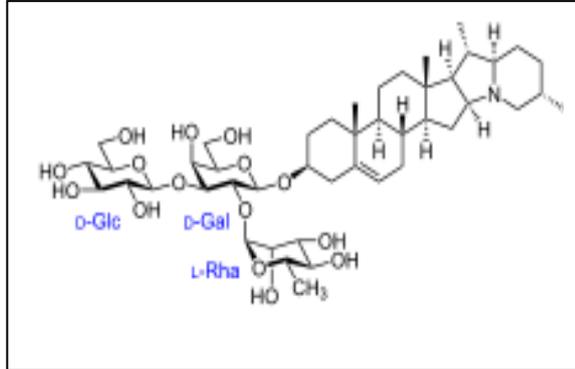
Género: *Solanum*

Especie: *S. dulcamara*

1.5.3 ORIGÉN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

Las solanáceas son una familia de plantas herbáceas o leñosas con las hojas alternas, simples y sin estípulas pertenecientes al orden Solanales, de las dicotiledóneas (Magnoliopsida). Comprende aproximadamente 98 géneros y unas 2700 especies, con una gran diversidad de hábito, morfología y ecología. La familia es cosmopolita, distribuyéndose por todo el globo con la excepción de la Antártida. La mayor diversidad de especies se halla en América del Sur y América Central. (33)

1.5.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA.



Solanina

Es el componente que le da el sabor amargo a la dulcamara. Tiene propiedades insecticidas y fungicidas. Saponosidos: su nombre deriva del latín *sapo*, *saponis* que significa jabón debido a que poseen propiedades tensioactivas, ya que al disolverse en agua y por agitación forman espuma persistente, tienen propiedades detergentes.

Muchas de ellas tienen además propiedades hemolíticas debido a que alteran la permeabilidad de las membranas biológicas resultando tóxicas para animales de sangre fría. Por esta razón, algunas plantas que contienen estos principios activos, han sido empleadas desde la antigüedad en el arte de la pesca.(33)

Tallos, corteza: Glucoalcaloides del tipo de los espirosolanoles: tetrósido de solanodulcina, solamarina, solanósido, solamargina, soladulcamarina. Saponósidos esteroídicos (agliconas: diosgenina, yamogenina, tigogenina. Ácidos dulcamarético y dulcamárico. (33)

Bayas: Licopeno, licoxantina, resinas, taninos, Saponósidos.

1.5.5 USOS Y PROPIEDADES.

Tallos, corteza y eventualmente las hojas: se usan popularmente en caso de estreñimiento, diarrea, estados en los que se requiera un aumento de la diuresis: afecciones genitourinarias (cistitis, ureteritis, uretritis, oliguria, urolitiasis), hiperazotemia, hiperuricemia, gota, hipertensión arterial, edemas, sobrepeso acompañado de retención de líquidos. Eczemas, urticaria, psoriasis, costra láctea, blefaroconjuntivitis, ulceraciones cutáneas, bronquitis, verrugas y cáncer. Bayas frescas (uso tópico): Inflammaciones osteoarticulares, mialgias, contracturas musculares. (35)

1.6 Salvia (*Salvia officinalis*)



FOTOGRAFIA N. 4 SALVIA (*Salvia officinalis*).
FUENTE: <http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:salviajpg>

1.6.1 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.

Es un arbusto muy ramificado, de 30 70 cm de altura, con tallos jóvenes cuadrangulares. Hojas opuestas, pecioladas ovales oblongas, finamente dentadas, verde grisáceas por la faz. Flores azul violáceas, de corona bilabiada, con intenso olor aromático. (69)

1.6.2 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.

CUADRO N. 4 Clasificación Taxonómica de la Salvia

Clasificación Taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Subfamilia: Nepetoideae

Género: *Salvia*

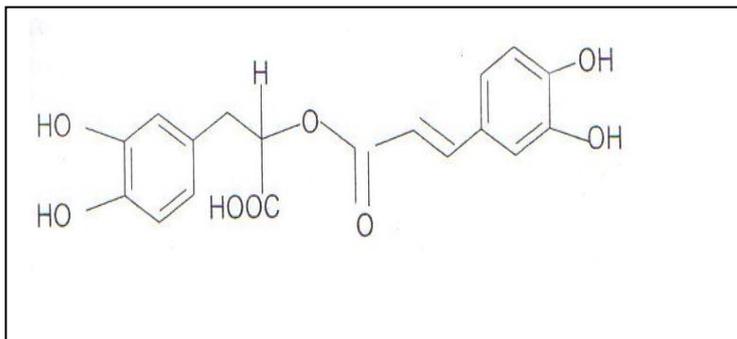
Especie: *S. officinalis*

Fuente: <http://es.wikipedia.org/wiki/Salvia>

1.6.3 ORIGÉN Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

Arbusto de origen mediterráneo oriental, ampliamente cultivado en jardinería, en la zona mediterránea. Partes utilizadas: Hojas y sumidad florida.(72)

1.6.4 COMPOSICIÓN QUÍMICA.



Acido rosmarínico

Aceite esencial (1 a 2,5%), Monoterpenos, Sesquiterpenos, Alcoholes no terpénicos, Sesquiterpenoles, Tuyona, Alcanfor, Aldehídos, Di-terpenos, Flavonoides, Ácidos fenólicos: Rosmarínico, Labiático y Cafeico.

1.6.5 USOS Y PROPIEDADES.

- Emenagogo (principio estrogénico y tuyona del aceite esencial).
- Antiespasmódico (flavonoides, ácidos fenólicos, aceite esencial).
- Colerético (flavonoides, ácidos fenólicos y aceite esencial).
- Estimulante general con acción sobre el S.N.C. (aceite esencial).
- Antiséptico (aceite esencial, ácidos fenólicos y principios amargos).
- Aperitivo eupéptico (principios amargos y aceite esencial).
- Antirradicalar (ácidos fenólicos y flavonoides).
- Anti-hidrótico en uso externo: paraliza las terminaciones nerviosas de las glándulas sudoríparas.
- Estimulante del cuero cabelludo (ácido rosmarínico y principio estrogénico).
- Astringente vulnerario (aceite esencial)
- Antiséptico en uso tópico (aceite esencial).
- Mucolítico, expectorante (aceite esencial) (99)

1.7 HONGO (*Malassezia furfur*)



FIGURA N. 3 *Malassezia furfur*.

FUENTE: <http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:malassezia.jpg>

1.7.1 Taxonomía de *Malassezia furfur*:

Malassezia furfur es una levadura lipófila que forma parte de la flora normal de la piel humana. Además de su participación en la pitiriasis versicolor, se le ha asociado con otras afecciones dermatológicas y con cuadros extracutáneos severos como neumonías, sepsis asociadas a catéter o peritonitis. La existencia de diferencias morfológicas, serológicas, metabólicas, bioquímicas y cariotípicas descritas en estas levaduras ha permitido pensar en una posible división intraespecífica. (41)

Esta hipótesis ha sido plenamente confirmada mediante la descripción de lo que hasta la fecha había sido considerado como *M. furfur* (cepas de *Malassezia* spp. lípido-dependientes) de seis especies: *M. furfur*, *Malassezia sympodialis*, *Malassezia globosa*, *Malassezia obtusa*, *Malassezia restricta* y *Malassezia slooffiae*. *Malassezia furfur*, *Pityrosporum*, Taxonomía, Biotipos, Especies. (56)

1.7.2 CARACTERÍSTICAS DE LA *Malassezia furfur*

Es una levadura lipófila que forma parte de la flora normal de la piel humana. Se conoce fundamentalmente como el agente etiológico de la pitiriasis versicolor, aunque se han incrementado en gran número las patologías con las que se relaciona. Así, además de su participación en la pitiriasis versicolor se le ha asociado etiopatogénicamente en mayor

o menor grado con otras afecciones dermatológicas (dermatitis seborreica y pitiriasis capitis, foliculitis, papilomatosis confluyente y reticulada (síndrome de Gougerot-Carteaud), dermatitis atópica, psoriasis) (41, 122). Asimismo se le ha involucrado en cuadros extracutáneos severos como neumonías, sepsis asociadas a catéter en pacientes que reciben hiperalimentación parenteral con emulsiones lipídicas, o peritonitis en pacientes sometidos a diálisis peritoneal ambulatoria continua. (122,77)

***Malassezia furfur* (Robin) Baillon 1889.** Estas levaduras ya eran conocidas a mediados del siglo XIX (1846-47) y se las relacionaba con el padecimiento de la pitiriasis versicolor. Sin embargo, Eichstedt y Sluyter, autores de estas observaciones, no propusieron ningún nombre para ellas. (113) Posteriormente, en 1853, Robin denominó a este hongo como *Microsporum furfur* y a la pitiriasis versicolor como *Tinea versicolor* pensando que se trataba de un dermatofito similar a *Microsporum audouinii* (113,76).

Desde entonces han sido frecuentes los intentos de clasificación de estas levaduras y numerosas las denominaciones que han conocido,

Debido a que el género *Malassezia* fue creado en 1889 por Baillon, tiene prioridad taxonómica sobre el género *Pityrosporum*, creado por Sabouraud en 1904. La clasificación actual denomina *Malassezia furfur* agente causal de la pitiriasis versicolor y lo incluye en la familia *Cryptococcaceae* de la clase Blastomicetos. (54,87)



FOTOGRAFIA N. 5 *Malassezia furfur*.
FUENTE: MAYARA SILVERS

Malassezia furfur es una especie dimórfica con marcado pleomorfismo, lo que ha conducido desde su conocimiento a intentos de clasificación cuya principal base era la morfología. Debido a sus peculiares requerimientos metabólicos no comenzó a cultivarse hasta 1951 (18), por lo que las descripciones hasta este año solo comprendían estudios microscópicos. Aun así, la adición de una capa de aceite sobre el medio de cultivo no permitía un correcto estudio del aspecto de las colonias, ni tampoco favorecía su estudio metabólico. Más aún, la relativa inactividad auxotrófica que presenta y la ausencia de pruebas estándar de asimilación ha conducido a que este hongo sea un gran desconocido, a pesar de su elevada distribución como colonizante en la piel humana.

Volviendo a su morfología microscópica, es clásica la diferenciación en dos formas -oval y esférica-, denominadas con el género descrito por Sabouraud. Así, *Pityrosporum ovale* se describía como células ovales con una ancha base de gemación (41) y *Pityrosporum orbiculare* incluía levaduras redondeadas con una estrecha base de gemación. (18) Además de las diferencias morfológicas que permitían diferenciar a *Pityrosporum* spp., la existencia de diferencias metabólicas como la utilización de aceite de oliva o Tween 20 como única fuente de carbono, permitió recomendar la existencia de estas dos especies por separado. (111) No obstante, en este mismo trabajo se objetivó una transformación morfológica de estas levaduras que incluso se asociaba a cambios metabólicos (la forma globosa se transformaba a través de sucesivos subcultivos en formas ovales o cilíndricas). Esto propició la hipótesis de un posible ciclo en *M. furfur*, en el que participarían tanto *P. orbiculare* como *P. ovale* (113,111).

La inestabilidad morfológica fue también puesta de manifiesto por otros autores (91,27), y de todos estos resultados se dedujo que *P. ovale* y *P. orbiculare* eran dos diferentes formas pertenecientes a una única especie. (109). Estos resultados fueron ratificados mediante estudios serológicos (92,9) y genéticos, entre los que destaca el de Guého & Meyer, que confirmó la sinonimia de ambas especies al demostrar una complementariedad DNA/DNA superior al 85%. (105) Estos autores concluyeron en su trabajo que solamente estaba justificada la inclusión de dos taxones en el género *Malassezia* (*M. furfur* y *M. pachydermatis*) y que la división de *M. furfur* en dos variantes clínicas y/o morfológicas (correspondientes a *P. ovale* y *P. orbiculare*) no tenía valor taxonómico.

La posterior descripción de una nueva especie (*Malassezia sympodialis*) añadió interés al tema y amplió durante un tiempo a tres las especies del género *Malassezia* (60,55), aunque algunos autores siguieron considerando al género como constituido únicamente por dos especies, *M. furfur* y *M. pachydermatis* (55,56). *M. sympodialis* se consideró como nueva especie debido a su peculiar gemación simpodial (que le confirió el nombre), a un porcentaje de guanina-citosina de 54% (frente a 66% de *M. furfur*) y a unos porcentajes muy bajos de reasociación DNA/DNA con otras especies de *Malassezia*. (55) Aunque tras los resultados genotípicos de Guého y Meyer las evidencias de una “unidad” en la especie *M. furfur* parecían abrumadoras, eran difíciles de compaginar con el hecho de numerosas descripciones que establecían diferentes grupos o categorías fenotípicas claramente diferenciadas dentro de aislamientos de *M. furfur*. Así, se ha constatado a lo largo del tiempo la existencia de diferencias morfológicas, serológicas, metabólicas y bioquímicas que han conducido a la descripción de variantes (56), serotipos (55) o biotipos. (56) La posibilidad de una subdivisión dentro de *M. furfur* comenzó a adquirir verosimilitud cuando se comenzaron a relacionar unos determinados caracteres fenotípicos con bases

Más aún, en la actualidad se puede afirmar que la hipótesis de una diferenciación intraespecífica en *M. furfur* se ha demostrado como cierta, pues quienes propiciaron su “indivisibilidad” han publicado recientemente la existencia dentro de lo que se ha venido considerando como *M. furfur* (cepas de *Malassezia* spp. lípido-dependientes, sin crecimiento en agar Sabouraud) de seis especies genéticamente distintas; *M. furfur*, *Malassezia sympodialis*, *Malassezia globosa*, *Malassezia obtusa*, *Malassezia restricta* y *Malassezia slooffiae* (41).

Todas las especies descritas de *Malassezia*, excepto *M. furfur*, poseen unas características morfológicas estables. Así, estas levaduras pueden presentar formas esférica o globosa (*M. globosa* característicamente y, a veces, *M. furfur*), ovoide (*M. sympodialis*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. furfur*) o cilíndrica (*M. obtusa*, *M. furfur*). (111)

Además, también se han descrito otras características fisiológicas y bioquímicas para diferenciar o caracterizar estas especies. Entre éstas se hallan la reacción de la catalasa, la hidrólisis de la esculina, la capacidad de crecer a diferentes temperaturas o los diversos patrones de asimilación del Tween (Tween 20, 40, 60 y 80). (9, 55, 56) Estas y otras

pruebas en estudio permitirán en un futuro próximo identificar satisfactoriamente las especies de *Malassezia* con medios al alcance de la mayoría de los laboratorios de Micología.

1.7.3 ENFERMEDAD QUE PRODUCE LA *Malassezia* *furfur*.



FOTOGRAFIA N. 6 PACIENTE PITIRIASIS ALFA.
FUENTE: MAYARA SILVERS

La pitiriasis alba es una condición muy frecuente de la piel que ocurre principalmente en la infancia y usualmente se ve sequedad, escamas y palidez dispuesta en forma de parches a nivel de la cara. Generalmente se presenta como un cuadro autolimitado y sólo se requiere de cremas hidratantes.

El nombre proviene por las finas escamas que aparecen al inicio (pitiriasis) y la palidez en forma de parche que se desarrolla (los parches no son totalmente despigmentados, pese a ello, igual se le denomina como *alba*). (123)

1.7.4 ETIOLOGIA.

A pesar de que se ha estudiado desde el siglo XIX, la etiología de la pitiriasis alba no está bien establecida y a la condición se le han adjudicado diversas denominaciones, como erythema streptogenes, pitiriasis streptogenes, e impetigo furfuracea, usualmente

relacionadas con los agentes etiológicos propuestos, sin embargo, no se ha identificado una asociación causal definitiva. (100) Microorganismos como *Pityrosporum*, *Streptococcus*, *Aspergillus* y *Staphylococcus*, se han implicado en su etiología pero ninguno de ellos se ha confirmado como agente causal. (123,100)

Varios factores además de los infecciosos, se han asociado con la etiología de la pitiriasis alba como, la exposición solar, la humedad relativa del aire, la altitud y el viento. (100) El uso de jabones abrasivos, duchas excesivamente largas y la temperatura caliente del agua durante el baño también se han relacionado con la xerosis que se aprecia en esta entidad. (100)

En cuanto a la exposición solar, se plantea que la radiación ultravioleta induce una irritación excesiva de la piel que conlleva a una reacción inflamatoria y que además la acción directa de la luz solar sobre los melanocitos modifica su número y su función conduciendo a una disminución de la intensidad del color de las lesiones en la pitiriasis alba. Esto además se apoya en el hecho de presencia de lesiones en áreas fotoexpuestas y en niños en edades en las cuales hay mayor número de actividades al aire libre.³ Se ha observado que el uso de protector solar frecuente FPS > 15 reduce el desarrollo de pitiriasis alba. (123,100)

La condición dermatológica que se asocia principalmente con la pitiriasis alba es la dermatitis atópica y la presencia de deficiencias nutricionales así como la xerosis es común a ambas, por lo que se ha implicado en la patogénesis de la misma. Las deficiencias nutricionales involucradas son de vitaminas y bajos niveles de cobre, el cobre es un cofactor para la tirosinasa, enzima necesaria para la producción de melanina, por lo que su deficiencia puede jugar papel patogénico en esta entidad. En fin, la etiología

de estas lesiones hipopigmentadas permanece desconocida, y en vista de no identificarse una causa, un patrón histológico específico y como veremos, un tratamiento efectivo, la pitiriasis alba sigue siendo un enigma. (45)

1.7.5 SIGNOS Y SÍNTOMAS QUE SE PRESENTAN.



FOTOGRAFIA N. 7 PACIENTE QUE INICIA LA PITIRIASIS ALFA.
FUENTE: MAYARA SILVERS

Frecuentemente se inicia como placas rosadas con un borde elevado que luego de varias semanas se desvanece dejando una mancha pálida cubierta por una descamación blanquecina polvorienta. (107,123).

Posteriormente progresa a máculas hipopigmentadas de bordes difusos, de tamaño variable entre 0.5 a 5 cm de diámetro. Aunque puede haber ligero prurito en general las lesiones son asintomáticas, por lo que generalmente el paciente no consulta por ellos y se observan incidentalmente en el examen físico. (123,100).

