

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



TESIS

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA IN VITRO DEL
ESMALTE DE UÑAS FORMULADO CON LA MEZCLA DE LOS
ACEITES ESENCIALES DE *Flourensia polycephala* Dillon (PAUCA)
Y *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (PUNA SALVIA) FRENTE A
Trichophyton rubrum ATCC 28188**

PRESENTADO POR:

Br. BEATRIZ CONDORI GAMARRA

Br. CARLA ANYHELA BERMUDEZ ARAGON

**PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL
DE QUÍMICO FARMACÉUTICO**

ASESORA:

Dra. CARLA DEL CARPIO JIMÉNEZ

CUSCO – PERÚ

2024

INFORME DE ORIGINALIDAD

(Aprobado por Resolución Nro.CU-303-2020-UNSAAC)

El que suscribe, **Asesor** del trabajo de investigación/tesis titulada: EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA INVITRO DEL ESMALTE DE UÑAS FORMULADO CON LA MEZCLA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Flourensia polycephala* Dillon (PAUCA) Y *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (PUNA SALVIA) FRENTE A *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

presentado por: BEATRIZ CONDORJ GAMARRA con DNI Nro.: 71737031 presentado por: CARLA ANYHELA BERMÚDEZ ARAGÓN con DNI Nro.: 73037099 para optar el título profesional/grado académico de QUÍMICO FARMACÉUTICO

Informo que el trabajo de investigación ha sido sometido a revisión por 2 veces, mediante el Software Antiplagio, conforme al Art. 6° del **Reglamento para Uso de Sistema Antiplagio de la UNSAAC** y de la evaluación de originalidad se tiene un porcentaje de 6%.

Evaluación y acciones del reporte de coincidencia para trabajos de investigación conducentes a grado académico o título profesional, tesis

Porcentaje	Evaluación y Acciones	Marque con una (X)
Del 1 al 10%	No se considera plagio.	X
Del 11 al 30 %	Devolver al usuario para las correcciones.	
Mayor a 31%	El responsable de la revisión del documento emite un informe al inmediato jerárquico, quien a su vez eleva el informe a la autoridad académica para que tome las acciones correspondientes. Sin perjuicio de las sanciones administrativas que correspondan de acuerdo a Ley.	

Por tanto, en mi condición de asesor, firmo el presente informe en señal de conformidad y **adjunto** la primera página del reporte del Sistema Antiplagio.

Cusco, 13 de diciembre de 2024

Firma

Post firma Carla del Carpio Jiménez

Nro. de DNI 23945000

ORCID del Asesor 0000 - 0001 - 7487 - 354X

Se adjunta:

1. Reporte generado por el Sistema Antiplagio.
2. Enlace del Reporte Generado por el Sistema Antiplagio: oid: 27259:415623753

Beatriz Condori

TESIS FINAL BEATRIZ CONDORI Y CARLA BERMUDEZ.pdf

 Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco

Detalles del documento

Identificador de la entrega

trn:oid:::27259:415623753

Fecha de entrega

12 dic 2024, 8:16 p.m. GMT-5

Fecha de descarga

12 dic 2024, 8:20 p.m. GMT-5

Nombre de archivo

TESIS FINAL BEATRIZ CONDORI Y CARLA BERMUDEZ.pdf

Tamaño de archivo

5.4 MB

176 Páginas

38,496 Palabras

218,970 Caracteres




6% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe


- ▶ Bibliografía
- ▶ Texto citado
- ▶ Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Fuentes principales

- 5%  Fuentes de Internet
- 1%  Publicaciones
- 3%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alerta de integridad para revisión

-  **Caracteres reemplazados**
46 caracteres sospechosos en N.º de páginas
Las letras son intercambiadas por caracteres similares de otro alfabeto.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

DEDICATORIA

A mi querida madre CELIA, por haber sido mi soporte en este largo camino, que, con su apoyo y amor incondicional, este logro no habría sido posible.

A mis tías, MERCEDES y ELSA, quienes siempre me brindaron los ánimos para no rendirme y cumplir cada una de mis metas permitiéndome llegar hasta aquí.

Anyhela

A mis padres SIMON y ADELA, con demasiado amor y cariño a ellos, porque han dado razón a mi vida, su apoyo incondicional en todo sentido, por el arduo trabajo y sacrificio de todos estos años, todo lo que hoy soy es gracias a ellos.

A mis hermanos ALVARO y ENZO porque son mi motivación para yo ser mejor persona y profesional.

Al Dr. FERNANDO, porque en su momento me apoyo incondicionalmente en la ejecución de esta tesis, no haberme dejado caer en los momentos difíciles y siempre creyó en mí.

Beatriz

AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a Dios por haber sido mi fuerza y guía durante mi formación académica y personal.

A mi familia por siempre inculcarme el valor del esfuerzo y la perseverancia.

A mi asesora Dra. Carla del Carpio Jiménez, mi más sincero agradecimiento y afecto, por el apoyo incondicional en todo momento, la paciencia para guiarnos y la confianza depositada durante la elaboración de esta tesis. A los docentes de los laboratorios de Farmacia Q.F. Giancarlo, de química Ing. Washintong y al Blgo. Víctor Tapia quienes nos brindaron apoyo y sugerencias.

A mi mejor amiga y compañera de tesis, por compartir esta aventura conmigo, por los debates, el apoyo, las noches en vela, la paciencia y las risas que hicieron que este camino sea más llevadero.

Carla Anyhela Bermúdez Aragón

A Dios por bendecirme día a día, guiarme y ser mi fuerza en los momentos más difíciles y permitirme haber llegado hasta aquí.