Aunque en el caso de los niños, puede ser motivo de preocupación común en las madres, ya que la mayoría de las lesiones se localizan en la cara, principalmente en la frente y la zona malar, pero también pueden encontrarse en las extremidades superiores y ocasionalmente en las inferiores.(100)

Las lesiones pueden persistir por 6 meses a 7 años, pero este curso puede prolongarse en los pacientes atópicos; en general es una condición autolimitada. Por otro lado, las lesiones pueden ser más visibles en el verano, cuando la piel circundante está bronceada. Luego de la resolución las lesiones pueden reaparecer en la misma localización.(112)

Hipopigmentación post-inflamatoria Psoriasis Tiña versicolor Tiña fasciei Nevus depigmentosos: se presenta antes de los 3 años de edad en el 92.5% de los casos, tiene bordes bien definidos. En la histología no hay cambio en el número de melanocitos.⁹
 Vitiligo: máculas acrómicas bien definidas que se localizan preferentemente en zona periorbitaria y perioral y además afecta extremidades y puede afectar mucosas. Con la lámpara de Wood puede observarse la ausencia completa de melanina. (70) Nevus anémico: es una anomalía congénita, que se encuentra en niños y que se observa como parches bien definidos de piel pálida que al frotarlos se hacen eritematosos.

Histológicamente la piel es normal. (2)Manchas en hoja de trébol hipopigmentadas de la esclerosis tuberosa: se aprecian desde el nacimiento en tronco y extremidades. (71)
 Otros: micosis fungoides hipopigmentada, lepra, eczema numular, hipopigmentación por uso de esteroides, ácido retinoico o peróxido de benzoilo.

1.7.6 PRONÓSTICO.

La palidez en parches puede durar desde 1 mes hasta 10 años, por otro lado, en la cara comúnmente duran por lo menos un año.

A la luz de los hallazgos actuales se puede decir que la etiología y la patogenia de la entidad ameritan mayor investigación. La pitiriasis alba parece relacionarse con la exposición solar intensa y sin protección, hábitos higiénicos inadecuados y principalmente con la dermatitis atópica. En general, el control y la prevención de estos factores es fundamental, sin duda, para el manejo satisfactorio de la enfermedad. (123)

Algunos autores plantean que estos pacientes deben abordarse de forma similar a la dermatitis atópica y que deben ser vistos como pacientes atópicos.(123)

Por supuesto, un conocimiento más profundo sobre los factores etiopatogénicos conllevará al desarrollo de terapias más eficaces que conducirán a una resolución más rápida de las lesiones y sobretodo, permitirá al médico ofrecer mayor información a los padres y a los niños con respecto al carácter benigno de la pitiriasis alba. (107)

1.7.7 TRATAMIENTO.

El tratamiento consiste inicialmente en convencer al paciente de que la enfermedad es benigna y autolimitada ya que hasta ahora, ninguna terapia es completamente exitosa.

Se recomienda limitar la exposición solar, uso regular de protector solar FPS > 15 y reducir la frecuencia y la temperatura de los baños.³ Los emolientes y cremas hidratantes ayudan a disminuir la xerosis y la irritación. (107,123)

En los casos en etapa inflamatoria la desonida o la hidrocortisona tópica al 1% pueden ayudar a la resolución de las lesiones. En los niños solo deben prescribirse esteroides de baja potencia no halogenados.(123,51) La forma extensa de PA no responde a los esteroides tópicos pero si lo hace a terapia con PUVA. (123)

Recientemente se publicó la efectividad de tacrolimus al 0.1% en el tratamiento de esta entidad. El tacrolimus es un macrólido que bloquea la función catalítica de la calcineurina, inhibiendo la síntesis y la liberación de IL-2. La eficacia y la seguridad de tacrolimus en ungüento en el tratamiento de la dermatitis atópica están bien documentadas. Sin embargo, el mecanismo de acción en la pitiriasis alba no es bien entendido.(112)

1.8 GEL.

1.8.1 DEFINICION.

Se denominan geles a coloides transparentes; sistema de dos componentes, rico en líquido, de naturaleza semisólida. La característica común de ellos es la presencia de un tipo de estructura continua que les proporciona las propiedades de los semisólidos.

En la estabilidad de los soles liófilos, en agua, según vimos en la Parte I, interviene otro factor además de la carga (potencial de la doble capa), se cree que ese factor puede ser la hidratación de las partículas y que es también la causa de la elevada viscosidad de los soles liófilos. Todo mecanismo que tiende a reducir la hidratación de las partículas coloidales induce a la coagulación (fenómeno de inestabilidad). (106)

1.8.1.1 MÉTODOS PARA COAGULAR UN SOL.

Este producto obtenido se llama **Gel**.

Por enfriamiento, evaporación, agregado de solventes y acción de grandes cantidades de electrólitos (salazón o salting out) sobre coloides hidrofílicos, bajo determinadas condiciones, se puede lograr la gelificación porque se produce una desolvatación. (106)

Por enfriamiento: es el caso típico de la gelatina, se obtiene por enfriamiento del sol liófilo. (106)

Por evaporación: al reducirse la vaina de hidratación de las cadenas poliméricas se produce la gelificación.(106)

Por agregado de solventes: si se agrega alcohol o acetona a un sol liófilo en el agua, el sistema se hace sensible a los electrólitos, comportándose como un sol liófilo. Esta acción se atribuye a la eliminación por el alcohol o la acetona de la capa estabilizante de moléculas de agua; la estabilidad de las partículas no hidratadas “desnudas” depende del potencial Z , y por consiguiente los electrólitos pueden efectuar la coagulación. (106)

Por electrólitos: el agregado de grandes cantidades de electrólitos (salazón o salting out) a soles liófilos provoca la coagulación o precipitación de las sustancias dispersadas. Esta coagulación se debe a la deshidratación de las partículas dispersas.(106)

Las cadenas poliméricas de un coloide liófilo están protegidas por vainas de moléculas de agua, que solvatan sus grupos funcionales; estas moléculas de agua se unen por puente de hidrógeno a los grupos hidroxilos. La envoltura de agua de hidratación impide que los segmentos de las cadenas se toquen. Los factores que disminuyen la hidratación de moléculas reducen la vaina de hidratación que separan las cadenas poliméricas. Cuando la hidratación es poca, las cadenas contiguas tienden a atraerse mutuamente por fuerzas de Van der Waals. En el proceso de formación de un **Gel** las partículas en el sol se unen gradualmente para formar cadenas cortas y filamentosas (todo este proceso es totalmente dinámico), se entrecruzan, se entrelazan, de modo que la viscosidad del sistema aumenta, llegando finalmente a un estado semisólido, semirrígido gelatinoso. Parte del medio dispersante puede existir como agua de hidratación de las cadenas de

partículas, pero se supone que la mayor parte es retenida entre los filamentos por fuerzas de capilaridad, y se obtiene de esta forma un **Gel** a partir de un sol. La gelificación va a depender de la temperatura, la concentración y del peso molecular de la sustancia gelificante. (106)

1.8.2 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LOS GELES

VENTAJAS

1. Son bien tolerados.
2. Fácilmente lavables
3. Producen frescor

DESVENTAJAS

1. Incompatibilidad con numerosos principios activos.
2. Tendencia a la desecación.
3. Bajo poder de penetración (indicados para tratamientos superficiales)

1.8.3 TIPOS DE GEL.

Podemos clasificar los geles atendiendo a diversos aspectos:

a. Dependiendo de su comportamiento frente al agua

Geles hidrófilos o hidrogeles: constituido por agua, glicerina, propilenglicol u otros líquidos hidrofílicos. Gelificados por sustancias de tipo poliméricas, goma tragacanto, almidón, derivados de la celulosa, polímeros carboxílicos o silicatos de aluminio y magnesio. (21)

Geles hidrófobos o lipogeles: llamados también **oleogeles**. Son geles constituidos por parafina líquida adicionada de polietileno o por aceites grasos gelificados por anhídrido silícico coloidal o por jabones de aluminio y zinc. Los lipogeles son vehículos oleosos oclusivos, de muy diversa consistencia, que los hace aptos para el tratamiento de dermatosis crónica, por su acción emoliente-lubricante. Estos vehículos son de elección debido a su inercia química, especialmente utilizados en los preparados oftálmicos, ya que los principios activos por sus características intrínsecas producen en el paciente un excesivo reflejo de lagrimeo, lo que lleva a un tiempo de permanencia muy corto en el lugar de aplicación. La formulación en el seno de un excipiente oleoso permite solventar este hecho. (22)

A las bases hidrocarbonadas se les puede adicionar sustancias como ceras, lanolina, derivados de la lanolina y alcoholes grasos (cetílico y cetoestéarílico). (25)

Merecen especial mención dentro de este tipo de preparados los denominados Plastibases (N.R.), vehículos de consistencia de gel y reología plástica obtenidos por fusión a elevada temperatura de parafina líquida y polietileno, seguida de un enfriamiento rápido. Estos preparados presentan características muy aceptables de extensibilidad y adherencia a la piel. (22)

b. Según el número de fases en que están constituidos

Geles monofásicos: el medio líquido lo constituye una sola fase o líquidos miscibles; agua-alcohol, solución hidroalcohólica, aceite, etc.

Geles bifásicos: constituidos por dos fases líquidas inmiscibles, formándose una estructura transparente con propiedades de semisólido. (22)

Clasificación de los geles bifásicos: se subdividen en dos grupos

- Los **TOW gels**
- Los **TAS gels**

En los **TOW gels** el lípido se incorpora a la micela que forma el emulgente, el cual se comporta como agente solubilizante. Los TOW gels son geles bifásicos micelares O / W; se presentan en forma de un sistema de cristales líquidos, transparentes, y viscosos. Son sonoros o vibrantes a la percusión, también se les denomina con el nombre de ringing gels. A estos geles se les puede incorporar sustancias tanto lipo como hidrosolubles. (23)

Esta formulación es simple en cuanto a ejecución y comprende:

- Uno o más emulgentes hidrófilos de elevado HLB, capaz de formar micelas.
- Un cosolvente que facilita la micelación del líquido.
- Un lípido fluido.
- Agua.

Los **TAS gels** son geles transparentes basados en emulsiones de siliconas W / S (agua / silicona). Se consideran como una crema transparente de agua en siliconas, de gran aplicación cosmética. (23)

Modus operandi: Mezclar la fase acuosa sobre la fase oleosa lentamente y con agitación.

Se elaboran en frío.

A esta formulación pueden incorporarse diversas sustancias como clorhidrato de aluminio, filtros solares. Se aplican cuando hay que formular geles hidrorrepelentes.

c. Clasificación de los geles por su viscosidad

- Geles fluidos
- Geles semisólidos
- Geles sólidos (formulación de los sticks desodorantes y colonias sólidas)

d. Clasificación de los geles por su estructura

Pueden ser geles elásticos y no elásticos.

Geles elásticos

Un gel típico elástico es el de gelatina, se obtiene por enfriamiento del sol liófilo que resulta cuando se calienta esta sustancia con agua. Otros soles dan geles elásticos, por ejemplo: agar, almidón, pectina, siempre que no sean demasiado diluidos. El gel elástico por hidratación se regenera. Cuando un gel elástico ha tomado mucho líquido, por ejemplo agua, de la fase vapor, todavía puede adsorber cantidades considerables cuando se lo coloca en el líquido, aumentando notablemente el volumen del gel; este fenómeno se llama imbibición o hinchamiento o swelling. (106)

El pasaje de GEL a SOL y de SOL a GEL es gradual para los geles elásticos.

Imbibición y Sinéresis

Imbibición: es la capacidad de adsorber líquido. El disolvente penetra en la matriz del gel y aumenta su volumen.

Sinéresis: el líquido intersticial es expulsado quedando en la superficie del gel y el sistema se contrae.

Geles no elásticos

El gel no elástico más conocido es el del ácido silícico o gel de sílice. Se obtiene mezclando soluciones de silicato de sodio con ácido clorhídrico en concentraciones apropiadas. Un gel no elástico (sílice) se hace vítreo o se pulveriza y pierde su elasticidad por secado. Los geles no elásticos no tienen imbibición o hinchamiento, pueden tomar líquido sin cambio de volumen. (106)

1.8.4 CARACTERÍSTICAS DE LA FORMULACIÓN DEL GEL

CUADRO N. 5 Características De La Formulación Del Gel.

Ingrediente	Función.
Extractos:	Vehículo.
Alcohol Etílico	Antiséptico
Carbopol:	Gelificante
Glicerina:	Humectante
TEA:	Espesante.

FUENTE: <http://es.wikipedia.org/wiki/Champ%C3%BA>

1.9 EXTRACTOS VEGETALES.

Se define como extracto vegetal el producto líquido obtenido a partir de plantas o parte de ellas con varios procedimientos y con varios solventes. (18)

1.9.1 MÉTODO DE EXTRACCIÓN POR MACERACIÓN.

Este método se usa sobre todo cuando se usan partes duras de la planta, como las raíces, cortezas, semillas, maderas, tallos. No debe usarse si la planta contiene aceites volátiles.

La maceración es un proceso de extracción sólido-líquido. El producto sólido (materia prima) posee una serie de compuestos solubles en el líquido extractante que son los que se pretende extraer.

En general en la industria química se suele hablar de *extracciones*, mientras que cuando se trata de alimentos, hierbas y otros productos para consumo humano se emplea el término *maceración*. En este caso el agente extractante (la fase líquida) suele ser agua, pero también se emplean otros líquidos como vinagre, jugos, alcoholes o aceites aderezados con diversos ingredientes que modificarán las propiedades de extracción del medio líquido.

La naturaleza de los compuestos extraídos depende de la materia prima empleada así como del líquido de maceración. En los casos en que se utilice el producto extraído se suele emplear una etapa de secado bien al sol, con calor o incluso una liofilización.

En herboristería, es decir el arte en el cual se utilizan las plantas medicinales y hierbas para curar o preparar diversos productos, se utiliza mucho este método.

El proceso consiste en cortar en pequeños pedazos los vegetales que posean la mayor parte de principios activos (corteza, hojas, frutos, semillas, raíces o la planta entera) durante y mezclarlo con etanol al 75% por 3 días en un lugar oscuro a donde no le lleguen los rayos de sol. Para preparar la maceración se utiliza un recipiente de vidrio y herméticamente cerrado para cada muestra del vegetal se realiza el mismo procedimiento y luego de este proceso se filtra. (40)

1.9.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS.

Es importante establecer los parámetros de extracción para lograr la estandarización del proceso, esto garantizará la calidad, rendimiento, seguridad y eficacia del producto medicinal. Por ejemplo: (2) (8)

- **Naturaleza química de la materia prima vegetal:** conocer las características del metabolito o compuesto químico a extraer.
- **Selección del solvente:** definir la selectividad del solvente a emplear, el solvente óptimo será el que logre extraer un mayor rendimiento del compuesto de interés.
- **Relación sólido-líquido:** la proporción más conveniente de trabajo será aquella con la que se alcancen los mayores rendimientos de extracción.
- **Tamaño de partícula del sólido:** de la forma y dimensión de los sólidos depende en gran medida el éxito de la lixiviación, a menor tamaño de partícula, mayor superficie de contacto entre la droga y el disolvente, y por tanto, mayor acceso de los principios activos al medio líquido; no obstante, tamaños de partícula muy pequeños conducen a la formación de polvos demasiado finos, que pueden causar problemas en el proceso de extracción.
- **Temperatura:** el aumento de la temperatura favorece la extracción, hay que prestar especial atención cuando la sustancia de interés es termolábil o el menstruo es volátil, además, temperaturas elevadas pueden conducir a lixiviar cantidades excesivas de solutos indeseables.
- **Velocidad de agitación y tiempo de extracción:** los óptimos valores de estos parámetros serán aquellos que logren extraer un mayor rendimiento del producto. A mayor tiempo de contacto, mayor capacidad tendrá el disolvente para alcanzar el equilibrio de concentraciones.
- **Viscosidad del medio:** no deben seleccionarse solventes de viscosidad relativamente alta.

El extracto vegetal obtenido se debe caracterizar en cuanto a: sustancias activas y marcadores, densidad, solventes residuales, sólidos totales, pH, control microbiológico y volumen total. (95)

1.9.3 CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS.

El control de calidad se realiza con la determinación de las propiedades organolépticas y físicas de los extractos de Tocte, Higo, Dulcamara y Salvia.

1.9.3.1 Apariencia.

Análisis visual del aspecto de los extractos vegetales.

1.9.3.2 Color.

Se toma un tubo de ensayo bien limpio y seco y se llena hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observa el color, la transparencia, la presencia de partículas y si existe la separación de capas. Se anota los resultados.

1.9.3.3 Olor.

Se toma un tira de papel secante aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de largo y se introduce un extremo en la muestra de ensayo. Se huele y se determina si corresponde con la característica del producto.

1.9.3.4 Determinación del pH

El pH es un índice numérico que se utiliza para expresar la mayor o menos acidez de una solución en función de los iones hidrógeno. Se calcula teóricamente mediante la ecuación:

$$\text{pH} = -\log a[\text{H}^+]$$

$a[\text{H}^+] = \text{Actividad de los iones hidrógeno}$

En la práctica, la medición del pH se lleva a cabo por medio de la lectura de pH en la escala de un instrumento medidor de pH, ya sea digital o analógico.

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.

1.9.3.5 Densidad Relativa.

Se entiende por densidad relativa a la relación entre masa y un volumen de la sustancia a ensayar a 25 °C y la masa de un volumen igual de agua a la misma temperatura. Este término equivale a peso específico.

$$D(25^{\circ}\text{C}) = \frac{(M2 - M) - (M1 - M)}{VOLUMEN}$$

Donde:

M1: Peso de picnómetro con la muestra (g)

M2: Peso del picnómetro con agua (g)

M: Peso del picnómetro vacío (g)

1.9.3.6 Determinación del Índice de Refracción.

El índice de refracción es una constante característica de cada sustancia, la cual representa la relación entre seno del ángulo de incidencia de la luz y el seno del ángulo de refracción cuando la luz pasa oblicuamente a través del medio.

Esta relación viene dada por la ecuación siguiente:

$$\eta = \frac{\text{Sen } i}{\text{Sen } r}$$

Así los refractómetros utilizan como principio de medición, la determinación del ángulo límite el cual presenta en el campo visual un contraste claro y otro oscuro. La línea de separación entre ambos campos establece el ángulo límite de la luz incidente.

Expresión de resultados.