A toda mi familia por apoyarme en cada etapa de mi vida.

A la Dra. Carla del Carpio Jiménez, nuestra asesora quien dedico su tiempo y esfuerzo de forma incondicional, así como sus conocimientos; además de brindarnos a entera disposición el laboratorio de Tecnología Farmacéutica para la ejecución de esta investigación y cumpla con los objetivos deseados,

Al Q.F. Giancarlo Gutiérrez de la escuela de Farmacia y Bioquímica, al Ing. Washintong de la facultad de ciencias Químicas y al Blgo. Víctor Tapia, docentes de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, quienes nos apoyaron incondicionalmente con equipos de laboratorio, insumos y demás, así como sus conocimientos en su área.

Al Sr. Noe Chávez y su familia, por ayudarnos con sus conocimientos en botánica a la identificación y recolección de las especies vegetales, además de ser parte de mi familia.

A Carla Anyhela, mi compañera de tesis, con quien recorrimos juntas este camino tan importante en nuestras vidas pasando desvelos, preocupaciones y risas hasta la culminación del mismo.

Beatriz Condori Gamarra

INDICE

DEDICATORIA.....	I
AGRADECIMIENTOS	II
INDICE DE TABLAS	VI
INDICE DE FIGURAS	VI
INDICE DE FLUJOGRAMAS	VII
INDICE DE CUADROS	VII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
ABREVIATURAS.....	XI
INTRODUCCION	XII
CAPITULO I	1
GENERALIDADES.....	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	1
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	3
1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	3
1.3.1. Objetivo General.....	3
1.3.2. Objetivos específicos.....	3
1.4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA	4
1.5. HIPÓTESIS.....	5
CAPITULO II	6
MARCO TEORICO CONCEPTUAL.....	6
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	6
2.1.1. Antecedentes internacionales	6
2.1.3. Antecedentes locales	8
2.2. ESTADO DEL ARTE	10
2.3. BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS.....	12
2.3.1. <i>Flourensia polycephala</i> Dillon (Pauca)	12
2.3.2. <i>Lepechinia meyenii</i> Walpers Epling (Puna salvia).....	15
2.3.3. Aceites esenciales.....	20
2.3.4. Onicomycosis	24
2.3.5. Agente etiológico en estudio: <i>Trichophyton rubrum</i>	27
2.3.6. Medios de Cultivo	29
2.3.7. Cepas ATCC	31
2.3.8. Medición de la Actividad Antimicótica	31
2.3.9. Tratamiento en Onicomycosis	33
2.3.10. Aparato ungueal	38

2.3.11. Formas farmacéuticas para la administración ungular	39
2.3.12. Formulación de esmaltes de uñas	41
CAPITULO III	45
MATERIALES Y METODOS	45
3.1. MATERIALES	45
3.1.1. Muestra vegetal	45
3.1.2. Muestra microbiológica	45
3.1.3. Patrón comparativo antimicótico	45
3.1.4. Medio de cultivo	45
3.2. MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO	45
3.2.1. Materiales de campo	45
3.2.2. Materiales de laboratorio	45
3.2.3. Equipos de laboratorio	46
3.2.4. Insumos para la elaboración del esmalte	46
3.2.5. Otros materiales	47
3.3. DISEÑO METODOLÓGICO	47
3.3.1. Tipo de investigación	47
3.3.2. Diseño de la investigación	47
3.4. IDENTIFICACION Y OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES	50
3.4.1. Variables Implicadas	50
3.4.2. Variables no implicadas	61
3.5. PROCEDIMIENTO	66
3.5.1. Recolección de la muestra	66
3.5.2. Selección y secado de la muestra	67
3.5.3. Identificación botánica	67
3.5.4. Determinación de la humedad	67
3.5.5. Determinación del porcentaje de rendimiento	68
3.5.6. Pruebas de solubilidad	68
3.5.7. Determinación de las características organolépticas y fisicoquímicas de los aceites esenciales	69
3.5.8. Determinación de la composición química de los aceites esenciales por cromatografía de gases - espectrometría de masas (CG-SM)	70
3.5.9. Determinación de la actividad antimicótica del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling (Puna salvia) y <i>Flourensia polycephala</i> Dillon (Pauca) sobre <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188, por disco difusión	71
3.5.10. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales por el método de Macrodilución	75
3.5.11. Preformulación del esmalte de uñas	77
3.5.12. Formulación del esmalte de uñas	78

3.5.13. Evaluación In Vitro de la actividad antimicótica del esmalte de uñas por el método de Difusión en agar	80
3.5.14. Caracterización del esmalte de uñas	80
3.6. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	84
3.7. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE DATOS	85
CAPITULO IV	86
ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	86
4.1. DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE <i>Flourensia polycephala</i> Dillon y <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling	86
4.2. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>Flourensia polycephala</i> Dillon y <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling	87
4.3. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES	88
4.4. ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DE LOS ACEITES ESENCIALES	89
4.5. DETERMINACION DE LAS PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES.....	90
4.6. DETERMINACION DE LA COMPOSICION QUIMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES POR EL METODO DE CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE GASES.....	92
4.7. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOTICA IN VITRO POR EL METODO DE DISCO DIFUSION FRENTE A <i>T. rubrum</i>	95
4.7.1. Determinación de la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de <i>Flourensia polycephala</i> Dillon.....	95
4.7.2. Determinación de la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling	99
4.8. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA POR EL METODO DE MACRODILUCION	104
4.8.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de <i>Flourensia polycephala</i> Dillon.....	104
4.8.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling	106
4.9. PREFORMULACIONES DE LOS ESMALTES DE UÑAS	107
4.10. FORMULACION Y ELABORACION DEL ESMALTE DE UÑAS CON LA MEZCLA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE <i>Flourensia polycephala</i> Dillon y <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling	109
4.10.1. Parámetros organolépticos, pH y estabilidad.....	110
4.11. EVALUACION IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOTICA DEL ESMALTE DE UÑAS FRENTE A <i>T. rubrum</i>	111
4.12. CARACTERIZACION DEL ESMALTE DE UÑAS FORMULADO	114
4.12.1. Tiempo de secado	114
4.12.2. Suavidad para fluir.....	115
4.12.3. Modelo de penetración de uña	116