Se realizaron tres lecturas y se calculó el promedio de las mismas; dos o más lecturas no difieren en más de 0.002.

Las determinaciones no se efectuaron a la temperatura de referencia y se empleó la fórmula siguiente:

$$N_d^{25} = N_d^t + 0.00044(t - 25)$$

N_d^{25} = Índice de refracción a 25°C

N_d^t = Valor leído en la escala del refractómetro a la temperatura t

t = valor de la temperatura a que se realiza la medición (°C)

0.00044= Factor de corrección por grado Celsius

1.9.4 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE COSMÉTICOS MÉTODO BAM

1.9.4.1 OBJETO

El propósito de este procedimiento es específico es, establecer el procedimiento para determinar microorganismos en cosméticos.

1.9.4.2 ALCANCE

Este procedimiento se aplica para el análisis microbiológico de cosméticos.

1.9.4.3 RESUMEN DEL PROCEDIMIENTO

INTRODUCCION

Determinar los principales microorganismos que crecen y se reproducen en los productos cosméticos. Los microorganismos pueden causar cambios y deterioro químico en los productos cosméticos y daños para el usuario. Los métodos para el aislamiento de microorganismos de los productos cosméticos son: el recuento directo de colonias y el cultivo de enriquecimiento. Los productos que son insolubles en agua son tratados inicialmente para hacerlos miscibles antes de los procedimientos de aislamiento.

Los microorganismos aislados son identificados por los métodos microbiológicos de rutina o por pruebas de identificación comercial.

El esquema de estos análisis se resume en la figura 1.

Fig. 1: Esquema para el recuento, aislamiento e identificación de microorganismos en cosméticos.

- ▲ Preparación de la muestra.
- ▲ Diluir la muestra preparada en MLB.
- ▲ Distribuir uniformemente 0.1 ml de muestra por duplicado en placas de:

(a)	(b)	(c)	(d)
MLA 48 horas, 30°C	(PDA o MEA) con clortetraciclina 7 días, 30°C	BP (o VJ) agar 48 horas, 35°C (opcional)	Agar para anaerobios MLA 2-4 días, 35°C

- ▲ Enriquecer diluciones MLB durante 7 días, a 30°C. Aislar de las diluciones que muestren recuentos sólo si no hay colonias en las placas de MLA.
- ▲ Contar las colonias y aislar las colonias de interés de MLA y agar MacConkey (y BP o agar sVJ si se utiliza en (c), arriba). De los hongos aislados, véase el texto.
- ▲ Determinar la reacción de Gram, forma de la célula, y la producción de catalasa de los aislamientos purificados.
- ▲ Proceder a la identificación de los aislamientos bacterianos como se describe en el texto, o utilizar pruebas de identificación.

Fig. 1: Abreviaturas: MLB, modified letheen broth; MLA, modified letheen agar; PDA, potato dextrose agar; MEA, malt extract agar; BP, Baird-Parker; VJ, Vogel-Johnson.

1.9.4.4 PRINCIPIO DEL METODO

Los Métodos para el aislamiento de microorganismos de los productos cosméticos se basan en:

- △ El recuento directo de colonias y el cultivo de enriquecimiento.
- △ Los productos que no son solubles en agua son tratados inicialmente para hacerlos miscibles antes de los procedimientos de aislamiento.

1.9.4.5 TERMINOS Y DEFINICIONES

Cosmético: objetos destinados a ser frotados, vertidos, rociados, o aplicados en aerosol, introducidos, o de lo contrario se aplica al cuerpo humano o a partes de ella para limpiar, embellecer, fomentar la atracción, o alterar la apariencia, y (2) objetos de uso como un componente de tales artículos, excepto que dicho término no se incluye jabón.

1.9.4.6 PREPARACION DE LA UNIDAD DE MUESTRA COSMÉTICA PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Desinfectar la superficie del envase de la muestra con la mezcla acuosa de etanol al 70% (v/v) y HCl al 1% (v/v) u otro desinfectante antes de la apertura y la toma de muestra. Use campana de flujo laminar, si es posible. Seque la superficie del envase con un gasa estéril antes de la apertura. Tomar una muestra representativa para el análisis microbiológico, por ejemplo, 1 g (ml) de la muestra.

Para productos que pesen menos de 1 g (ml), analizar todo el contenido.

Si sólo hay una unidad de muestra para diversos análisis, (tales como microbiológico, toxicológico y químico), primero tomar la submuestra para el análisis microbiológico, antes que para los otros análisis. En esta situación, la cantidad de submuestra utilizada para el análisis microbiológico dependerá del número de análisis a realizarse.

en la muestra. Porejemplo, si el contenido total de la muestra es de 5 ml, usar de 1 o 2 ml para los análisis microbiológicos.

1.9.4.7 PRINCIPIO DEL METODO

Los Métodos para el aislamiento de microorganismos de los productos cosméticos se basan en:

- ✦ El recuento directo de colonias y el cultivo de enriquecimiento.
- ✦ Los productos que no son solubles en agua son tratados inicialmente para hacerlos miscibles antes de los procedimientos de aislamiento.

1.9.4.8 TERMINOS Y DEFINICIONES

Cosmético: objetos destinados a ser frotados, vertidos, rociados, o aplicados en aerosol, introducidos, o de lo contrario se aplica al cuerpo humano o a partes de él para limpiar, embellecer, fomentar la atracción, o alterar la apariencia, y (2) objetos de uso como un componente de tales artículos, excepto que dicho término no se incluye jabón.

1.9.4.9 PREPARACION DE LA UNIDAD DE MUESTRA COSMÉTICA PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Desinfectar la superficie del envase de la muestra con la mezcla acuosa de etanol al 70% (v/v) y HCl al 1% (v/v) u otro desinfectante antes de la apertura y la toma de muestra. Use campana de flujo laminar, si es posible. Seque la superficie del envase con una gasa estéril antes de la apertura. Tomar una muestra representativa para el análisis microbiológico, por ejemplo, 1 g (ml) de la muestra. Para productos que pesen menos de 1 g (ml), analizar todo el contenido.

Si sólo hay una unidad de muestra para diversos análisis, (tales como microbiológico, toxicológico y químico), primero tomar la submuestra para el análisis microbiológico, antes que para los otros análisis. En esta situación, la cantidad de submuestra utilizada para el análisis microbiológico dependerá del número de análisis a realizarse en la muestra. Por ejemplo, si el contenido total de la muestra es de 5 ml, usar de 1 o 2 ml para los análisis microbiológicos.

1.9.4.10 INFORME DE RESULTADOS

Reporte el resultado como Recuento de Aerobios en Placa /g(ml) de muestra. Si las placas no contienen colonias de 25 a 250, registrar la dilución y el número de colonias presentes.

Para placas de BP, contar las colonias típicas (convexas, de color negro brillante, con sin halo transparente que rodea la colonia). (NOTA: las colonias coagulasa positivas producen un halo transparente, pero las colonias coagulasa negativas pueden o no producir este halo. Si las colonias coagulasa negativa presentan el halo, esta irregularidad se reporta distinguiéndolas de las colonias coagulasa positivas.)

Si no hay desarrollo de colonias en las placas de la dilución más concentrada, presentar el resultado como número estimado de UFC menor que ($<$) 1,0 multiplicado por el respectivo factor de dilución. De la misma forma reportar en el caso de que en la dilución menos concentrada presente más de 250 colonias.

De cada placa de crecimiento de BP de muestra, escoger una o más colonias típicas para confirmar su reacción coagulasa. La transferencia de las colonias de agar inclinado de cualquier medio de mantenimiento adecuado, por ejemplo, trypticase (tríptico) agar de soja (TSA), la infusión de cerebro-corazón (BHI) agar. Incubarse en inclinación hasta que el crecimiento es evidente.

Calcular el número de organismos *Staphylococcus aureus* presente en primer lugar la determinación de la fracción de las colonias de prueba que son coágulos positivos. Multiplique esta fracción por el número promedio de colonias de *Staphylococcus* contaba con las placas de BP. Multiplicar el número obtenido por el factor de dilución y reportar el número de *S. aureus*/g (ml) de muestra.

Si no se obtienen en las colonias de MLA o BP medios de comunicación, observamos que ya preparar diluciones MLB mientras que enriquecера $30 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 7 días. Examine enriquecimientos diariamente para crecer. Después de 7 días de incubación, cuando el crecimiento se sospecha, las ubculturas de todos los enriquecimientos en los dos ejes de acción de las placas de agar MacConkey. Incubar las placas 48 horas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$.

Hongos, levaduras, mohos y recuento en placa. La transferencia de 0,1 ml de diluciones seriadas (H1, más arriba) debidamente etiquetados para placas duplicadas de cualquier agar extracto de malta (MEA) o la patata dextrosa agar (PDA), ambos con 40 ppm de clortetraciclina. Correlacionó sobre la superficie del medio con la barrera de esparcidor de vidrio estéril. Después de inocular es absorbido por el medio, invertir las placas e incubar a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, y observar al día durante 7 días. La media de los recuentos obtenidos en las placas de duplicar, multiplicar por 10 para permitir el volumen plateado (0,1 ml), se multiplicar por el factor de dilución, y el informe como la levadura o el moho contar/g (ml) de muestra. De enriquecimiento por hongos (opcional), diluir la muestra preparada decimalmente en caldo Sabouraud dextrosa e incubar como se describió anteriormente para las diluciones de las Grandes Ligas. Si se produce el crecimiento, la racha en agar glucosado de Sabouraud, MEA, o PDA. Los últimos dos agar que contienen 40 ppm de clortetraciclina.

Recuento en placa anaeróbico (uso sólo para talcos y polvos). El objetivo principal de este procedimiento es detectar el bacilo tetánico (*Clostridium tetani*), lo que puede ocurrir en estos productos. Según lo descrito anteriormente para APC, utilizando agar MLA, antes de la reducción de agar anaerobio, y el 5% de agar sangre de oveja de fibrinada para la siembra. Incubar las placas de agar sangreen la atmósfera de dióxido de 5.10% de carbono (frasco de vela o un incubador de CO_2), y las placas de agar anaerobio en la marmita de anaerobios. Incubar ambos durante 48 horas antes del conteo. Encubarlo durante 2 días más sino aparecen colonias a las 48h. Pre-

reducirlasplacasdeagaranaeróbicoantesdelainoculación,colocándolosenunaatmósferaanaerobiadurantelanoche(16.12h). Incubarlasplacasdeagaranaerobioenunambienteanaeróbico(frascosanaeróbico,incubadora,oenlaguantera)por2díasa $35\pm 2^{\circ}\text{C}$,incubarlasplacasaeróbicamenteMLAdurante2díasa $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ comoelcontroldeaeróbicos. Anaerobiosestrictossólocrecerá enlamarmitadeanaerobios. Serecomiendaqueunapequeñacantidad(0,1ml)deinoculóseutilizaparadisminuir laexpansióndelcrecimientocausadoporlahumedad,yquelasplacasinoculadas secolocanenunaatmósferaanaerobiaencuestióndeminutosdespuésdelainoculaciónparareduciralmínimolaexposiciónaloxígeno.

Organismosanaeróbicosospechasesubcultivaroneróbicamente(enCO₂)yanaeróbicaparaestablecersurelaciónoxígenocierto. Compruebesihayesporasterminalesituadosenelcaldodecarnecocidaseincubaa 35°C durante2días. Elusodeunatincióndiferencialdeesporasparadetectarlas esporasesobligatorio.

Siunmicroorganismoanaeróbicoobligadoestáaislado,consulteADHitchins,FDA,Washington,DC20204,paraobtenerinformaciónsobrecómo proceder.

Pruebadedetecióndeparaelnúmerototaldemicroorganismospresentesenloscosméticosutilizadosynoutilizados. Mediossólidos,temperaturasdeincubacióny tiemposdescritosenH3.1sepuedeaplicar,segúnproceda,alasmuestraspreparadascomosemuestranen1.5GaloscsméticosdepantallaparaelrecuentototalantesderealizarlasevaluacionesmicrobiológicascompletacomosedescribenH1-

3arriba. Silamuestracontiene<10ufcpormlogramosdeproducto,unapruebadedetecióncn1ml deladiluciónde10-

1enlatécnicadeplacaverterdeberíadarresultadosnegativosdecrecimiento. Silamuestracontiene<100UFCpormlogramosdeproducto,unapruebadedetecióncn0,1ml deladiluciónde10-1enlatécnicadeplacasdiseminarondebeproducirunresultadouncrecimientonegativo.

CAPITULO II

1. PARTE EXPERIMENTAL

2.1 LUGAR Y PRUEBAS DE ENSAYO.

La presente investigación se desarrolló:

- Laboratorio de Fitoquímica de la Facultad de Ciencias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- Escuela Nueve de Octubre

2.2 FACTORES DE ESTUDIO.

Se consideraron como factores de estudio de esta investigación:

- Actividad antifúngica del gel con Tocte, Higo, Dulcamara y Salvia.

2.3 MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

2.3.1 MATERIAL BIOLÓGICO Y VEGETAL.

- Piel de los niños con *Malassezia fufur* en la Comunidad Sanjapamba porque este tipo de micosis es común en los niños por falta de aseo y cuidadopersonal.
- Tocte (*Junglans regia*), Higo (*Ficus carica*), Dulcamara (*Solanum dulcamara*) y Salvia(*Salvia officinalis*), recolectado 21 de Noviembre del 2011 en el Mercado mayorista y los jardines de la ESPOCH.

2.3.2 EQUIPOS.

- Balanza técnica (ELB 300),
- Reverbero Eléctrico,
- pH metro (JENWAY 430),
- Microscopio,

- Viscosímetro,
- Cámara Digital,
- Refrigeradora,
- Computadora,
- Sorbona.

2.3.3 MATERIALES DE LABORATORIO

- Pipetas 1, 5, 10 ml,
- Pera de succión,
- Varilla de agitación,
- Ollas,
- Cuchillos,
- Frascos de vidrio,
- Gradilla,
- Tubos de ensayo,
- Pinzas para tubos,
- Toallas absorbentes,
- Embudos,
- Cajas petris,
- Picnómetro,
- Vasos de precipitación 25,50,
100, 500 y 10

2.3.4 REACTIVOS

- Acetato Tricloro Acético,
- Reactivo de Cloruro férrico,
- Reactivo de $\text{SbCl}_3 / \text{HClO}_4$,
- Gelatina – Cloruro de Sodio,
- Reactivo de Shinoda,
- Reactivo de Dragendorff,
- Reactivo de Carr-Price,
- Reactivo de Libermann Buchard,
- Agua Destilada,
- Tricloruro de Antimonio
- Alcohol etílico,

2.4 TÉCNICAS

2.4.1 PREPARACIÓN POR MACERACION DE LAS PLANTAS

2.4.1.1 PREPARACIÓN POR MACERACIÓN DE LA CORTEZA DETOCTE(*Junglans regia*)

Se extrae de la planta del tocte una parte considerable de corteza, se procede a lavar con agua con cloro el mismo que se pondrá en una cantidad de 5 mL por cada litro de agua y se lo deja sumergido por 5 min, luego se le lava con abundante agua y se procede a cortar en pedazos pequeños, después se procede a pesar 110,7 g de corteza y se lo vierte en un envase de vidrio de boca ancha se añade 250 mL de alcohol etílico al 75% se le tapa herméticamente y se lo coloca en un lugar oscuro por 3 días, se lo agita de vez en cuando. Filtrar, el filtrado concentrar a $\frac{1}{4}$ de su volumen colocar en frascos de vidrio herméticamente sellados, etiquetar, dejar en un lugar fresco y oscuro.

2.4.1.2 PREPARACIÓN POR MACERACIÓN DE HIGO(*Ficus carica*)

Se extrae de la planta del higo una parte considerable de hojas y ramas lavar con agua con cloro el mismo que se pondrá en una cantidad de 5 mL por cada litro de agua y se lo deja sumergido por 5 min, luego se le lava con abundante agua y se procede a cortar en pedazos pequeños, después se procede a pesar 333,4 g de corteza y se lo vierte en un envase de vidrio de boca ancha se añade 250 mL de alcohol etílico al 75% se le tapa herméticamente y se lo coloca en un lugar oscuro por 3 días, se lo agita de vez en cuando. Filtrar, el filtrado concentrar a $\frac{1}{4}$ de su volumen colocar en frascos de vidrio herméticamente sellados, etiquetar, dejar en un lugar fresco y oscuro.

2.4.1.3 PREPARACIÓN POR MACERACIÓN DE LAS CAPSULAS DE DULCAMARA (*Solanum dulcamara*)

Se compra las capsulas de la planta del Dulcamara, se procede a pesar cada capsula llena, y vacía para sacar la diferencia y saber cuanto pesa el polvo de Dulcamara que se encuentra en el interior de cada capsula, se obtuvo un peso total de 17.746 g se lo vierte en un envase de vidrio de boca ancha se añade 30 mL de alcohol etílico al 75% se le tapa herméticamente y se lo coloca en un lugar oscuro por 3 días, se lo agita de vez en cuando. Filtrar, eliminar el solido, el liquido concentrar a $\frac{1}{4}$ de su volumen, colocar en frascos de vidrio herméticamente sellados, etiquetar, dejar en un lugar fresco y oscuro.

2.4.1.4 ACEITE ESENCIAL DE LA SALVIA(*Salvia officinalis*).

Se adquirió el aceite esencial puro de Salvia (*Salvia officinalis*)de origen Turco.

2.4.2 TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS DE TOCTE, HIGO, DULCAMARA Y SALVIA.

Para determinar cualitativamente los metabolitos presentes en Tocte (*Junglans regia*), Higo(*Ficus carica*), Dulcamara (*Solanum dulcamara*) y Salvia(*Salvia officinalis*), se prepararon extractos etanólicos y se utilizaron los solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración. (33)

2.4.2.1 Reacción Para Identificación de Compuestos Fenólicos

Ensayo de Cloruro Férrico.- A 1 mL del extracto etanólico de tocte de color pardo, se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (Cloruro de sodio al 0,9 % en agua) se determino que es positivo porque presenta un cambio de color a negro.

A 1 mL del extracto etanólico de higo de color pardo, se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (Cloruro de sodio al 0,9 % en agua) se determino que es positivo porque presenta un cambio de color a negro.