4.12.4. Control microbiológico del esmalte de uñas.....	120
CONCLUSIONES.....	121
RECOMENDACIONES	123
BIBLIOGRAFIA	125
ANEXOS	133

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición química del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling	19
Tabla 2. Grupos funcionales de las moléculas constituyentes de los aceites esenciales.	21
Tabla 3. Categorías de los mohos no dermatofitos en la onicomicosis	25
Tabla 4. Medios utilizados para el cultivo.....	26
Tabla 5. Diseño de Post prueba y Grupo control del aceite esencial de las hojas de <i>Flourensia polycephala</i> Dillon (Pauca).....	48
Tabla 6. Diseño de post prueba y grupo control del aceite esencial de las hojas de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling (Puna salvia).....	49
Tabla 7. Diseño de post prueba y grupo control del esmalte de uñas elaborado con los aceites esenciales.....	50
Tabla 8. Operacionalización de Variables.....	63
Tabla 9. Variables no Implicadas	65
Tabla 10. Solventes para la prueba de solubilidad	68
Tabla 11. Método de Disco Difusión	72
Tabla 12. Concentración del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling (Puna salvia) por disco	73
Tabla 13. Concentración del aceite esencial de <i>Flourensia polycephala</i> Dillon (Pauca) por disco.....	73
Tabla 14. Categoría interpretativa de la zona de inhibición según las directrices del CLSI	75
Tabla 15. Método de Macro dilución en Caldo Sabouraud	76
Tabla 16. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de <i>Flourensia polycephala</i> Dillon (Pauca).....	77
Tabla 17. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling (Puna salvia).....	77
Tabla 18. Especificaciones microbiológicas.....	82

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Flourensia polycephala</i> Dillon (Pauca).....	12
Figura 2. <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling (Puna salvia).....	16
Figura 3. Estructuras de diterpenos aislados de <i>Lepechinia meyenii</i>	17
Figura 4. Características macroscópicas y microscópicas de <i>Trichophyton rubrum</i>	28
Figura 5. Fases de desarrollo de un microorganismo	30
Figura 6. Mecanismo de acción de los antifúngicos que actúan en la vía de síntesis del ergosterol.	34
Figura 7. Partes del aparato ungueal.....	39
Figura 8. Comparación de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esenciales de <i>F. polycephala</i> , frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.....	99

Figura 9. Comparación de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> , frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188 de acuerdo a la concentración.....	104
Figura 10. Comparación de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del esmalte de uñas.....	114
Figura 11. Comparación de los diámetros de los halos de inhibición (mm) en el modelo de penetración de uña frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188	119

INDICE DE FLUJOGRAMAS

Flujograma 1. Elaboración del esmalte de uñas con los aceites esenciales de <i>Flourensia polycephala</i> Dillon y <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling	79
Flujograma 2. Procedimiento de la Investigación.....	83

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Porcentaje de humedad de las hojas de <i>Flourensia polycephala</i> Dillon y <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling	86
Cuadro 2. Determinación del porcentaje de rendimiento de los aceites esenciales	87
Cuadro 3. Características organolépticas de los aceites esenciales	88
Cuadro 4. Propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales	89
Cuadro 5. Grado de solubilidad de los aceites esenciales.....	91
Cuadro 6. Composición química del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling	92
Cuadro 7. Composición Química del aceite esencial de <i>Flourensia polycephala</i> Dillon... ..	93
Cuadro 8. Lectura de los halos de inhibición obtenidos del aceite esencial de <i>Flourensia polycephala</i> Dillon	95
Cuadro 9. Estadísticas descriptivas de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esencial de Pauca, frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.	96
Cuadro 10. Análisis de varianza de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esenciales de Pauca, frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.	97
Cuadro 11. Comparación de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esenciales de Pauca, frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.	98
Cuadro 12. Lectura de los halos de inhibición obtenidos del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling	99
Cuadro 13. Estadísticas descriptivas de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esenciales de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling, frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.....	101
Cuadro 14. Análisis de varianza de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esenciales de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling, frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.	102
Cuadro 15. Comparación de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esenciales de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling, frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188	103
Cuadro 16. Concentración mínima inhibitoria obtenida del aceite esencial de <i>Flourensia polycephala</i> Dillon	105
Cuadro 17. Concentración mínima inhibitoria obtenida del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling	106
Cuadro 18. Preformulaciones del esmalte de uñas	107
Cuadro 19. Características organolépticas y fisicoquímicas de las preformulaciones....	108
Cuadro 20. Formulación del esmalte de uñas ideal	109

Cuadro 21. Características organolépticas y fisicoquímicas del esmalte de uñas.....	110
Cuadro 22. Lectura de halos de inhibición obtenidos del esmalte de uñas	111
Cuadro 23. Estadísticas descriptivas de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del esmalte de uñas con los aceites esenciales de Puna salvia y Pauca frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188	112
Cuadro 24. Análisis de varianza de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del esmalte de uñas con los aceites esenciales de Puna Salvia y Phauka frente a a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188	113
Cuadro 25. Comparación de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del esmalte de uñas con los aceites esenciales de Puna salvia y Pauca frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.....	113
Cuadro 26. Tiempo de secado del esmalte de uñas.....	114
Cuadro 27. Tiempo de la suavidad para fluir del esmalte de uñas	115
Cuadro 28. Halos de inhibición en modelo de penetración de uñas del esmalte.....	116
Cuadro 29. Estadísticas descriptivas de los diámetros de los halos de inhibición (mm) en el modelo de penetración de uña frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.....	117
Cuadro 30. Análisis de varianza de los diámetros de los halos de inhibición (mm) en el modelo de penetración de uña frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188.....	118
Cuadro 31. Comparación de los diámetros de los halos de inhibición (mm) en el modelo de penetración de uña frente a <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188	119
Cuadro 32. Control microbiológico del esmalte de uñas.....	120

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antimicótica in vitro del esmalte de uñas formulado con la mezcla de los aceites esenciales de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) y *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (Puna salvia), frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

La metodología fue de tipo experimental, de diseño cuasiexperimental con enfoque cuantitativo. Se inició con la recolección e identificación de las especies vegetales. Se evaluó las características organolépticas y fisicoquímicas, y se determinó la composición química por CG-EM de los aceites esenciales. Se determinó la actividad antimicótica por el método de disco difusión y el método de macrodilución en caldo, donde se utilizó como control positivo Terbinafina Clorhidrato 0.624ug/ml y como control negativo etanol 96°. Se procedió a formular y elaborar el esmalte de uñas con la mezcla de los aceites esenciales de acuerdo a la CMI hallada para cada uno, donde se evaluó la actividad antimicótica in vitro mediante el método de disco difusión frente al esmalte patrón de ciclopirox 8%, seguidamente se hicieron los análisis de calidad al esmalte elaborado.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling obtuvo mayores halos de inhibición frente a *T. rubrum* a una menor concentración (24.23 mm) en comparación al aceite de *Flourensia polycephala* Dillon (17.33 mm), resultados que se confirmaron con la determinación de la CMI el cual fue de 300ul/ml y de 700ul/ml respectivamente. En base a estos valores se formularon 3 esmaltes de uñas con hidroxipropil quitosano al 5% y aceite esencial al 0.5%, 1%, y 2%; donde se determinó que el esmalte de uñas con aceite esencial al 2% presenta un mejor halo de inhibición (21.18mm). Asimismo, se evaluó las características organolépticas, el pH (5.161), suavidad para fluir (34 s), modelo de penetración en uña (26.70 mm), tiempo de secado (3 min 46 s); y tras el control microbiológico se descarta la presencia de microorganismos.

En conclusión, el esmalte de uñas formulado con la mezcla de los aceites esenciales de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) y *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (Puna salvia), posee actividad antimicótica frente a *T. rubrum*, siendo este una alternativa natural al tratamiento contra dermatofitos

Palabras claves: antimicótica, aceite esencial, pauca, puna salvia, esmalte de uñas, *Trichophyton rubrum*.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the *in vitro* antifungal activity of nail polish formulated with a mixture of essential oils of *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) and *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (Puna salvia), against *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

The methodology was experimental, with a quasi-experimental design and a quantitative approach. It began with the collection and identification of the plant species. The organoleptic and physicochemical characteristics were evaluated, and the chemical composition of the essential oils was determined by GC-MS. The antifungal activity was determined by the disk diffusion method and the broth macrodilution method, where Terbinafine Hydrochloride 0.624ug/ml was used as a positive control and 96° ethanol as a negative control. The nail polish was formulated and produced with the mixture of essential oils according to the MIC found for each one, where the *in vitro* antifungal activity was evaluated using the disk diffusion method against the 8% ciclopirox standard polish, then the quality analyses were carried out on the prepared polish.

According to the results obtained, the essential oil of *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling obtained greater inhibition halos against *T. rubrum* at a lower concentration (24.23 mm) compared to the oil of *Flourensia polycephala* Dillon (17.33 mm), results that were confirmed with the determination of the MIC which was 300ul/ml and 700ul/ml respectively. Based on these values, 3 nail polishes were formulated with 5% hydroxypropyl chitosan and essential oil at 0.5%, 1%, and 2%; where it was determined that nail polish with 2% essential oil has a better inhibition halo (21.18mm). Also, the organoleptic characteristics, pH (5.161), smoothness to flow (34 s), nail penetration model (26.70 mm), drying time (3 min 46 s) were evaluated; and after microbiological control the presence of microorganisms is ruled out.

In conclusion, the nail polish formulated with the mixture of essential oils of *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) and *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (Puna salvia), has antifungal activity against *T. rubrum*, being this a natural alternative to the treatment against dermatophytes

Keywords: antifungal, essential oil, pauca, puna salvia, nail polish, *Trichophyton rubrum*.