A 1 mL del extracto etanólico de dulcamara de color pardo, se le adicionan 3 gotas de una solución de tricloruro férrico al 5% en solución salina fisiológica (Cloruro de sodio al 0,9 % en agua) se determino que es positivo porque presenta un cambio de color a negro.

2.4.2.2 Reacción Para Identificación de Triperpenoides

Ensayo de Acido tricloroacético.- A 1 mL del extracto etanólico de Higo, se le añade cristales de ácido tricloroacético se le lleva al calor y si se presento un cambio de coloración de café oscuro a naranja por lo tanto la prueba es positiva para triterpenos tetracíclicos y esteroidales. (33)

Ensayo de Carr-Price.- A 1 mL del extracto etanólico de Higo, se le añade reactivo, si se da el cambio de color de café oscuro a una coloración azul se determina positivo para vitamina A, derivados de colestano con dieno o trieno potencial en anillos A y B.(33)

Ensayo de Gelatina- cloruro de sodio.- A 1 mL del extracto etanólico de Tocte, se le añade 1 gota de reactivo (1 gr. de gelatina disuelto en 100 mL de agua con 10 g de cloruro de sodio), la mezcla se torna parda se determina positivo para taninos.(33)

A 1 mL del extracto etanólico de Dulcamara, se le añade 1 gota de reactivo (1 gr. de gelatina disuelto en 100 mL de agua con 10 g de cloruro de sodio), la mezcla se torna parda se determina positivo para taninos. (33)

Ensayo de Libermann-Buchard.-A 1 mL del extracto etanólico de Higo, se le añade 1 gota de reactivo, la reacción se determina como positiva ya que la mezcla se torna, azul verdoso indica que tiene esteroides con doble enlace.(33)

Ensayo de $\text{SbCl}_3/\text{HClO}_4$.-A 1 mL del extracto etanólico de Dulcamara, se le añade 1 gota de reactivo (25% de SbCl_3 en HClO_4 al 60%), se presento una coloración rosada se el cual determino como positiva la reacción para Δ^5 -sapogenina. (33)

2.4.2.3 Reacción Para Identificación de Flavonoides

Ensayo de Shinoda.- A 1 mL del extracto etanólico de Tocte, 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 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen. (33). El ensayo se considero positivo, ya que el alcohol amílico se colorea de rojo

A 1 mL del extracto etanólico de Higo, 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 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen. (33). El ensayo se considero positivo, ya que el alcohol amílico se colorea de rojo.

A 1 mL del extracto etanólico de Dulcamara, 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 1 mL de alcohol amílico, se mezclan las fases y se deja reposar hasta que se separen. (33). El ensayo se consideronegativo, ya que el alcohol amílico se colorea de naranja.

2.4.2.4 Reacción Para Identificación de Alcaloides

Ensayo de Dragendorff.- A 1 mL del extracto etanólico de Tocte, por la pared del tubo de ensayo se deja resbalar 1 mL del reactivo y se agita. Da como positivo ya que tiene por un cambio rápido de coloración a naranja.(33)

A 1 mL del extracto etanólico de Higo, por la pared del tubo de ensayo se deja resbalar 1 mL del reactivo y se agita. Da como positivo ya que tiene por un cambio rápido de coloración a naranja. (33)

A 1 mL del extracto etanólico de Dulcamara, por la pared del tubo de ensayo se deja resbalar 1 mL del reactivo y se agita. Da como positivo ya que tiene por un cambio rápido de coloración a naranja. (33)

2.4.2.5 Reacción Para Identificación de Saponinas

Ensayo de Espuma.- A 1 mL del extracto etanólico de Tocte, se añade un mismo volumen de agua y se procede a una agitación del tubo de ensayo. Se considera negativo ya que no aparece espuma en la superficie del líquido.

A 1 mL del extracto etanólico de Higo, se añade un mismo volumen de agua y se procede a una agitación del tubo de ensayo. Se considera negativo ya que no aparece espuma en la superficie del líquido.

A 1 mL del extracto etanólico de Dulcamara, se añade un mismo volumen de agua y se procede a una agitación del tubo de ensayo. Se considera negativo ya que no aparece espuma en la superficie del líquido.

2.4.3 CROMATOGRAFIAS EN SILICA GEL

2.4.3.1 CROMATOGRAFIA PARA EL TOCTE

Absorbente: Placa de Oxido de Aluminio

Solvente de corrido: Acetato de Etilo– Acido fórmico – Acido Acético Glacial– Agua(100:11:11:26) V/V

Muestra: Extracto etanólico de la corteza del tocte

Revelador: Polietilen glicol



AMONIACO

Rf
0.4
0.45
0.55



YODO

2.4.3.1 CROMATOGRAFIA PARA EL HIGO

Absorbente: Placa de Oxido de Aluminio

Solvente de corrido: Tolueno – Éter (1:1) V/V

Muestra: Extracto etanólico de las hojas y ramas del higo

Revelador: Etanol-KOH



YODO

Rf
0.4
0.45
0.55
0.65



AMONIACO

2.4.3.1 CROMATOGRAFIA PARA LA DULCAMARA

Absorbente: Placa de Oxido de Aluminio

Solvente de corrido: Cloroformo-2-Propanol-Di etil amina (8:5:1) V/V

Muestra: Extracto etanólico de las capsulas de Dulcamara

Revelador: Dragendorf



A PRIMERA VISTA

Rf
0.4
0.62
0.83



YODO

2.4.3.1 CROMATOGRAFIA PARA EL ACEITE ESENCIAL DE LA SALVIA

Absorbente: Placa de silica gel G_{F 254}

Solvente de corrido: Tolueno – Acetato de Etilo(9.3:7) V/V

Muestra: Aceite Esencial de Salvia

Revelador: Rosentaler



1	2	3
---	---	---

Rf
MUESTRA
1
0.25
0.3
0.36
0.65

- 1.- Salvia
- 2.- Manzanilla
- 3.- Tocte

2.4.4 CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS.

El control de calidad se realiza con la determinación de las propiedades organolépticas y físicas de los extractos de Tocte, Higo, Dulcamara y Salvia.

2.4.4.1 Apariencia.

Análisis visual del aspecto colocando en un tubo de ensayo las muestras de extractos etanólicos de Tocte, Higo, Dulcamara y Salvia respectivamente.

2.4.4.2 Color.

Se toma un tubo de ensayo bien limpio y seco y se llena hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo y se observa el color, la transparencia, la presencia de partículas y si existe la separación de capas. Se anota los resultados.

2.4.4.3 Olor.

Se toma un tira de papel secante aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de largo y se introduce un extremo en la muestra de ensayo. Se huele y se determina si corresponde con la característica del producto.

2.4.4.4 Determinación del pH

Se ajustó el equipo con la solución reguladora de pH adecuada al rango que se realizó la determinación. Posteriormente se determinó el valor del pH de la muestra. Los resultados dieron apreciando hasta la decima.

2.4.4.5 Densidad Relativa.

Primeramente se pesó el picnómetro vacío y seco a 25 °C y se llenó con la porción de ensayo, se mantuvo a temperatura de 25 °C (+/- 1 °C) durante 15 min. Y se ajustó el líquido al nivel empleado, con una tira de papel se extrajo el exceso y secó exteriormente el picnómetro.

Se pesó cuidadosamente el picnómetro con la porción de ensayo y se repitió la operación con el agua destilada a 25 °C, y después se limpió el picnómetro.

Es el coeficiente del peso de un volumen determinado para el volumen g/mL o Kg/L.

2.4.4.6 Determinación del Índice de Refracción.

Se colocó sobre el prisma de medición un gota de agua destilada, utilizando para ello una varilla de vidrio que no tenga cantos agudos, se ajustó el equipo seleccionando la zona del espectro visible que aparecen en la línea límite del campo visual, moviendo el compensador cromático y colocando la intersección del retículo sobre la línea límite de los campos claros y oscuros.

Después se realizó el ajuste del refractómetro. Se coloca una gota de la muestra de ensayo sobre el prisma de medición, se cierra el termoprisma y se enfocó hacia la luz por medio del espejo, de modo tal que la misma indicó la temperatura de entrada del prisma de medición y se procedió de igual manera que el agua.

2.5 BIOENSAYO

A cada uno de los niños de la Comunidad de Sanjapamba se les realizara un examen para determinar si se trata de la presencia de el hongo *Malassezia furfur*.

2.5.1 EXAMEN DIRECTO O IDENTIFICACIÓN



FOTOGRAFÍA N. 8-9 RASPADO DE PIEL PARA EL EXAMEN DE KOH Y HONGO VISTO EN EL MICROSCOPIO LENTE DE 10X EXAMEN DE KOH

FUENTE: MAYRA SILVERS

2.5.1.1 HIDRÓXIDO DE POTASIO (KOH AL 10%)

Disuelve rápidamente las células permitiendo digerir material proteico, observando con mayor nitidez los elementos fúngicos, su efecto de clarificar puede incrementarse al calentar a la llama ligeramente la preparación. (84)

Adicionalmente, se puede emplear colorante para pigmentar la pared de los hongos y mejorar la visualización. La observación de hifas, permite sugerir la presencia de invasión micótica. (84)

2.5.2 IDENTIFICACION DEL HONGO *Malassezia furfur*



FOTOGRAFÍA N. 10 CRECIMIENTO DE LA *Malassezia furfur* EN EL AGAR.
FUENTE: MAYRA SILVERS

2.5.2.1 CONSIDERACIONES GENERALES

Las levaduras de *Malassezia furfur* por ser lipofílicas, se desarrollan en medios de cultivo que contengan en su composición aceites naturales u otras sustancias grasas, siendo el método más común el cultivo en ASD que contiene cicloheximide o actidione y aceite de oliva, sin embargo existen medios de cultivo alternativos como el agar de Dixon que en su formulación incluye al glicerol mono – oleato que estimula el crecimiento *in vitro* de la levadura. La identificación se basa en comparar características morfológicas y fisiológicas. (84)

2.5.2.2 IDENTIFICACIÓN DE *MALASSEZIA FURFUR*.

- a) Morfología de las colonias: Se caracterizan por ser redondas de consistencia cremosa y de color blanco amarillento.
- b) Examen microscópico: Se observa células globosas, elipsoidales a cilíndricas que se reproducen por gemación.

2.5.2.3 PRUEBA DE LA CATALASA

Consiste en determinar la presencia de la enzima catalasa.

Colocar una gota de peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) 10 vol. en una lámina portaobjeto y agregar una suspensión de la levadura.(84)

Positivo: presencia de burbujas.

Negativo: ausencia de burbujas.



FOTOGRAFÍA N. 11 PRUEBA POSITIVA PARA LA IDENTIFICACION DE LA *Malassezia furfur*.
FUENTE: MAYRA SILVERS

2.5.2.4 ASIMILACIÓN DEL *TWEEN* 20, 40, 60 Y 80.



FOTOGRAFÍA N. 12 PRUEBA POSITIVA PARA LA ASIMILACION DE TWEEN.
FUENTE: MAYRA SILVERS

Preparar soluciones de 0,1; 0,5; 1; 5 y 10% de *Tween*20, 40, 60 y 80 en agar peptona glucosa (1 y 2%) e incubar a 32 °C por siete días. El inóculo se prepara a una suspensión de 107 mL⁻¹ en agua destilada estéril.

2.5.2.5 DESARROLLO A DIFERENTES TEMPERATURAS.

Se siembra la cepa en el agar de Dixón y se incuba a 32, 37 y 40 °C durante siete día (84)

2.6 ELABORACIÓN DEL GEL CON TOCTE, HIGO DULCAMARA Y SALVIA

Formulación para 1 litro del gel

Procedimiento de la Elaboración del Gel con Extractos en Mezcla:

- En un recipiente, colocar 500 mL de agua destilada hervida por 15 min enfriada añadir los 10 g de Carbopol y proceder a mezclar con varillas de agitación hasta que la mezcla quede homogénea y gelificada.
- Luego añadir 70 mL del antiséptico (alcohol etílico) y con una paleta de madera mezclar hasta que quede bien diluido.
- Después se le añade 15 ml de humectante suavizante y el aroma se le mezcla bien hasta obtener homogeneidad.
- En una probeta ir añadiendo la mezcla de los extractos de Tocte, Higo, Dulcamara y el Aceite de Salvia en proporción de 1.5 mL de cada sustancia.
- Esta mezcla adjuntar a la preparación anterior y mezclar muy bien hasta q no presente grumos.
- Finalmente a la mezcla añadir el TEA que es el espesante y mezclar muy bien por unos minutos hasta que la preparación tenga la consistencia de un gel.

2.7 CONTROL DE CALIDAD DEL GEL

Se inicia la evaluación analizando sus propiedades organolépticas y físicas del gel de Tocte, Higo, Dulcamara y Salvia como producto final.

PARÁMETRO	MÉTODO	RESULTADO
COLOR	Visual	Pardo
OLOR	Olfato	Aromático
ASPECTO	Visual	Homogéneo
pH	Potenciómetro	7.54

Determinación de untuosidad al tacto

Se aplica una pequeña cantidad de gel en el dorso de la mano y determinar si existe presencia o ausencia de grumos.

Determinación de extensibilidad

Se aplica 2g de gel en el centro de una placa de vidrio, poner encima otra placa.

Colocar una masa de 2 kg sobre estas placas durante 3 minutos. Seguidamente se mide 8 radios y se calcula el promedio

Finalmente se halla el área de extensibilidad usando la formula $A = \pi * r^2$.

Determinación de la viscosidad

Se aplica una pequeña cantidad de gel en un viscosímetro y se procede a la medición.

2.8 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DE COSMÉTICOS METODO BAM

PREPARACION DE LA UNIDAD DE MUESTRA COSMÉTICA PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Desinfectar la superficie del envase de la muestra con la mezcla acuosa de etanol al 70% (v/v) y HCl al 1% (v/v) u otro desinfectante antes de la apertura y la toma de muestra. Use campana de flujo laminar, si es posible. Seque la superficie del envase con un gasa estéril antes de la apertura. Tomar una muestra representativa para el análisis microbiológico, por ejemplo, 1 g (ml) de la muestra.

Para productos que pesen menos de 1 g (ml), analizar todo el contenido.

Si sólo hay una unidad de muestra para diversos análisis, (tales como microbiológico, toxicológico y químico), primero tomar la submuestra para el análisis microbiológico, antes que para los otros análisis. En esta situación, la cantidad de submuestra utilizada para el análisis microbiológico dependerá del número de análisis a realizarse en la muestra. Por ejemplo, si el contenido total de la muestra es de 5 ml, usar de 1 o 2 ml para los análisis microbiológicos.

2.8.1 PROCEDIMIENTO

La cantidad de muestra y el volumen de diluyente se ajusta de acuerdo a la cantidad de muestra disponible. Para incrementar la representatividad de la muestra a usar se tomar varias sub-muestras aleatoriamente y mezclarlas, de aquí tomar la muestra representativa para el análisis. Los analistas deben usar su mejor juicio para determinar cuándo y la cantidad de muestra a ser combinada previo a su análisis.

1. **Líquidos.** Colocar 1 ml de muestra en 9 ml de caldo modificado Letheen (MLB), en un tubo de ensayo de 20x150 mm, para obtener la dilución 10^{-1} .
2. **Sólidos y en polvo.** Asépticamente pesar 1 g de muestra en un tubo de ensayo de 20x150 mm, que contiene 1 ml de Tween 80 estéril. Mezclar la muestra con

el Tween 80 usando una espátula estéril. Añadir 8 ml de MLB estéril y mezclar bien. Estará la dilución 10^{-1} .

3. **Crema y productos a base de aceite.** Asépticamente pesar 1 g de muestra en un tubo de ensayo de 20x150 mm que contiene 1 ml de Tween 80 estéril, más cinco-siete perlas de vidrio de 5 mm de diámetro (o diez-quince perlas de vidrio de 3 mm). Mezclar el contenido total con mezclador Vortex o por agitación manual. Ajustar el volumen total de 10 ml con MLB estéril (8 ml) para la dilución 10^{-1} .
4. **Polvos, jabones líquidos y otros materiales en aerosol.** Descontaminar la boquilla de la lata de aerosol tanto como sea posible con una gasa humedecida con etanol al 70% (v/v). Presionar la boquilla para eliminar una porción inicial de muestra y luego rociar la cantidad apropiada de muestra en un envase estéril tarado, por ejemplo, 1 g de muestra en 9 ml de MLB estéril. Mezclar bien la muestra y el caldo, y pesarlo de nuevo. Estará la dilución de 10^{-1} si se obtuvo exactamente 1 g de la muestra.
5. **Materiales anhidro.** Seguir el procedimiento (n) numeral 2 o 3, según corresponda.

2.8.2 ANALISIS MICROBIOLÓGICO

Notodos los análisis se describen a continuación necesariamente se llevarán a cabo, sin embargo, el recuento de microorganismos aerobios mesófilos, enriquecimiento del cultivo y el recuento de hongos se debe realizar de forma rutinaria.

2.8.3 RECUENTO DE AERÓBIOS EN PLACA DE SIEMBRA POR EXTENSIÓN EN SUPERFICIE.

Preparar y etiquetar por duplicado placas Petri que contienen agar modificado Lethen (MLA) para la siembra de las diluciones de la muestra desde 10^{-1} a 10^{-6} .

2.8.4 RECUENTO DE STAPHYLOCOCCUS SPP EN PLACA DE SIEMBRA POR EXTENSIÓN EN SUPERFICIE.

Preparar y etiquetar por duplicado placas Petri que contienen agar BP o Agar Vogel-Johnson (VJ) para la siembra de las diluciones de la muestra desde 10^{-1} a 10^{-6} , si se sospecha la presencia de Staphylococcus spp.

2.8.5 PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES EN BASE 10.

Añadir 5 ó 10 ml de la preparación de cosméticos (véase n, arriba) a 45 o 90 ml, respectivamente, de MLB estéril, de esta manera se obtiene la dilución 10^{-2} .

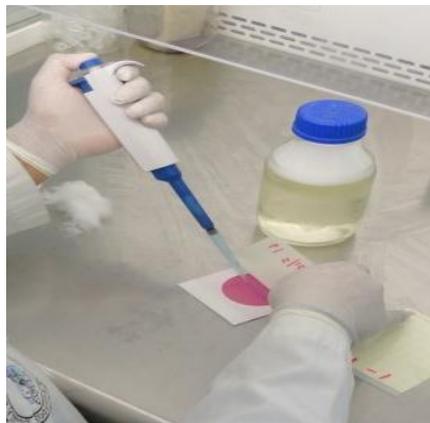
Diluir las muestras en forma decimal en MLB estéril (NOTA: conservar las diluciones para el paso de enriquecimiento), para obtener la serie completa de dilución de 10^{-1} a 10^{-6} (Comience con 10^{-2} si toda la dilución 10^{-1} se agota.)