ABREVIATURAS

AE	: Aceite esencial
ATCC	: Type Culture Collection American
CMI	: Concentración mínima inhibitoria
FDA	: Food and Drug Administration
GC MS	: Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.
g	: Gramo
uL	: microlitro
CLSI	: The Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	: Dimetilsulfoxido
UFC	: Unidades Formadoras de Colonias
mm	: Milímetro
pH	: potencial de hidrogeniones
HPCH	: hidroxipropilquitosano

INTRODUCCION

A lo largo de los años se ha comprendido la importancia de la permeabilidad de las uñas para los tratamientos tópicos, especialmente en relación al tratamiento de la onicomycosis. Las infecciones por hongos en las uñas de las manos y los pies afectan aproximadamente al 19% de la población mundial y son responsables de aproximadamente el 50% de las enfermedades de las uñas (1).

La terapia tópica es eficaz debido a su naturaleza no invasiva, su capacidad para dirigir el principio activo al sitio de acción, reducir los efectos secundarios sistémicos y mejorar el cumplimiento del paciente. Los avances recientes en la tecnología de administración de ungüesales han llevado a la introducción de esmaltes de uñas antifúngicos (1). Ahora bien, en la búsqueda de alternativas terapéuticas antimicóticas, el uso de aceites esenciales de especies vegetales se ha convertido en una opción prometedora. En el caso de Perú, un país con una rica diversidad de plantas medicinales, el uso de aceites esenciales para tratar las dermatofitosis se ha vuelto cada vez más popular debido a la composición de estos y su capacidad antimicrobiana y antifúngica (2). Los aceites esenciales, son mezclas de sustancias químicas que en su mayoría tienen un bajo peso molecular lo que, en combinación con su lipofilicidad, les permite atravesar las membranas de una manera muy eficiente (3), estudios previos del aceite esencial de *L. meyenii* indica alto contenido en terpenos el cual en mecanismos de acción diferentes y simultáneos ejercerían la actividad antifúngica sobre el microorganismo. En este estudio se llevaron a cromatografía los aceites esenciales de ambas especies para la determinación de compuestos, cuyos principios activos podrían ser decisivos en el control de enfermedades causadas por hongos.

La placa ungueal humana es una estructura mucho más compleja de lo que parece a primera vista. La placa ungueal, aunque delgada, contiene de 80 a 90 capas de células muertas y está compuesta principalmente de queratina; 4/5 - queratina para cabello duro y 1/5 - queratina para pieles suaves; y está principalmente relacionado con la función de las células madre (4). Por ello estos esmaltes requieren de un potenciador de penetración en uña y alcancen la matriz ungueal, propiedades que se han encontrado en los quitosanos y derivados tales como hidroxipropilquitosano, este polímero natural se ha utilizado

en diversos productos cosméticos y farmacéuticos ya que además demostró ser eficaz en el tratamiento de las infecciones fúngicas (5).

El presente trabajo investigó la permeabilidad a través de la placa ungueal humana y con esto la actividad antimicótica a partir de una formulación de esmalte de uñas con la mezcla de dos aceites esenciales (Puna salvia y Pauca) e incluyendo en su formulación el hidroxipropilquitosano; se determinó la composición química de los aceites esenciales; la actividad antifúngica in vitro se llevó a cabo mediante el método de disco difusión para medir la sensibilidad, el método de macrodilución para hallar la CMI respectiva frente a *T. rubrum*, principal causante de onicomycosis. Posterior a la formulación se evaluaron otros parámetros de calidad incluyendo la permeabilidad en uña; con todo ello se evidencio que dicha formulación es una alternativa al tratamiento convencional y representa un avance significativo en la industria farmacéutica empleando productos naturales.

CAPITULO I

GENERALIDADES

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las infecciones por hongos en las uñas, como la onicomycosis, representan una de las patologías más comunes y difíciles de tratar en la población mundial. Entre los agentes causantes de estas infecciones, M. Richardson del libro *Fungal Infection* del 2022 describe hasta un 60% de los casos en Estados Unidos (6). Mientras que la Asociación Británica de Dermatólogos en su publicación del 2023, los dermatofitos son hasta el 85 a 90% de los casos, siendo los más frecuentes *Trichophyton rubrum* seguido de *Trichophyton interdigitale* (7). *Trichophyton rubrum* es uno de los dermatofitos más prevalentes, capaz de infectar las uñas y la piel, ocasionando alteraciones estéticas y, en muchos casos, complicaciones en la salud de los pacientes.

La prevalencia de onicomycosis a nivel mundial no es clara debido al déficit de estudios epidemiológicos actualizados de patologías ungueales, hacia el año 2014 la prevalencia en el Reino Unido fue del 3% de la población, mientras que en Estados Unidos es de 8%, en España hasta un 10% (6,7). En Perú no se cuenta con estudios de prevalencia nacional, pero estudios realizados en el Hospital de Trujillo durante el 2012 al 2022 indicaron una prevalencia de 79.9% por cada 1000 habitantes (8), mientras que la Dirección Regional de Salud Cusco reporto un 36% de casos de dermatofitosis en uñas y dedos entre los años 2012 a 2017. Sin embargo, la incidencia sigue en aumento debido a factores condicionantes en los últimos años como las migraciones, pacientes con patrones autosómicos dominantes susceptibles a infección por dermatofitos, así como otros factores tales como diabetes, la tiña de la piel, psoriasis, inmunodeficiencias, entre otros (9).