2.8.6 SIEMBRA

Mezclar bien las diluciones y colocar 0,1 ml de cada dilución en las superficies de las placas previamente preparadas con los medios indicados. Sembrar por duplicado. Se propaga el inóculo sobre toda la superficie usando una convarilla de vidrio doblada, que se esteriliza por primera vez por la inmersión en etanol al 95% y flameado rápido para eliminar el etanol. Dejar que el medio absorba el inóculo antes de invertir e incubar las placas durante 48 horas a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ (35°C para las placas BP). Use un esparcidor nuevo para cada dilución (en diluciones bajas), ya que algunos residuos del producto pueden llevar a más y afectar negativamente el procedimiento de esterilización en la llama. Para una efectiva absorción del inóculo, asegúrese que la superficie del agar esté seca (30 min a 35°C) cuando el agar esté recién hecho.

2.8.7 RECUENTO

Contar todas las colonias en las placas que contienen de 25 a 250 colonias, y registre los resultados de cada dilución dentro del rango indicado. Obtenga un promedio de los recuentos obtenidos por duplicado, y multiplique este promedio por 10 y luego por el factor de dilución correspondiente ($10^{-1} - 10^{-6}$).



FOTOGRAFÍA N. 13 ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO DEL GEL (AEROBIOS MESÓFILOS, COLIFORMES T. Y E. COLI).
FUENTE: MAYRA SILVERS

2.9 ESTABILIDAD DEL GEL POR MEDIO DE TERMORESISTENCIA.

Se aplica una muestra de 10 g de gel se deja por 12 horas o más a una temperatura de 37 °C, no se debe evidenciar ningún cambio químico o físico.

2.10 METODOLOGÍA

2.10.1 FASE DE CAMPO

La recolección del material vegetal se lo hizo en el Mercado Mayorista San Pedro de Riobamba y de los jardines de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo se recolectó las hojas y corteza de los vegetales respectivamente de cada vegetal.

Los mismos que fueron etiquetados y se trasladados al Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Ciencias.

Previamente se ya estaba definido el grupo de niños de la Comunidad Sanjapamba en los que se realizara el estudio clínico.

2.10.2 FASE DE LABORATORIO

En el laboratorio se realizó el siguiente procedimiento para la determinar la actividad antifúngica del gel.

- Ensayo de la actividad antifúngica.
- Determinación de la actividad antifúngica con la aplicación del gel directamente en la piel de los niños que presentan *Malassezia furfur*.

Además se realizo un tratamiento estadístico de los datos:

- Análisis de Varianza
- Separación de medias utilizando la prueba de Tukey al 5%.
- Coeficiente de variación.

2.10.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA.

- Una vez ya elaborado el gel con la Tocte (*Junglans regia*), Higo (*Ficus carica*), Dulcamara (*Solanum dulcamara*) y Salvia(*Salvia officinalis*), para lo cual procedemos a realizar pruebas in vivo en los niños de la Comunidad Sanjapamba, para comprobar su actividad antifúngica.
- Luego el gel elaborado con la mezcla de los vegetales, de igual forma se procedió a realizar pruebas in vivo en los niños con dos dosificaciones cada 24 horas y cada 48 horas para comprobar la actividad antifúngica a diferentes dosis.
- Se registra el número de manchas con su respectivo tamaño, color y forma, mediante la observación directa en la piel del rostro de cada niño antes de la siguiente aplicación, de la misma manera comparando con un control (Neonystasolona) en las mismas dosis.

2.11 TIPO DE DISEÑO EXPERIMENTAL.

Se realizó 2 tratamientos del gel y un control (Neonistasolona) con una dosificación cada 24 horas determinando en 24 niños para el gel y 6 niños para el control.

De la misma forma 2 tratamientos del gel y control (Neonistasolona) cada 48 horas respectivamente 24 niños para el gel y 6 niños para el control; para la determinación de la actividad antifúngica en la piel de los niños que presentan *Malassezia furfur* y además se efectuó una prueba con un control con una crema antimicótica (Neo-nystasolona)

CUADRO N. 6 TRATAMIENTOS DEL GEL CON Tocte (*Junglans regia*), Higo (*Ficus carica*), Dulcamara (*Solanum dulcamara*) y Salvia (*Salvia officinalis*) y CONTROL (Neo-nystasolona)

TRATAMIENTOS

PRUEBA CONTROL

APLICACIÓN DEL GEL CADA 24 HORAS

PACIENTES	REDUCCION DEL TAMAÑO DE LA MANCHA
1	AB ₁ CR ₁
2	AB ₁ CR ₂
3	AB ₁ CR ₃
4	AB ₁ CR ₄
5	AB ₁ CR ₅
6	AB ₁ CR ₆
7	AB ₁ CR ₇
8	AB ₁ CR ₈
9	AB ₁ CR ₉
10	AB ₁ CR ₁₀
11	AB ₁ CR ₁₁
12	AB ₁ CR ₁₂
13	AB ₁ CR ₁₃
14	AB ₁ CR ₁₄
15	AB ₁ CR ₁₅
16	AB ₁ CR ₁₆
17	AB ₁ CR ₁₇
18	AB ₁ CR ₁₈
19	AB ₁ CR ₁₉
20	AB ₁ CR ₂₀
21	AB ₁ CR ₂₁
22	AB ₁ CR ₂₂
23	AB ₁ CR ₂₃
24	AB ₁ CR ₂₄

APLICACIÓN DEL CONTROL CADA 24 HORAS

PACIENTES	REDUCCION DEL TAMAÑO DE LA MANCHA
1	B ₁ R ₁
2	B ₁ R ₂
3	B ₁ R ₃
4	B ₁ R ₄
5	B ₁ R ₅
6	B ₁ R ₆

PRUEBA CONTROL**TRATAMIENTOS****APLICACIÓN DEL CONTROL
CADA 48 HORAS**

PACIENTES	REDUCCION DEL TAMAÑO DE MANCHA
1	B ₂ R ₁
2	B ₂ R ₂
3	B ₂ R ₃
4	B ₂ R ₄
5	B ₂ R ₅
6	B ₂ R ₆

**APLICACIÓN DEL GEL CADA 48
HORAS**

PACIENTES	REDUCCION DEL TAMAÑO DE MANCHA
1	AB ₁ CR ₁
2	AB ₁ CR ₂
3	AB ₁ CR ₃
4	AB ₁ CR ₄
5	AB ₁ CR ₅
6	AB ₁ CR ₆
7	AB ₁ CR ₇
8	AB ₁ CR ₈
9	AB ₁ CR ₉
10	AB ₁ CR ₁₀
11	AB ₁ CR ₁₁
12	AB ₁ CR ₁₂
13	AB ₁ CR ₁₃
14	AB ₁ CR ₁₄
15	AB ₁ CR ₁₅
16	AB ₁ CR ₁₆
17	AB ₁ CR ₁₇
18	AB ₁ CR ₁₈
19	AB ₁ CR ₁₉
20	AB ₁ CR ₂₀
21	AB ₁ CR ₂₁
22	AB ₁ CR ₂₂
23	AB ₁ CR ₂₃
24	AB ₁ CR ₂₄

NOMENCLATURA

A= Hongo + o – (forma, diámetro)

B₁= Aplicación cada 24 horas

B₂= Aplicación cada 48 horas

R= Repetición

C= Características del hongo (reducción del tamaño del hongo)

Nota: Se realizaran prueba de control en cada tratamiento y de igual manera con 6 repeticiones respectivamente para cada dosis de 24 y 48 horas.

2.12 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

2.12.1 DISEÑO COMPLETO AL AZAR

Este diseño consiste en la asignación de los tratamientos en forma completamente aleatoria a las unidades experimentales (individuos, grupos, etc.) Debido a su aleatorización irrestricta, es conveniente que se utilicen unidades experimentales de lo más homogéneas posibles: individuos de la misma edad, similar estado fisiológico; etc., de manera de disminuir la magnitud del error experimental, ocasionado por la variación intrínseca de las unidades experimentales. Este diseño es apropiado para experimentos de laboratorio, animales de bioterio, aves, conejos, cerdos, etc., es decir, situaciones experimentales como de las condiciones ambientales que rodean el experimento. Los datos fueron tabulados y se determinaron las medias de las distintas lecturas para realizar el análisis de varianza, separación de medias y coeficiente de variación.(50)

2.12.2 TEST DE ANOVA.

Es el más simple de todos los diseños ya que se puede comparar cualquier número de tratamientos que se aplican a las unidades experimentales al azar con cualquier número de repeticiones es posible, mejor estimación del error experimental que otro diseño.

Procedimiento estadístico que sirve para medir la variación total de las observaciones a la que se divide para sus componentes quedando el residuo como error experimental. (12)

2.12.2.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

Identificar la variable respuesta
 Identificar el factor de interés
 Identificar las unidades experimentales
 Identificar el modelo

Variable respuesta: Porcentaje de efectividad del tratamiento

Factor de interés: Tratamiento

Unidades experimentales: niños

Modelo: $Y_{ij} = \mu + \alpha_i + e_{ij}$

μ : es la media global, asociada con un parámetro desconocido

α_i : efecto debido al tratamiento utilizado

e_{ij} : error asociado a la observación Y_{ij}

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu$$

$$H_1: \mu_i \neq \mu_j \text{ para } i \neq j$$

TABLA DE ANOVA				
FUENTE DE VARIACIÓN	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	CUADRADO MEDIO	PRUEBA F
TRATAMIENTO	$SC_{TRAT} = \sum_{i=1}^k \frac{(Y_{i.})^2}{n_i} - \frac{(Y_{..})^2}{N}$	$k - 1$	$SC_T = \sum_{i=1}^k \frac{(Y_{i.})^2}{n_i} - \frac{(Y_{..})^2}{N}$ /k-1	$\frac{SC_T}{SC_E}$
ERROR	$SC_E = SC_T - SC_{TRAT}$	$N - k$	$SC_E = (SC_T - SC_{TRAT})/N - k$	
TOTAL	$SC_T = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_i} (Y_{ij})^2 - \frac{(Y_{..})^2}{N}$	$N - 1$		

n : número de observaciones por tratamiento

k : número de tratamientos

N : número total de observaciones en el diseño

Y_{ij} : observación j – ésima del tratamiento i – ésimo

Y_i : suma de las observaciones en el tratamiento i

\bar{Y}_i : promedio de las observaciones en el tratamiento i

$Y_{..}$: suma de todas las observaciones

$\bar{Y}_{..}$: promedio de todas las observaciones (12)

2.12.2 ANÁLISIS DE VARIANZA

Es el procedimiento estadístico que nos sirve para medir la variación total de las observaciones, la que se divide para sus componentes, quedando el residuo como error experimental. Este análisis nos indica la relación entre una variable dependiente (actividad antifúngica, cambios en la presentación de la mancha) y los factores independientes (concentraciones y tiempos de aplicación del gel con mezcla de Tocte, Higo, Dulcamara y Salvia).

El análisis de varianza es un método en el que se puede comparar dos o más medias de las observaciones o de los tratamientos, además nos permite medir la variación de las respuestas numéricas como valores de evaluación de diferentes variables nominales. (50)

2.12.3 PRUEBA DE SEPARACIÓN DE MEDIAS PRUEBA DE TUKEY AL 5%

La prueba de Tukey es el procedimiento empleado para determinar las diferencias que existen entre las medias de los tratamientos realizados. (50) (12)

$$T_{\alpha} = q_{\alpha}(k, N - k)S_{\bar{Y}_i}$$

Donde

$$S_{\bar{Y}_i} = \sqrt{\frac{1}{d} * CME\left(\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_i'}\right)}$$

n # de observaciones por tratamiento ; $n_i \neq n_i'$

d # de observaciones diferentes por tratamiento

N-k grados de libertad del error

α Nivel de significancia

$q_{\alpha}(k, N - k)S_{\bar{Y}_i}$ son los puntos porcentuales de la distribución de rango estudentizada.

Se declaran significativamente diferentes los pares de medias cuya diferencia muestral en valor absoluto sea mayor que T_{α}

Rechazar H_0 : si $|\bar{Y}_i - \bar{Y}_j| > T_{\alpha}$

Aceptar H_0 : de otra manera

2.12.4 COEFICIENTE DE VARIACIÓN

Este método indica el nivel de confianza que se puede tener en los datos, un valor bajo indica que el ensayo ha sido bien realizado, planificado ya que ha tenido un buen manejo, en tanto que un valor alto puede ser indicador en ciertos casos de lo contrario con respecto al nivel de confianza. (50) (12)

CAPÍTULO III

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se resumen los resultados obtenidos en un cuadro de datos y valores, para luego discutir los mismos.

CUADRO N. 7 RESULTADOS DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y BIBLIOGRÁFICAS DE LAS MACERACIONES DE LA CORTEZA DEL TOCTE.

PARAMETRO	MÉTODO	RESULTADO
		TOCTE
ASPECTO	Visual.	Líquido de color café oscuro, inoloro.
pH	Potenciómetro.	4,68
DENSIDAD g/ml	Picnometría.	0,977
ÍNDICE DE REFRACCIÓN	Refractómetro de ABBYE.	1,346
TAMIZAJE FITOQUÍMICO	Olga Locck de UgazSolis.	Cloruro férrico (+) Gelatina-NaCl (+) BornTräger (-) Shinoda (+) Espuma (-) Rosentaler (-) Dragendorff (+)
COMPOSICIÓN QUÍMICA	Bibliografía	Juglona, AcidoGálico, Acido Cafeico, Carotenos, Taninos, Vitamina C.
USO TRADICIONAL	Bibliografía	Afecciones Antibacterianas, Antifungicas, Antisépticas, Astringentes, Antidiarreicos, Cicatrizantes.

CUADRO N. 8 RESULTADOS DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y BIBLIOGRÁFICAS DE LAS MACERACIONES DEL HIGO.

PARAMETRO	MÉTODO	RESULTADO
		HIGO
ASPECTO	Visual.	Líquido de color café oscuro, olor característico.
pH	Potenciómetro.	6,28
DENSIDAD g/ml	Picnometría.	0,825
ÍNDICE DE REFRACCIÓN	Refractómetro de ABBYE.	1,409
TAMIZAJE FITOQUÍMICO	Olga Locck de UgazSolis.	Cloruro férrico (+) Acidotricloroacético (+) Lieberman Buchard (+) Born Träger (-) Shinoda (+) Carr-Price (+) Dragendorff (+)
COMPOSICIÓN QUÍMICA	Bibliografía	Psoraleno, Furano cumarinas, Azucres, Acido cítrico, Fisina, Vitaminas: A, B,C y D
USO TRADICIONAL	Bibliografía	Antimicótica, Elimina verrugas, Antiinflamatorias, Afecciones digestivas

CUADRO N. 9 RESULTADOS DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y BIBLIOGRÁFICAS DE LAS MACERACIONES DE LAS CAPSULAS DE DULCAMARA.

PARAMETRO	MÉTODO	RESULTADO
		DULCAMARA
ASPECTO	Visual.	Líquido de color café oscuro, olor astringente.
pH	Potenciómetro.	5,28
DENSIDAD g/ml	Picnometría.	1,049
ÍNDICE DE REFRACCIÓN	Refractómetro de ABBE.	1,355
TAMIZAJE FITOQUÍMICO	Olga Locck de UgazSolis.	Cloruro férrico (+) Baljet (-) Gelatina-NaCl (+) Shinoda (-) Espuma (-) Rosentaler (+) Dragendorff (+) SbCl ₃ / HClO ₄ (+)
COMPOSICIÓN QUÍMICA	Bibliografía	Acido Dulcamárico, Acido dulcamaretico, Solanina, Solamarina.
USO TRADICIONAL	Bibliografía	Espasmos, Tos, Asma, Poder sedante, Afecciones de la piel, Alergias. Reducir tumores: estomacales, Tratamientos de colon.

CUADRO N. 10 RESULTADOS DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS, QUÍMICAS Y BIBLIOGRÁFICAS DEL ACEITE ESENCIAL DE SALVIA.

PARAMETRO	MÉTODO	RESULTADO
		SALVIA
ASPECTO	Visual.	Líquido de color amarillo pálido, olor característico.
DENSIDAD g/ml	Picnometría.	1.056
ÍNDICE DE REFRACCIÓN	Refractómetro de ABBYE.	1.525
TAMIZAJE FITOQUÍMICO	Olga Locck de UgazSolis.	Cloruro férrico (+) Gelatina-NaCl (+) BornTräger (-) Shinoda (+) Espuma (-) Rosentaler (-) Dragendorff (-)
COMPOSICIÓN QUÍMICA	Bibliografía	Flavonoides, Glucósidos, Ácidos fenólicos, Taninos, Catequinos,
USO TRADICIONAL	Bibliografía	Antiespasmódico, Astringente, Tónico, Carminativo, Reducción de la transpiración, Dolor de estomago.

Por medio del análisis de resultados de cada cuadro se indica las propiedades organolépticas, físicas, químicas y bibliográficas determinadas en el Tocte, Higo, Dulcamara y Salvia:

El aspecto en el Tocte presenta un color café oscuro, con ausencia de olor, un pH de 4,68 próximo a la basicidad, la densidad de 0,977 g/mL siendo por lo tanto menos denso con respecto al agua, un índice de refracción igual a 1,346, mientras que en el Tamizaje fitoquímico dio la presencia de compuestos, fenoles, flavonoides, que están presentes en las hojas y corteza en su composición química propia del vegetal como Juglona, Acido Gálico, Acido Cafeico, Carotenos, Taninos, Vitamina C.

El Higo presenta un color café, olor característico, su pH de 6,28 de que significa próximo a la alcalinidad, una densidad menor al agua de 0,825g/mL y el índice de refracción de 1,409, en el Tamizaje fitoquímico dio positivo la presencia de alcaloides, compuestos fenoles, flavonoides y triterpenoides y en su composición química se destaca la presencia de Psoraleno, Furano cumarinas, Azucres, Acido cítrico, Fisina, que poseen propiedades tiene actividad antimicótica, elimina verrugas y antiinflamatorias.