En cuanto a la farmacoterapia actual las guías internacionales como la Asociación Británica de Dermatólogos y la Sociedad Dermatológica de Alemania prefieren usar tratamiento combinado, oral-tópico. Pues estos tratamientos convencionales, hoy en día presentan reacciones adversas medicamentosas, interacciones medicamentosas y resistencia a los fármacos, lo que motiva la búsqueda de alternativas terapéuticas más seguras, efectivas, de fácil acceso y bajo costo

En este contexto, los aceites esenciales, conocidos por sus propiedades antimicrobianas, han sido objeto de estudio como posibles agentes terapéuticos frente a infecciones micóticas. La actividad bactericida y antifúngica de estos, están relacionadas con los fenoles y monoterpenos, que a nivel del patógeno tiene una interacción directa en el citoplasma, además por su hidrofobicidad pueden agregarse a los lípidos de la membrana celular fúngica, generando una fuga de iones y otros compuestos en los hongos(10). Los aceites esenciales por estudiar son conocidos en el Cusco por tener uso medicinal muy difundido, sin embargo, ambos carecen de estudios científicos que demuestren su propiedad antifúngica. En el caso de *Flourensia polycephala* Dillon (pauca) no se reportan estudios de su aceite esencial, sin embargo, existe un estudio local acerca de sus extractos etanólico y glicólico donde el autor concluye que esta especie presenta actividad antibacteriana (14); por otro lado, estudios de la especie *Lepechinia meyenii* Walpers Epling (puna salvia) en el Cusco demostraron que el aceite esencial posee componentes activos con actividad antimicrobiana y a nivel nacional algunos estudios precisan que posee actividad anticándida (15). Aunque en el caso específico de las infecciones por dermatofitos aún son limitados los estudios que exploren su eficacia frente a *Trichophyton rubrum*.

El esmalte de uñas, como vehículo tópico para la aplicación de estos aceites esenciales, podría ofrecer una opción innovadora para el tratamiento de las infecciones ungueales, ya que junto a los aminopolisacáridos de quitosano favorecerían una impregnación en las estructuras de queratina y alcancen la matriz ungueal, permitiendo una liberación controlada de los compuestos bioactivos directamente sobre la zona afectada. Sin embargo, existe una falta de evidencia científica que respalde la efectividad de esta combinación de aceites esenciales formulada en un esmalte frente a *T. rubrum*.

Por lo tanto, el problema de investigación que se plantea es determinar si la formulación de un esmalte de uñas que combine los aceites esenciales de *Flourensia polycephala* (pauca) y *Lepechinia meyenii* (puna salvia) presenta actividad antimicótica contra *Trichophyton rubrum* ATCC 28188. Este estudio pretende explorar la viabilidad de esta mezcla como un tratamiento alternativo frente a una de las infecciones fúngicas más comunes, lo que podría contribuir al desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas en el ámbito dermatológico.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Presentará actividad antimicótica el esmalte de uñas formulado con la mezcla de los aceites esenciales de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) y *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (Puna salvia), frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188?

1.3. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1. Objetivo General

Evaluar la actividad antimicótica in vitro del esmalte de uñas formulado con la mezcla de los aceites esenciales *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) y *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (Puna salvia), frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Determinar el porcentaje de humedad y porcentaje de rendimiento de los aceites esenciales de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) y *Lepechinia meyenii* Walpers Epling (Puna salvia).
2. Identificar las características organolépticas, propiedades fisicoquímicas y pruebas de solubilidad de los aceites esenciales de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) y *Lepechinia meyenii* Walpers Epling (Puna salvia).
3. Establecer la composición química de los aceites esenciales de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) y *Lepechinia meyenii* Walpers Epling (Puna salvia), por el método de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG - SM)
4. Determinar la actividad antimicótica in vitro de los aceites esenciales de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) y *Lepechinia meyenii* Walpers Epling (Puna salvia) por el método de difusión de discos frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 y determinar la Concentración Mínima Inhibitoria por el método de macrodilución.
5. Formular un esmalte de uñas con los aceites esenciales de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) y *Lepechinia meyenii* Walpers Epling (Puna salvia)
6. Determinar mediante pruebas in vitro la actividad antimicótica del esmalte de uñas formulado frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

7. Caracterizar el esmalte formulado a través de parámetros organolépticos, pH, estabilidad, microbiológicos, tiempo de secado, suavidad para fluir, y modelo de penetración de uñas.

1.4. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA

Conocimiento

El presente estudio demostró de forma científica la actividad antifúngica del esmalte de uñas formulado con los aceites esenciales de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) y *Lepechinia meyenii* Walpers Epling (Puna salvia) frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, así como repotencia el estudio de plantas nativas de nuestra región, de manera segura y adecuada para el tratamiento de onicomicosis, proponiendo una alternativa terapéutica para enfermedades causadas por hongos tras el aislamiento de los principios activos responsables de sus efectos antimicóticos, generando estudios posteriores en el ámbito clínico.

Aplicabilidad

El presente estudio está enfocado en el desarrollo de nuevas estrategias utilizando el hidroxipropil quitosano para la formulación de un esmalte de uñas que contenga la concentración eficaz de los principios activos naturales de *F. polycephala* y *L. meyenii*. Suponiendo una alternativa terapéutica más económica, eficaz y con menos efectos adversos frente a la onicomicosis.

Hay diversos medicamentos de aplicación ungular en el mercado que no presentan tasas de curación elevadas como los tratamientos sistémicos, este estudio busca la formulación de un esmalte de uñas donde los principios activos estén inmersos en sistemas de transporte mediante el uso de excipientes que aumenten la permeabilidad de la uña, aumentando el tiempo de residencia y permitiendo una liberación sostenida.