La Dulcamara presenta un color café oscuro y un olor astringente y amargo es por es utilizada en afecciones de la piel, con un pH de 5,28 ya próximo a la alcalinidad, la densidad 1,049 g/mL superior a la densidad del agua y su índice de refracción de 1,355, en el Tamizaje fitoquímico dio la presencia de compuestos tales como fenoles, flavonoides, alcaloides y sapogenina; ya que en la composición química del vegetal esta el Acido Dulcamárico, Acido dulcamaretico, Solanina, Solamarina.

El Aceite de Salvia presenta un color amarillo pálido y un olor característico del vegetal es por es utilizado como tónico, astringente de la piel, con una densidad 1.056g/mL superior a la densidad del agua y su índice de refracción de 1.525, en el Tamizaje fitoquímico dio la presencia de compuestos tales como fenoles, flavonoides, alcaloides y glucósidos; ya que en la composición química del vegetal esta la tujona, luteol, ácidos oxálicos, málico y acido rosmarinico.

3.1 CONTROL DE CALIDAD DEL GEL.

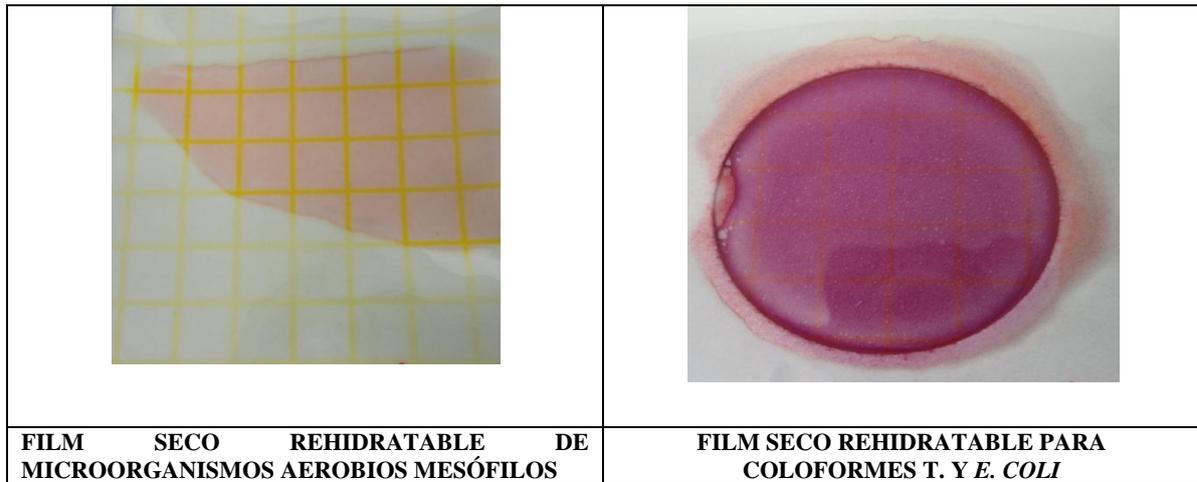
CUADRO N. 11 RESULTADOS DEL ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO, FÍSICO Y MICROBIOLÓGICO DEL GEL CON TOCTE, HIGO, DULCAMARA Y SALVIA.

PARÁMETRO	METODO	RESULTADOS
		GEL
ASPECTO	Visual	Pardo, homogéneo, olor aromático, gelatinoso
pH	Potenciómetro. Valor Referencia (5,0 – 7,5)	7,54
VISCOSIDAD	Viscosímetro.	180332 cp
DETERMINACION DE MICOORGANISMOS AERÓBIOS MESÓFILOS UFC/G	Método AOAC (990.12 Recuento de aerobios, film seco rehidratable) 35±1 °C/ 48±2h	< 1
DETERMINACION DE MICOORGANISMOS COLIFORMES TOTALES Y <i>E. COLI</i> . UFC/G	Método AOAC (991.14 Recuento de coliformes y <i>Escherichia coli</i> , film seco rehidratable) 35±1 °C/ 48±2h	< 1
DETERMINACION DE LEVADURAS Y HONGOS UFC/G	Método AOAC (997.02 Recuento de levaduras y mohos, film seco rehidratable) 20-25±1 °C/ 5 días	< 1

Es indispensable indicar que los parámetros color, olor textura y viscosidad de calidad no poseen estándares de referencia con los que se puedan comparar, por lo que tienen sus propias características.

El gel con extracto de Tocte, Higo, Dulcamara y Salvia presenta un color pardo, homogéneo, un olor característico agradable y su textura gelatinosa, con un pH de 7,54 que está dentro de las especificaciones y una viscosidad de 180332cp característica de un gel.

El control de calidad microbiológico se lo realizó con una muestra de gel con la mezcla de extractos en el que nos dio como resultado la ausencia de microorganismos por lo que los mismos se encuentran dentro de los rangos microbiológicos < 1 UFC/g tanto para Microorganismos Aerobios Mesófilos, Microorganismos Coliformes Totales y *E coli* y Levaduras y hongos.



FOTOGRAFÍA N. 14 RESULTADOS MICROBIOLÓGICOS DEL GEL (AEROBIOSES MESÓFILOS COLIFORMES T. Y E. COLI).

FUENTE: MAYRA SILVERS

3.2 BIOENSAYO

3.2.1 EXAMEN DIRECTO PRUEBA DE KOH



FOTOGRAFÍA N. 15 REALIZACIÓN DE RASPADO DE PIEL PARA EL EXAMEN DE KOH.

FUENTE: MAYRA SILVERS

En la realización de este procedimiento en todos los niños que se realizó la prueba dio POSITIVO en la prueba de KOH lo que nos dio la pauta para realizar el tratamiento porque si se trataba de hongos en la piel. Lo cual nos brindó información preliminar o presuntiva al ser una técnica rápida en un estudio clínico y en nuestro caso fue diagnóstica.

3.2.1.1 HIDRÓXIDO DE POTASIO (KOH AL 10%)



FOTOGRAFÍA N. 16 DIVERSAS FORMAS DEL HONGO VISTO EN EL MICROSCOPIO LENTE DE 10X EXAMEN DE KOH.

FUENTE: MAYRA SILVERS

Mediante estas fotografías nos permite observar con mayor nitidez los elementos fúngicos. Al observar las hifas, nos permite sugerir la presencia de invasión micótica en el rostro de los niños de la Comunidad Sanjapamba.

3.2.2 IDENTIFICACION DEL HONGO *Malassezia furfur*



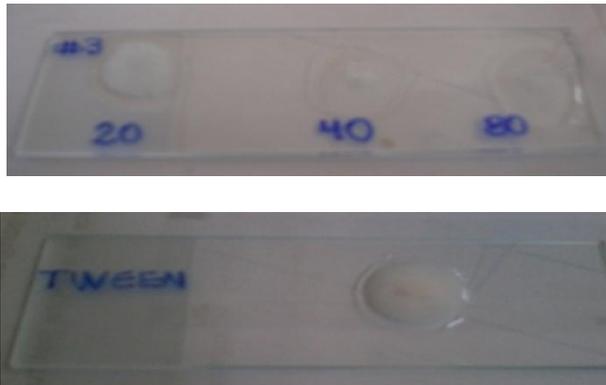
FOTOGRAFÍA N. 17 CRECIMIENTO DE LA *Malassezia furfur* EN EL TWEEN 20, 40, 80

FUENTE: MAYRA SILVERS

Al realizar esta identificación del hongo *Malassezia furfur* se determina claramente como la morfología de sus colonias son redondas de consistencia cremosa y de color blanco amarillento. Al ser observadas al microscopio se ven como células globosas, elipsoidales a cilíndricas.

3.2.2.1 PRUEBA DE LA CATALASA

En esta prueba se determino que era Positivo ya que existe presencia de burbujas.



FOTOGRAFÍA N. 18 PRUEBA DE CATALASA POSITIVA EN TWEEN 20, 40,60 PARA LA IDENTIFICACION DE LA *Malassezia furfur*.

FUENTE: MAYRA SILVERS

3.2.3 DESARROLLO A DIFERENTES TEMPERATURAS DEL AGAR DIXON 32, 37 Y 40°C.



FOTOGRAFÍA N. 19 PRUEBA POSITIVA PARA EL CRECIMIENTO DEL HONGO A DIFERENTES TEMPERATURAS.

FUENTE: MAYRA SILVERS

Al sembrar la cepa en el agar de Dixón y al ser incubadas a 32, 37 y 40 °C durante siete días se determina que si existe crecimiento del hongo determinando y confirmando que si se trata del hongo *Malassezia furfur*.

3.3 ESTABILIDAD DEL GEL POR MEDIO DE TERMORESISTENCIA.

CUADRO N. 12 RESULTADO DE LA ESTABILIDAD DEL GEL A CONDICIONES DE TEMPERATURA DE 37° C ± 2 POR 12 HORAS EN LA ESTUFA. RIOBAMBA. ENERO 2012.

PARÁMETROS	MÉTODO	RESULTADO		
		Tiempo inicial. 2012-01-11	Alas 6 horas. 2012-01-11	Alas 12 horas. 2012-01-12
Olor	Organoléptico	Característico	Característico	Característico
Color	Visual	Pardohomogéneo	Pardo homogéneo	Pardo homogéneo
Aspecto	Visual	viscoso	viscoso	viscoso
Volumen de llenado	Capsula	10 g	6 g	3 g

FUENTE: REGISTRO OFICIAL N° 385 DE PRODUCTOS NATURALES 26 OCTUBRE DEL 2006.



FOTOGRAFÍA N. 20 RESULTADOS DE ESTABILIDAD DEL GEL POR TERMORESISTENCIA.

FUENTE: MAYRA SILVERS

En el Cuadro N.12 se detallan los resultados de la estabilidad del gel por medio de Termoresistencia con extractos de Tocte, Higo, Dulcamara y Salvia con actividad antifúngica realizados por 12 horas a 37° C ± 2 en la estufa, siendo este la forma acelerada de ver el tiempo de vida útil del gel.

Se pudo evidenciar que el gel durante este tiempo no sufre ningún cambio ni se ve alterado en sus propiedades como el color pardo homogéneo, el olor característico propio de los vegetales, aspecto viscoso característico de todo gel volumen de llenado inicial de la prueba de 10g y finalizó a las 12 horas con 3g,

3.4 RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL GEL CON EXTRACTOS DE TOCTE, HIGO, DULCAMARA Y SALVIA EN NIÑOS DE LA COMUNIDAD SANJAPAMBA CON *Malassezia furfur*.

Para determinar la actividad antifúngica se procedió a aplicar el gel en los niños de la Comunidad con *Malassezia furfur* en dos dosis cada 24 horas y cada 48 horas así mismo como el control con una crema antimicótica (Neo-nystasolona) y se evaluó la mortalidad.

CUADRO N. 13 RESULTADO EN PORCENTAJES DE LA REDUCCION DE LAS MANCHAS CON EL GEL CON TOCTE, HIGO, DULCAMARA Y SALVIA Y EL CONTROL EN LOS NIÑOS CON *Malassezia furfur* EN GRUPOS DE 24 NIÑOS CADA 24 HORAS Y 48 HORAS RESPECTIVAMENTE Y 6 NIÑOS DE CONTROL EN DOSIS CADA 24 Y 48 HORAS RIOBAMBA ENERO DEL 2012,

	Tratamiento	Gel24	Control24	Gel48	Control48
Observaciones	1	92,31	94,50	96,92	89,66
	2	86,76	100,00	100,00	100,00
	3	100,00	90,91	98,15	74,26
	4	100,00	100,00	100,00	95,00
	5	97,00	87,79	86,42	91,61
	6	100,00	97,71	100,00	100,00
	7	98,00		95,45	
	8	100,00		95,65	
	9	100,00		90,11	
	10	95,29		95,83	
	11	100,00		92,31	
	12	95,16		100,00	
	13	100,00		95,12	
	14	94,87		96,97	
	15	91,67		93,75	
	16	100,00		95,52	
	17	97,52		97,56	
	18	100,00		93,06	
	19	100,00		72,41	
	20	100,00		91,15	
	21	95,92		82,64	
	22	94,79		92,31	
	23	85,54		97,50	
	24	100,00		84,38	

Se pudo determinar que el gel con Tocte, Higo, Dulcamara y Salvia si tiene actividad antifúngica frente al hongo *Malassezia furfur* en las dosis de 24 horas con un porcentaje de eliminación entre el 85,54% al 100% y a las 48 horas del un 82,64% al 100%, siendo la dosis cada 24 horas la mas efectiva ya que elimina el hongo mucho mas rápido con respecto a la dosis de 48 horas.

Al conocer que el gel con la mezcla de los vegetales tenia la actividad antifúngica se determino al finalizar los tratamientos en los niños conociendo así que en la dosis de 24 horas aplicado el gel se pudo eliminar al hongo en 12 niños demostrando que esta dosis es mucho más efectiva en los niños de la comunidad.



FOTOGRAFÍA N. 21. APLICACIÓN DEL GEL CON TOCTE, HIGO, DULCAMARA Y SALVIA EN LOS NIÑOS DE LA COMUNIDAD SANJAPAMBA CON *Malassezia furfur*.

FUENTE: MAYRA SILVERS



FOTOGRAFÍA N. 22 ELIMINACIÓN TOTAL DEL HONGO *Malassezia furfur* EN EL ROSTRO CON LA DOSIS CADA 24 HORAS

FUENTE: MAYRA SILVERS

3.5 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL GEL Y CONTROL (NEO-NYSTASOLONA) EN NIÑOS DE LA COMUNIDAD SANJAPAMBA CON *Malassezia furfur*.

CUADRO N. 14 ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL GEL Y CONTROL (NEO-NYSTASOLONA) EN LA DOSIFICACION CADA 24 HORAS Y 48 HORAS RESPECTIVAMENTE.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	201,6083683	3	67,20278944	1,90165122	0,13981215	2,76943095
Dentro de los grupos	1978,993925	56	35,33917723			
Total	2180,602293	59				

Fuente: MAYRA SILVERS

Al analizar las variaciones que existen entre las distintas dosis cada 24 y cada 48 horas al haber iniciado la aplicación del tratamiento del gel con Tocte, Higo, Dulcamara y Salvia se determinó la efectividad del gel por medio de la reducción de la mancha por el tamaño de la misma que tuvo al inicio en la dosis de 24 horas del 85,54% al 100% y a las 48 horas del un 82,64% al 100%, y al terminar el tratamiento se da una considerable eficiencia con la dosis de 24 horas con el total de pacientes con el 50 % de eliminación de la mancha y con la dosis cada 48 horas de 16.67% del total de pacientes determinando así que existe una diferencia del valor Fisher (F) con respecto al valor crítico para F.

Con estos datos se procede a elaborar Tukey al 5% para determinar las diferencias existentes entre las medias de los tratamientos por dosis realizados a las 24 y 48 horas.

3.6PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL GEL Y CONTROL (NEO-NYSTASOLONA) EN NIÑOS DE LA COMUNIDAD SANJAPAMBA CON *Malassezia furfur*.

CUADRO N. 15 PRUEBA DE TUKEY AL 5% PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DELGEL Y CONTROL (NEO-NYSTASOLONA) EN LA DOSIFICACION CADA 24 HORAS Y 48 HORAS RESPECTIVAMENTE.

DOSIS		Gel24	Control24	Gel48	Control48
			96,8679167	95,1516667	93,4670833
Control48	91,755	5,11291667	3,39666667	1,71208333	0
Gel48	93,4670833	3,40083333	1,68458333	0	
Control24	95,1516667	1,71625	0		
Gel24	96,8679167	0			

FUENTE: MAYRA SILVERS

En el Cuadro N. 15 podemos observar que las dosis del control a las 48 h, el gel a las 48 h y control a las 24 horas están a la par en el efecto antifúngico frente a la *Malassezia furfur* y si es una variante determinante la dosificación.

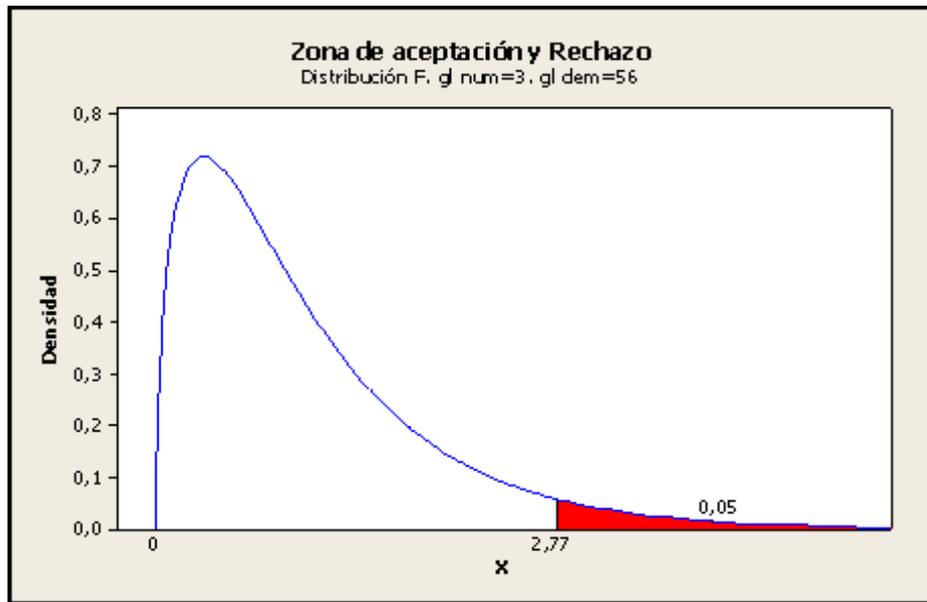
Se interpola el valor para q con un alfa del 0.05 de 4,56 ya que es un sistema des balanceado siendo su valor encontrado en tablas de 3,73

Se determina que los valores de la dosis del control cada 48 horas no es igual que a la aplicación del gel cada 48 horas.

Demostrándose que con la dosificación del gel cada 24 horas es mucho mas eficaz frente a la eliminación del hongo *Malassezia furfur* en la aplicación de los 15 día con una media de eliminación del 96,87 % del total de los pacientes como un tratamiento capaces de eliminar al hongo.

Mientras que en la dosificación de del gel cada 48 horas es eficaz frente a la eliminación del hongo *Malassezia furfur* en la aplicación de los 15 día con una media de eliminación del en un 93,47% del total de los pacientes además proporciona mucho menos gasto ya que utiliza la aplicación del gel menos veces para el tratamiento de eliminación del hongo.

GRÁFICO N. 1 RANGO DE ACEPTACION EN EL ANALISIS DE DATOS DE LA ELIMINACION DEL HONGO *Malassezia furfur* CON EL GEL CON TOCTE, HIGO, DULCAMARA Y SALVIA RIOBAMBA ENERO DEL 2012.

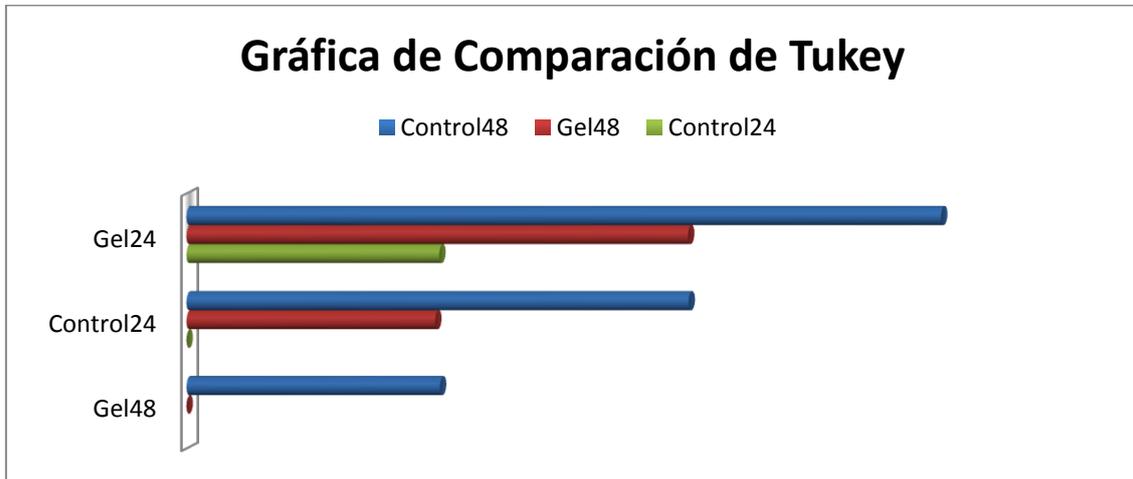


FUENTE: MAYRA SILVERS

En el gráfico N. 1 se observa la zona de aceptación de la hipótesis de si el gel tiene actividad antifúngica frente al hongo *Malassezia furfur* del 2.77 que pertenece al valor crítico para F.

En la aplicación del gel en dosis cada 24 horas y cada 48 horas en el lapso de (15 días) considerados estas dosis como los mejores tratamientos por su alta efectividad de eliminación de las manchas.

GRÁFICO N. 2 COMPARACION DE TUKEY EN EL ANALISIS DE DATOS DE LA ELIMINACION DEL HONGO *Malassezia furfur* CON EL GEL CON TOCTE, HIGO, DULCAMARA Y SALVIAFRENTE AL CONTROL (NEO-NYSTASOLONA) RIOBAMBA ENERO DEL 2012.



FUENTE: MAYRA SILVERS

En el Grafico N. 2 se puede observar las grandes diferencias existentes entre las dosis entre el gel en dosis cada 48 horas con respecto al control en dosis dada 48 horas.

Se consideran como mejores tratamientos con gel y control progresivamente desde el control cada 48 horas, gel con dosificación cada 48 horas y el control cada 24 horas en el lapso de (15 días) que se dio finalizado el tratamiento con una media de eliminación de la mancha de 93,47% para el tratamiento del gel cada 48 horas teniendo la capacidad de eliminar al hongo *Malassezia furfur*.

CAPÍTULO IV.

4. CONCLUSIONES.

1. El gel con la mezcla de extractos y aceites esenciales de Tocte, Higo, Dulcamara y Salvia tuvo efecto antifúngico para el hongo *Malassezia furfur* se elimina la mancha progresiva de la mancha, comprobándose que la hipótesis planteada es positiva.
2. El extracto de Tocte tiene un pH de 4.68, densidad 0.977 g/mL, índice de refracción de 1.346 los grupos fitoquímico son taninos, flavonoídes. El Higo tuvo pH de 6.28, densidad 0.825 g/mL, índice de refracción de 1.409 contiene cumarinas, taninos; Dulcamara presentó pH de 5,28, densidad 1.049 g/mL, índice de refracción de 1.355 presencia de, alcaloides, taninos y triterpenoides.
3. Se evaluó como actúa el gel al aplicar en los rostros de los niños con *Malassezia furfur*, comprobándose que en la aplicación del control positivo con (Neo-nystasolona) con aplicación cada 24 horas reduce en un (95,15%) de igual forma con el gel da 96,87% de efecto sobre *Malassezia furfur* a los 15 días de tratamiento.
4. Finalmente se determino como actúan el gel con mayor eficacia frente al control positivo (Neo-nystasolona) con el 96,87% al finalizar el tratamiento de 15 días.

CAPÍTULO V.

5. RECOMENDACIONES.

1. Al ser comprobado el efecto anti fúngico del gel con la mezcla con extractos puros y aceites esenciales como Tocte (*Junglans regia*), Higo (*Ficus carica*), Dulcamara (*Solanum dulcamara*) y Salvia (*Salvia officinalis*) se sugiere incorporación de la mezcla de los vegetales en mayor cantidad para potenciar el efecto antifúngico a corto plazo.
2. Se recomienda hacer otros productos como jabones de tocador con Tocte (*Junglans regia*), Higo (*Ficus carica*), Dulcamara (*Solanum dulcamara*) y Salvia (*Salvia officinalis*) para facilitar la eliminación del hongo *Malassezia furfur* en todo el cuerpo optimizando de esta manera su efecto diariamente.

CAPÍTULO VI.

6. RESUMEN Y SUMMARY

La presente investigación tuvo como objetivo preparar extractos de Tocte (*Junglans neotrópica*), Higo (*Ficus carica*), Dulcamara (*Solanum dulcamara*) y Salvia (*Salvia officinalis*) para determinar propiedades físicas, químicas y elaborar el gel al 1% de Carbopol y 0.15% de los extractos, aceites esenciales y su aplicación en el rostro de los niños que presentan el hongo *Malassezia furfur* y observar su efecto.

Los extractos etanólicos se preparan por maceración y los aceites esenciales se adquirieron. El gel se obtiene por mezcla de Carbopol al 1% en agua destilada y 0.15% de los extractos de Tocte, Higo, dulcamara y el aceite esencial de Salvia.

Selecciono 60 niños de la Escuela de la Comunidad Sanjapamba Provincia de Chimborazo determinado con lo prueba de KOH positivo. La aplicación del gel se realizo cada 24 horas y 48 horas durante 15 días a grupos de 24 niños para cada tiempo respectivamente, observándose los resultados positivos con disminución progresiva de las manchas provocadas por el hongo *Malassezia furfur*.

Se determino que la aplicación del gel cada 24 horas durante 15 días es el mas adecuado comprobándose por el análisis de varianzas y la prueba de Tukey al 5% con una media de eliminación de la mancha del hongo 96,87% y con el control (Neo-nystasolona) dio 95,15%.

SUMMARY

"Clinical study of antifungal activity of gel tocte, fig, bitters weed, and sage in children of Sanjapamba Community, Chimborazo Province. This research is motivated by preparing extracts tocte, fig, bitters weed and sage to determine physical properties, chemical and process the Gel 1% and 0.15% Carbopol extracts, essential oils and their application in the faces of the children with the fungus *Malassezia furfur* and observe their effect.

In fact this is the problem of the present study. The Objective is the development of gel with the above products to find solution to the problem in the children's face of Community Sanjapamba. Methodology. Clinical study. The ethanol extracts were prepared by maceration and essential oils were purchased. The gel is obtained by mixing 1% Carbopol in distilled water and 0.15% Tocte extracts, fig, bitters weed, and essential oil-Salvia.

Sixty children were selected from the Community School Sanjapamba and test determined Potassium Hydrogen (KOH) positive. The application of the gel was done every 24 hours, and every 48 hours for 15 days to groups of 24 for each time children respectively. -As positive results observed with progressive decline stains caused by the fungus *Malassezia furfur*.

Conclusion and Recommendation. It was determined that the application of gel every 24 hours for 15 days, is the most suitable, verifying itself by analysis of variance and the Tukey test at 5% with a mean of elimination of 96.87% stain fungus, and to control (Neo-nystasolona) gave 95.15%. Other products are recommended as soaps to facilitate removal of the fungus *Malassezia furfur* throughout the body, thereby optimizing its effect daily."

CAPÍTULO VII.

7. BIBLIOGRAFIA

1. **AHKAMI, R., SCHWARTZ, R.,** Dermatology and Nevus anemicus., 2a. ed., Estados Unidos., Editorial McGraw-Hill., 1999., Pp. 198, 327-329.
2. **ALONSO, J.,** Tratado de Fitomedicina. Bases clínicas y farmacológicas., Buenos Aires-Argentina., Ediciones SRL., 1998., Pp. 1-1039.
3. **ALONSO, J.,** Tratado de fitofármacos y nutracéuticos., Buenos Aires., Ediciones Corpus., 2004., Pp. 1-1359.
4. **ANDES, D., OGTROP, M.,** Antimicrob Agents Chemother., Eitorial Interamericana S.A., 2000., Pp. 44, 938-42.
5. **ARIKAN, S., LOZANO, M., PAETZNICK, V., NANGIA, S., REX, H.,** Clin Microbiol., Estados Unidos., 1999., Pp. 37, 3946-3951.
6. **ARMIJO, J., ADIN, J.,** Farmacología Clínica., Editorial Farmacología Humana., 4a ed., Barcelona-España., 2003., Pp. 191-218.
7. **ARMIJO, M.,** Dermatosis por hongos., Editorial Médica Internacional S.A., 1989., P. 45

8. **AVILÁN, J., ROVIRA, M.,** Medicamentos “naturales” o convencionales., Caracas-Venezuela., Editorial Santiago., 2004., Pp. 112-115.
9. **BARRAGAN, R.,** Principios de Diseño Experimental. 4a. ed., Distrito Federal de México-México., 1997., Pp. 10,21.
10. **BAKKE, O., GARCÍA, F.,** Ensayos clínicos con medicamentos. Fundamentos básicos, metodología y práctica., Ediciones Doyma., Barcelona-España., 1994., Pp. 235-245
11. **BAÑOS, J., BROTONS, C., FARRÉ, M.,** Glosario de investigación clínica y epidemiológica., Fundación Dr. Antonio Esteve. 2a. ed., Barcelona-España., 1998., Pp. 356-359
12. **BARCHIESI, F., ARZENI, D., CASELLI, F., SCALISE, G.,** Estructura y actividad de los antifúngicos., Editorial Antimicrob Chemother., 2000., Pp. 45,408-409.
13. **BURGOS, R., CHICHARRO, J., BOBENRIETH, M.,** Metodología de investigación y escritura científica en clínica., Escuela Andaluza de Salud Pública., 3a. ed., Granada., 1994., Pp. 100-120.
14. **BERKOWITZ, B., KATZUNG, B.,** Basic & Clinical Evaluation of New Drugs., 8a. ed., Editorial Basic & Clinical Pharmacology., New York-USA., 2001., Pp. 64-74.

15. **BRUNEAU, S., GUINET, R.**, Quantitative immunoelectrophoretic study of *Pityrosporum*, Sabouraud., Nueva Work-USE., 1984., Pp. 27,124-136.
16. **BRUSCO, M.**, Ensayos Clínicos en Niños., 3a. ed., Zaragoza-España., Editorial Pediátrica., 2004., Pp. 9, 61,387.
17. **CLANCY, C., NGUYEN, M.**, *In vitro* efficacy and fungicidal activity of voriconazole against *Aspergillus* and *Fusarium* species., Editorial Clin Microbiol., 1998., Pp. 17,573-575.
18. **COLLIN, B., CLANCY, C., NGUYEN, M.**, Antifungal resistance in non-albicans *Candida* species. Drug Resist Update., Canada- USE., 1999., Pp. 2,9-14.
19. **CODEMPE - ECUARUNARI.** 1999. Manual de la medicina de los pueblos Kichwas del Ecuador. Quito- Ecuador., P. 79.
20. **CUNNINGHAM, A., LEEMING, J., INGHAM, E., GOWLAND, G.**, Differentiation of three serovars of *Malassezia furfur*., 2a. ed., Canada-USE., Eitorial J Appl Bacteriol., 1990., Pp. 68,439-446.
21. **DEHOOG, G., GUARRO, J., WINTERMANS, R., GENÉ, J.**, Pathogenic fungi and common opportunists yeasts., Editorial Hoog GS, Guarro J., Universidad Rovira I Virgili., 1995., P. 212.
22. **DEBRUYNE, D., RYCKELYNCK, J.**, Clinical pharmacokinetics of fluconazole., Editorial Clin Pharmacokinet., 1993., Pp. 24,10-27.

23. **DENNING, D., HANSON, L., PERLMAN, A., STEVENS, D.,** In vitro susceptibility and synergy studies of *Aspergillus* species to conventional and new agents., 7a. ed., Canada., Editorial Diagnostic Microbiol Infect Dis., 1992., Pp. 15,21-34.
24. **DOMINGUEZ, X.,** Métodos de Investigación Fitoquímica., México., Editorial Limusa., 1973., Pp. 73.
25. **DURÁN, J.,** "Investigación en Terapéutica clínica: Ensayos clínicos con medicamentos" ., Educación médica., 2008., P. 45.
26. **ESPINEL, A.,** *In vitro* activities of the new triazole voriconazole against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and common and emerging yeast pathogens., Editorial J Clin Microbiol., 1998., Pp. 36, 198-202.
27. **ESPINEL, I.,** Comparison of *in vitro* activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK-0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts., 5a. ed., Canada-USE., Editorial J Clin Microbiol., 1998., Pp. 36, 2950-2956.
28. **FUNG, W., LO, K.,** Prevalence of skin disease among school children and adolescents in a Student., 2a. ed., Hong Kong., Editorial Pediatric Dermatol., 2000., Pp. 17,440-446.
29. **FUNG, T., HUCZKO, E., MINASSIAN, B., BONNER, D.,** *In vitro* activity of a new orial triazole., Hong Kong., Editorial Chemother., 1998., Pp. 42, 313-318.

30. **GALADARI, E., HELMY, M., AHMED, M.,** Trace elements in serum of pityriasis Alba patients., 3a. ed., USE., Editorial Dermatol., 1992., Pp. 31,525-526.
31. **GALGIANI, J., LEWIS, M.,** Cryptococcus neoformans, and other pathogenic yeasts., 2a. ed., USE., Editorial Chemother., 1997., Pp. 41,180-183.
32. **GALGIANI, J.,** Coccidioidomycosis., Editorial Medica., 1993., Pp. 159,153-171.
33. **GOLDANI, L., AQUINO, V., DARGEL, A.,** Disseminated cutaneous sporotrichosis in an AIDS., Canada-USE., Editorial Clinical., 1999., Pp. 28, 137-138.
34. **GONZALES, G.,** Métodos Estadísticos y Principios de Diseño Experimental., 2a. Edición., Quito-Ecuador., Universidad Central del Ecuador., 1985., Pp. 181, 198.
35. **GUÉHO, E., MIDGLEY, G., GUILLOT, J., VARGAS, O.,** Treatment of pityriasis Alba with a combination of coal tar., Editorial Medica Cutan Ibero., 1980., Pp. 8,69-72.
36. **GORDON, M.,** In vitro culture of Pityrosporum orbiculare., Editorial Mycologica., 1951., Pp. 43,524-535.
37. **GUÉHO, E.,** Malassezia by means of genome comparison., Editorial., Antonie van Leeuwenhoek., 1989., Pp. 55, 245-251.
38. **GUILLOT, J., GUÉHO, E., LESOURD, M., MIDGLEY, G., CHÈVRIER, G., DUPONT, B.,** Identification of Malassezia., Editorial Mycol Medica., 1996., Pp. 6,103-110.

39. **GUILLOT, J., GUÉHO, E.**, The diversity of *Malassezia* yeasts., 2a. ed., Canada-USE., Editorial Antonie van Leeuwenhoek., 1995., Pp. 67, 297- 314.
40. **HATA, K., KIMURA, J., MIKI, H., TOYOSAWA, T., NAKAMURA, T., KATSU, K.**, *In vitro* and *in vivo* antifungal activities., 3a. ed., Canada., Editorial Chemother., 1996., Pp. 40,2237-2242.
41. **HAUBRICH, R., HAGHIGHAT, D., BOZZETTE, S., TILLES, J.**, Efficiency virus infection., 3a ed., USE., Editorial Infect Dis., 1994., Pp. 170, 238-242.
42. **HERNÁNDEZ, M.**, *Malassezia* (*Pityrosporum*)., 5a. ed., Barcelona-España., Editorial Rev Iberoam Micol., 1993., Pp. 10,24-28.
43. **HERNÁNDEZ, R., ARMAS, M.**, Comités de Ética e Investigación Clínica. Medicina de Postgrado., 2003 Pp. 190-192.
44. **HOBAN, J, ZHANEL G, KARLOWSKY A.**, *In vitro* susceptibilities of *Candida* and *Cryptococcus neoformans* isolates from blood., 3a. ed., Barcelona-España., Editorial Chemother., 1999., Pp. 43, 463-474.
45. **HOWELL, S., QUIN, C., MIDGLEY, G.**, *Malassezia furfur*., 2a. ed., Canada., Editorial Mycoses., 1993., Pp. 36, 263-266.
46. **INANIR, I., SAHIN, M., GUNDUZ, K.**, *Pediatric Dermatol.*, 5a ed., Inglaterra., 2002., Pp. 19, 307-311.
47. **INGHAM, E., CUNNINGHAM, AC.**, *Malassezia furfur*., 1a. ed., Manjatan., Editorial Mycol., 1993., Pp. 31,265-288.