Prioridad

El presente trabajo busco la formulación de un esmalte de uñas a partir de moléculas antifúngicas naturales presentes en *F. polycephala* y *L. meyenii*, capaz de disminuir el riesgo de toxicidad que frecuentemente se dan con medicamentos antimicóticos ya que en los tratamientos orales el paciente está expuesto sistémicamente a una gran cantidad de medicamento y solo una pequeña cantidad del activo alcanza el sitio de

acción es decir las uñas. La posibilidad de la aplicación directa al sitio de acción evitando la exposición sistémica reduciría drásticamente la toxicidad intrínseca, manteniendo la eficacia del producto frente a *Trichophyton rubrum*.

1.5. HIPÓTESIS

El esmalte de uñas formulado con la mezcla de los aceites esenciales de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) y *Lepechinia meyenii* Walpers Epling (Puna salvia), presenta actividad antimicótica in vitro frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

CAPITULO II

MARCO TEORICO CONCEPTUAL

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1. Antecedentes internacionales

RAMÍREZ J. (2017) "COMPOSICIÓN QUÍMICA, ANÁLISIS ENANTIOMÉRICO, EVALUACIÓN SENSORIAL AEDA Y ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE LA PLANTA ECUATORIANA *Lepechinia mutica* Benth (LAMIACEAE)". Departamento de Química y Ciencias Exactas, Universidad Técnica Particular de Loja, Ecuador.

Objetivos: Identificar la composición química, así como la actividad antifúngica del aceite esencial de *Lepechinia mutica* Benth

Método: Para la composición y análisis se usó la cromatografía de gases con detector de ionización de llama, con espectrómetro de masas y enantioselectivos. Para la evaluación antifúngica in vitro se utilizó el método de micro dilución en caldo.

Resultados: En el análisis se determinó la caracterización de más de 70 componentes, que representan el 97,3 % de la composición de la muestra. los compuestos más abundantes fueron los hidrocarburos sesquiterpénicos (38,50 %) e hidrocarburos monoterpénicos (30,59 %), por el contrario, el sesquiterpeno oxigenado (16,20 %) y monoterpeno oxigenado (2,10 %) fueron compuestos en menor cantidad. Al comparar el aceite esencial contra los controles positivos (anfotericina B y voriconazol), el aceite esencial mostró una actividad moderada con valores para *C. albicans* (CMI > 9 mg/ml), *M. canis* (2,2 < CMI ≤ 4,5 mg/ml y 4,5 <MCF ≤ 9 mg/ml) y *T. rubrum* (2,2 < CMI ≤ 4,5 mg/ml y CMF > 9 mg/ml)

Conclusiones: Se identificó que la composición fitoquímica del aceite esencial de *Lepechinia mutica* Benth (lamiacea) muestra actividad anti fúngica moderada in vitro entre ellas *Microsporium canis*; y otras cinco cepas fúngicas. (13)

LEVARIO M., (2022) “EFECTO INHIBITORIO DE LOS EXTRACTOS DE HOJAS EN (*Flourensia cernua*) SOBRE HONGOS DE INTERÉS CLÍNICO”. Departamento de Ciencias Químico Biológicas. Universidad Autónoma de ciudad Juárez. Juárez.

Objetivo: Evaluar el efecto inhibitorio de las hojas de *Flourensia cernua* con el extracto acuoso, etanólico y metanólico sobre *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. tropicalis*

Metodología: Se realizó la cuantificación de sensibilidad antifúngica con diferentes formulaciones de extractos de *Floreunsia cernua* en microplacas inoculadas con *Candida albicans*, *glabrata* y *tropicalis*

Resultados: Se halló actividad del extracto metanólico de *F. cernua* sobre las tres cepas (*C. albincas*, *tropicalis* y *glabrata*), el extracto etanólico solo actividad en *C. albicans* y *C. tropicalis*, el extracto acuoso no presento inhibición significativa. Adicionalmente se determinó la presencia de compuestos como flavonoides fenólicos y azúcares reductores en la fitoquímica (14).

SAYAGO JE. (2022) “ACTIVIDAD ANTIDERMATOFÍTICA DE UNA PLANTA NATIVA DEL NOA”. Facultad de Farmacia y Bioquímica Universidad de Buenos Aires. República Argentina.

Objetivo: Determinación in vitro de extractos obtenidos de *Flourensia fiebrigii* sobre el crecimiento de hongos causantes de dermatofitosis en humanos y establecimiento el potencial anti fúngico.

Metodología: Se utilizó partes aéreas de *Florensia fiebrigii* recolectada en Ampimpa (Argentina). Se realizó un extracto etanólico concentrado con su caracterización química y se cuantifico compuestos fenólicos totales por el método Singleton, los flavonoides mediante Woisky y Salatino. Para los ensayos microbiológicos se emplearos 8 cepas de *Trichophyton rubrum*. La cuantificación anti fúngica del extracto se realizó con la determinación de la concentración inhibitoria minia y concentración fungicida mínima usando micro diluciones en micro placas estériles, como control positivo se utilizó fluconazol y ketoconazol.

Resultados: El extracto etanólico de *F. fiebrigii* revela actividad antifúngica frente a aislamiento de *T. rubrum* obtenido de pacientes ambulatorios del Hospital Zeno

Santillan de Tucumán, Argentina, con valores de concentración mínima inhibitoria de 6.25 µg EAG/mL y Concentración mínima antifúngica de 100 µg EAG/mL.

Conclusiones: Se determina que *Florensia fiebriggi* presenta actividad antifúngica in vitro sobre los aislamientos de *T. rubrum*, incluso a cepas resistentes a Fluconazol. Se concluye que existe actividad antifúngica in vitro por tanto es una terapia potencial para tratar dermatofitosis (15).