48. **JAMBI KIWA.,** La Magia de las Plantas; Guía Práctica Para Conocer las Plantas Medicinales y sus Propiedades Curativas. Chimborazo – Ecuador., 2000., Pp. 84, 88.
49. **JANNIGER, C., SCHWARTZ, R.,** Cutis., 1a. ed., Mexico., 1993., Pp. 51, 167-174.
50. **JÁTIVA, C.,** Texto Básico de Farmacognosia de los Vegetales a las Medicinas., Riobamba- Ecuador., Documento ESPOCH., 2004., Pp. 97.
51. **JOHNSON, E., SZEKELY, A., WARNOCK, DW.,** In vitro activity of voriconazole, itraconazole and amphotericin., New York-USE., 5a. ed., Editorial Antimicrob Chemother., 1998., Pp. 42,741-745.
52. **KAUFFMAN, C.,** Treatment of lymphocutaneous and visceral sporotrichosis with fluconazole., 3a. ed., Kansas., Editorial Dis., 1996., Pp. 22, 46-50.
53. **LAPORTE, J.,** Principios básicos de investigación clínica. 2a. ed., Barcelona-España., Editorial Astra Zeneca., 2001., Pp. 235,246.
54. **MANUAL DE PROCEDIMIENTOS Y TECNICAS DE LABORATORIO PARA IDENTIFICACION DE LOS PRINCIPALES HONGOS OPORTUNISTAS CAUSANTES DE MICOSIS HUMANA.** Editorial Firmart S.A.C., Lima-Perú., Pp. 35, 364-376
55. **MIDGLEY, G.,** The diversity of Pityrosporum (Malassezia) yeasts in vivo and in vitro., Editorial Mycopathologia., 1989., Pp. 106, 143-153.

56. **NARANJO, P.**, Plantas del Ecuador., Quito-Ecuador., 2000., Pp. 42, 256, 257.
57. **ODDS, F.**, Antifungal effects of fluconazole., Editorial Chemother., 1986., Pp. 18, 473-478.
58. **PHARMACOPEA.** (2007). 565 Botanical Extracts. USP 30.
59. **PINTO, F., BOLOGNIA, J.**, Disorders of hypopigmentation in children. Pediatric Clinic North Am., 1991., Pp. 38, 991-1017.
60. **POPESCU, R., POPESCU, C., WILLIAMS, H.**, The prevalence of skin conditions in Romanian school children., Editorial Br J., 1999., Pp. 140, 891-896.
61. **RANDJANDICHE, M.**, Pityrosporum ovale., Editorial Chalmers., 1976., Pp.5, 79-84.
62. **TERRÉS, C.**, Diseño estadístico de ensayos clínicos Medicina Clínica., 1996., Pp. 107, 303-309.
63. **WARREN, N., HAZEN, K.**, Manual of Clinical Microbiology., 6a ed., Washington DC., Editorial ASM Press., 1995., Pp. 733-734.
64. **YARROW, D., AHEARN, D.**, Malassezia Baillon., 3a ed., Amsterdam, Editorial Science Publishers., 1984., Pp. 882-885.

BIBLIOGRAFIA REVISTAS

65. **ASRUDILLO, M.**, “Fitoterápicos Antibacterianos y Antifúngicos”., Revista de la Facultad de Ciencias Químicas Universidad de Cuenca., Cuenca- Ecuador. N° 2., Pp. 29,30., Julio 16 del 2003.

66. **BODEY, G.**, Azole antifungal agents., Clin Infect Dis., 1992., Pp. 14 (Suppl 1)., S161-S9.
67. **FAERGEMANN, J.**, Pityrosporum infections., Acad Dermatol 1994; 31:S18-S20.
68. **GIUSIANO, G.**, Malassezia, Estado del conocimiento y perspectivas en su estudio. Revista Argentina., Microbiologica., Enero, Marzo., 2006., Volumen 38., No.1., Pp. 41-48.
69. **GUÉHO, E., FAERGEMANN, J., LYMAN, C.**, Analissie E. Malassezia and Trichosporon., Editorial Medica., Version Mycol., 1994., Pp. 32 (Suppl): S367-S378
70. **PÉREZ, J.**, 2003. Eficiencia en el Uso de los Medicamentos. Revista Cubana Farmacológica., 2003., Pp: 27-33.

BIBLIOGRAFIA CONGRESOS

71. **SPÍROZ, C., MORENO, L., REZUSTA, A., RUBIO, M.**, Diferenciación morfológica, bioquímica y enzimática en *M. furfur*. II Congreso Nacional de Micología., Santiago de Compostela, 1994., Rev Iberoam Micol., 1994., P.11:S31.

BIBLIOGRAFÍA DE INTERNET

72. **ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA**

<http://www.remedios.innatia.com/c-remedios-hongos/a-hierbas-para-los-hongos.html>

2011/10/20

- 73. COMPARACIÓN DEL EFECTO CICATRIZANTE DE GELES ELABORADOS A BASE DE PROPOLIO Y CANENDULA EN HERIDAS DE CONEJOS**

<http://www.saludalia.com/starmedia/temas>

2011/10/20

- 74. ELABORACIÓN DE UN GEL DE ALOE PARA TRATAMIENTOS DEL ACNÉ**

<http://www.medicina.usmp.edu.pe/congresomundial/000data/temlib.htm>

2011/05/28

- 75. CONTROL DE FORMULACIONES**

<http://www.ffyb.uba.ar/farmacocinetica%2014/controlformulaciones%5B4tm>

2011/08/23

- 76. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DEL TOCTE**

<http://www.ecoaldea.com/plmd/nogal.htm>

2011/08/25

- 77. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA DULCAMARA**

<http://es.wikipedia.org/wiki/Solanaceae>

2011/06/15

- 78. EFECTOS DE LA DULCÁMARA**

<http://www.ecovisiones.cl/ecovida/hierbas/DULCAMARA.htm>

2011/05/18

- 79. ESTUDIOS CLINICOS**
<http://www.csbehring.com.mx/csl-investigacion-y-desarrollo/estudios-clinicos.htm>.
2011/10/25
- 80. EXTRACCIÓN, MACERACIÓN, PERCOLACIÓN.**
<http://www.sanopordentro.com/extractos-vegetales.html>2011/05/25.
2011/04/26
- 81. FICUS CARICA**
<http://avellaneda.com.es/saucoenflor.jpg>
2011/05/25
- 82. HIGO**
<http://es.wikipedia.org/wiki/Higo>
2011/07/25
- 83. HISTORIA DE LA DULCAMARA**
<http://www.cheesehosting.com/medicinaalternativa/plantas-medicinales/dulcamara.php>
2011/04/28
- 84. INFORMACION SOBRE EL HIGO**
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7701>
2011/07/20
- 85. LAS PLANTAS COMO FUENTES DE ANTIFÚNGICO**
http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2005/huamani_am/html/sdx/huamani_am.html
2011/12/20

- 86. PRINCIPIOS ACTIVOS DE LA SALVIA**
<http://www.elarboldelavida.net/salvia-pl-130.html>
2011/02/30
- 87. PROPIEDADES DEL FICUS CARICA**
<http://saludablenaturaleza.blogspot.com/2010/04/la-higuera-ficus-carica-1.html>
2011/03/19
- 88. PROPIEDADES MEDICINALES DEL HIGO**
<http://propiedadesfrutas.jaimaalkauzar.es/propiedades-nutritivas-del-higo.html>
2012/02/24
- 89. SALVIA OFFICINALIS**
<http://www.hierbitas.com/nombrecomun/Salvia.htm>
2010/12/10
- 90. SOLANUM DULCAMARA**
http://www.es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Illustration_Solanum_dulcarama0
2011/06/20
- 91. TOCTE**
http://www.sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/farmacia/v34_n109/catalago_pmedicinales.htm
2011/03/01

CAPÍTULO VIII.

8. ANEXOS.

ANEXO N. 1 TABLA DE RESULTADOS DE LA REDUCCION DE LA MANCHA DEL HONGO *Malassezia furfur* EN LOS NIÑOS.

paciente	MANCHA INICIAL	MANCHA FINAL	TAMAÑO INICIAL	TAMAÑO FINAL	DIFERENCIA	% de reducción
1	4	2	6,5	0,5	6	92,3
2	6	3	6,8	0,9	5,9	86,8
3	3	0	7	0	7	100,0
4	2	0	4,5	0	4,5	100,0
5	7	2	10,9	0,6	10,3	94,5
6	10	0	13,7	0	13,7	100,0
7	5	1	10	0,3	9,7	97,0
8	4	0	6,4	0	6,4	100,0
9	4	1	5	0,1	4,9	98,0
10	6	0	16	0	16	100,0
11	6	0	9,9	0	9,9	100,0
12	6	1	8,5	0,4	8,1	95,3
13	5	0	6,3	0	6,3	100,0
14	7	2	6,6	0,6	6	90,9
15	5	1	6,2	0,3	5,9	95,2
16	7	0	6,6	0	6,6	100,0
17	4	0	5,7	0	5,7	100,0
18	6	1	3,9	0,2	3,7	94,9
19	3	1	3,6	0,3	3,3	91,7
20	5	0	5,4	0	5,4	100,0
21	15	3	13,1	1,6	11,5	87,8
22	6	1	12,1	0,3	11,8	97,5
23	4	0	12	0	12	100,0
24	4	0	10	0	10	100,0
25	7	1	13,1	0,3	12,8	97,7
26	9	2	11,6	1,2	10,4	89,7
27	4	0	3,2	0	3,2	100,0
28	6	1	9,8	0,4	9,4	95,9
29	5	2	9,6	0,5	9,1	94,8
30	4	2	8,3	1,2	7,1	85,5

31	3	0	4,5	0	4,5	100,0
32	6	2	13	0,4	12,6	96,9
33	5	0	8,6	0	8,6	100,0
34	3	1	5,4	0,1	5,3	98,1
35	5	0	7,6	0	7,6	100,0
36	5	1	8,1	1,1	7	86,4
37	5	0	8,1	0	8,1	100,0
38	6	1	6,6	0,3	6,3	95,5
39	4	1	4,6	0,2	4,4	95,7
40	3	0	1,5	0	1,5	100,0
41	6	2	9,1	0,9	8,2	90,1
42	3	1	4,8	0,2	4,6	95,8
43	3	1	2,6	0,2	2,4	92,3
44	3	0	4,6	0	4,6	100,0
45	3	1	4,1	0,2	3,9	95,1
46	4	1	6,6	0,2	6,4	97,0
47	3	1	3,2	0,2	3	93,8
48	4	1	6,7	0,3	6,4	95,5
49	5	1	8,2	0,2	8	97,6
50	3	1	7,2	0,5	6,7	93,1
51	4	2	2,9	0,8	2,1	72,4
52	5	2	11,3	1	10,3	91,2
53	4	3	12,1	2,1	10	82,6
54	6	3	10,1	2,6	7,5	74,3
55	3	2	7,8	0,6	7,2	92,3
56	9	2	14	0,7	13,3	95,0
57	5	1	8	0,2	7,8	97,5
58	7	2	15,5	1,3	14,2	91,6
59	7	0	10,3	0	10,3	100,0
60	4	2	3,2	0,5	2,7	84,4

ANEXO N. 2 Análisis de Varianza de un factorla eliminación de la mancha del hongo *Malassezia furfuren* (15 días). Críticas de Análisis.

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Gel24	24	2324,83	96,86791667	17,9279563
Control24	6	570,91	95,15166667	25,2336567
Gel48	24	2243,21	93,46708333	42,7611955
Control48	6	550,53	91,755	91,39503

ANEXO N. 3 Prueba de Tukey al 5% para el Gel con Extractos Puros de Higo, Tocte, Dulcamara y Salvia Frente al control (Neo-nystasolona) para la Eliminación de la mancha del Hongo *Malassezia furfur* en (15 días). Críticas de Análisis.

METODO DE TUKEY		
ALFA	0,05	
q _{0,05} (4,56)	3,73	interpolado
S _{Yi.} ~	1,92	des balanceado
T_{0,05}	7,1616	

ANEXO N. 4 Prueba de Tukey al 5% para el Gel con Extractos Puros de Tocte, Higo, Tocte Dulcamara y Aceite esencial de Salvia Frente al Control (Neo-nystasolona) para la Eliminación de la mancha del Hongo *Malassezia furfur* en (15 días). Críticas de Análisis.

<i>Dosis</i>	<i>Grupos</i>	<i>Promedio</i>	
4	Control48	91,755	#comparaciones
3	Gel48	93,4671	1
2	Control24	95,1517	2
1	Gel24	96,8679	3

ANEXO N. 5 Prueba de Tukey al 5% comparaciones y conclusiones para el Gel con Extractos Puros de Tocte, Higo, Tocte Dulcamara y Aceite esencial de Salvia Frente al Control (Neo-nystasolona) para la Eliminación de la mancha del Hongo *Malassezia furfur* en (15 días). Críticas de Análisis.

DOSIS	COMPARACION	CONCLUSION	
G24-C48	5,113	<T0,05	PARAMOS
C24-C48	3,397	<T0,05	PARAMOS
G48-C48	1,712	<T0,05	PARAMOS

ANEXO N. 6 Valores de la amplitud total estudentizada, q 0.05, para uso de la prueba de Tukey (valor de interpolación).

Valores de la amplitud total estudentizada, q 0.05, para uso en la prueba de Tukey

glee	Número de tratamientos																			
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
1	17.97	26.98	32.82	37.08	40.41	43.12	45.40	47.36	49.07	50.59	51.96	53.20	54.33	55.36	56.32	57.22	58.04	58.83	59.56	
2	6.08	8.33	9.80	10.88	11.74	12.44	13.03	13.54	13.99	14.39	14.75	15.08	15.38	15.65	15.91	16.14	16.37	16.57	16.77	
3	4.50	5.91	6.82	7.50	8.04	8.48	8.85	9.18	9.46	9.72	9.95	10.15	10.35	10.53	10.69	10.84	10.98	11.11	11.24	
4	3.93	5.04	5.76	6.29	6.71	7.05	7.35	7.60	7.83	8.03	8.21	8.37	8.52	8.66	8.79	8.91	9.03	9.13	9.23	
5	3.64	4.60	5.22	5.67	6.03	6.33	6.58	6.80	6.99	7.17	7.32	7.47	7.60	7.72	7.83	7.93	8.03	8.12	8.21	
6	3.46	4.34	4.90	5.30	5.63	5.90	6.12	6.32	6.49	6.65	6.79	6.92	7.03	7.14	7.24	7.34	7.44	7.51	7.59	
7	3.34	4.16	4.68	5.06	5.36	5.61	5.82	6.00	6.16	6.30	6.43	6.55	6.66	6.76	6.85	6.94	7.02	7.10	7.17	
8	3.26	4.04	4.53	4.89	5.17	5.40	5.60	5.77	5.92	6.05	6.18	6.29	6.39	6.48	6.57	6.65	6.73	6.80	6.87	
9	3.20	3.95	4.41	4.76	5.02	5.24	5.43	5.59	5.74	5.87	5.98	6.09	6.19	6.28	6.36	6.44	6.51	6.58	6.64	
10	3.15	3.88	4.33	4.65	4.91	5.12	5.30	5.47	5.60	5.72	5.83	5.93	6.03	6.11	6.19	6.27	6.34	6.40	6.47	
11	3.11	3.82	4.26	4.57	4.82	5.03	5.20	5.36	5.49	5.61	5.71	5.81	5.90	5.98	6.06	6.13	6.20	6.27	6.33	
12	3.08	3.77	4.20	4.51	4.75	4.95	5.12	5.28	5.39	5.51	5.61	5.71	5.80	5.88	5.95	6.02	6.09	6.15	6.21	
13	3.06	3.73	4.15	4.45	4.69	4.88	5.05	5.21	5.32	5.43	5.53	5.63	5.71	5.79	5.86	5.93	5.99	6.05	6.11	
14	3.03	3.70	4.11	4.41	4.64	4.83	4.99	5.15	5.25	5.36	5.46	5.55	5.64	5.71	5.79	5.85	5.91	5.97	6.03	
15	3.01	3.67	4.08	4.37	4.59	4.78	4.94	5.08	5.20	5.31	5.40	5.49	5.57	5.65	5.72	5.78	5.85	5.90	5.96	
16	3.00	3.65	4.05	4.33	4.56	4.74	4.90	5.03	5.15	5.26	5.35	5.44	5.52	5.59	5.66	5.73	5.79	5.84	5.90	
17	2.98	3.63	4.02	4.30	4.52	4.70	4.86	4.99	5.11	5.21	5.31	5.39	5.47	5.54	5.61	5.67	5.73	5.79	5.84	
18	2.97	3.61	4.00	4.28	4.49	4.67	4.82	4.96	5.07	5.17	5.27	5.35	5.43	5.50	5.57	5.63	5.69	5.74	5.79	
19	2.96	3.59	3.98	4.25	4.47	4.65	4.79	4.92	5.04	5.14	5.23	5.31	5.39	5.46	5.53	5.59	5.65	5.70	5.75	
20	2.95	3.59	3.96	4.23	4.45	4.62	4.77	4.90	5.01	5.11	5.20	5.28	5.36	5.43	5.49	5.55	5.61	5.66	5.71	
30	2.92	3.53	3.90	4.17	4.37	4.54	4.68	4.81	4.92	5.01	5.10	5.18	5.25	5.32	5.38	5.44	5.49	5.55	5.59	
40	2.89	3.49	3.85	4.10	4.30	4.46	4.60	4.72	4.82	4.92	5.00	5.08	5.15	5.21	5.27	5.33	5.38	5.43	5.47	
50	2.86	3.44	3.79	4.04	4.23	4.39	4.52	4.63	4.73	4.82	4.90	4.98	5.04	5.11	5.16	5.22	5.27	5.31	5.36	
60	2.83	3.40	3.74	3.98	4.16	4.31	4.44	4.55	4.65	4.73	4.81	4.88	4.94	5.00	5.06	5.11	5.15	5.20	5.24	
120	2.80	3.36	3.68	3.92	4.10	4.24	4.36	4.47	4.56	4.64	4.71	4.78	4.84	4.90	4.95	5.00	5.04	5.09	5.13	
	2.77	3.31	3.63	3.86	4.03	4.17	4.29	4.39	4.47	4.55	4.62	4.68	4.74	4.80	4.85	4.89	4.93	4.97	5.01	

ANEXO N. 7 FOTOS DE LOS NIÑOS ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON EL GELCADA 24 HORAS.





**ANEXO N. 8 FOTOS DE LOS NIÑOS ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO
CON EL GEL CADA 48 HORAS.**