2.1.2. Antecedentes locales

ACHAHUANCO M., ARAGÓN P. (2015). “**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS ETANOLICO Y GLICÓLICO DE LAS HOJAS DE LA ESPECIE VEGETAL *Flourensia polycephala* M.O. DILLON (phauka) SOBRE CEPAS ATCC DE *Staphylococcus aureus* y *Propionibacterium acnés*, Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE**”. Carrera profesional de Farmacia y Bioquímica. Universidad NACIONAL de San Antonio Abad del Cusco

Objetivo: Estudiar la actividad antibacteriana de *Flourensia polycephala* M. O. Dillion sobre *S. aureus* ATCC 25923 así como *Propionibacterium acnés* ATCC 6919 in vitro.

Metodología y resultados: Se utilizaron extractos Etanólico 70% y Glicólico, mediante el método de pozos excavados se obtuvo una CMI de 0.368mg/25uL y 0.13mg/25uL para *S. aureus* y 0.34mg/25uL y 0.84mg/25uL respectivamente sobre *P. acnes*, Además se estudió la actividad antioxidante por la metodología de la decoloración del radical DPPH usando el patrón ácido ascórbico. Para la relación de la actividad antibacteriana con la antioxidante se realizó correlación de Pearson dando valores de $r=0.983$ y $r=0.987$ para el extracto etanólico en caso del extracto glicolico $r=0.998$ y $r=0.981$.

Conclusión: El extracto etanólico y glicólico de la especie *Flourensia polycephala* tiene actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *P. acnés* in vitro, además existe relación directa entre la actividad antibacteriana y antioxidante (11)

VELAZQUE J., (2019) “**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ESMALTE DE UÑAS ELABORADO USANDO EL ACEITE ESENCIAL DEL *Origanum vulgare* L. (orégano) FRENTE a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188**”. ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA. UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

Objetivo: Evaluar la actividad antimicótica frente a *Trichophyton rubrum* del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. mediante la elaboración de esmalte de uñas

Metodología: Se utilizó el método de destilación por arrastre de vapor para conseguir el aceite esencial, y para determinar la composición fitoquímica del aceite esencial se utilizó el cromatógrafo de gases, con respectivo análisis organoléptico y físico químico. En la determinación de la actividad antimicótica y la concentración mínima inhibitoria se usa el método de difusión en disco. Para el esmalte se realizó la formulación y la correspondiente caracterización físico química y organoléptica; posteriormente su actividad antimicótica con el método mencionado anteriormente, se describió el tiempo de secado, suavidad para fluir y penetración en el lamina ungueal.

Resultados: Se encontró las siguientes sustancias por CG-SM: terpineol, timol, ácido antranílico, éster 15-dimetil-1-1, carvoncrol entre otros. La concentración mínima inhibitoria de aceite esencial al 70% con quitosano al 2% presento el mejor halo de inhibición (9.75mm) frente a *T. rubrum*

Conclusiones: Concluyendo que el esmalte a base de aceite esencial de *Origanum vulgare* L al 70% y quitosano al 2% muestra actividad antimicótica frente a *T. Rubrum*, el uso medicinal complementario al manejo de la onicomycosis se puede dar (17).

MERMA C., (2019) “**EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Clinopodium brevicalyx* (cjuñuca), FORMULACIÓN DE UNA EMULSION TÓPICA Y EVALUACIÓN IN VITRO DE SU ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA SOBRE CEPAS ATCC DE *Trichophyton rubrum***” ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA. FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD. UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

Objetivo: Evaluar la sensibilidad antifúngica del aceite esencial de las hojas de *Clinopodium brevicalyx* (cjuñuca) in vitro, y formular una emulsión tópica

Metodología: El aceite esencial se obtuvo por hidrodestilación. La composición fitoquímica se llevó a cabo por CG-SM. La sensibilidad de *T. Rubrum* se realizó por el método de difusión en disco con control positivo Fluconazol 2 mg / mL y control negativo metanol, y por el método de macrodilución se halló la CMI, se elaboró cuatro formulaciones de emulsiones tópicas a partir de los resultados

Resultados: índice de refracción (1.4625), la densidad (0.9365g/mL), porcentaje de rendimiento (1,98% (p/v)) con solubilidad ligeramente polar y pH en 6.2; en la composición química se encontró los siguiente componentes Isomentona y Mentona (66%) y otros como Pulegona, Linalool, Limoneno y Cinelol . el aceite esencial por el método de difusión en disco tuvo un CMI de 150 uL/ml, y por macrodilución 125ug/ml. La emulsión con concentración al 12.5% tuvo mejor aceptación.

Conclusiones: Tanto la emulsión como el aceite esencial tuvieron actividad antifúngica frente a *T. rubrum* (18).

2.2. ESTADO DEL ARTE

De acuerdo con cifras estadísticas de la OMS, se notó que cerca del 80% de la población global recurre y tiene más confianza en la medicina tradicional. No obstante, son pocos los datos provenientes de estudios científicos responsables de efectuar la valoración de la seguridad y efectividad de los productos y las prácticas de empleo de diversas plantas.

En el presente trabajo de investigación se hará énfasis en dos plantas que son el de "PUNA SALVIA" y "PAUCA". Según evidencia científica y diferentes trabajos de investigación, demuestran que tanto el extracto etanolico y el aceite esencial de PUNA SALVIA presenta hidrocarburos sesquiterpenicos como fracción principal, que serían responsables de presentar efecto antimicrobiano y antifúngico. En cambio, para la especie vegetal de PAUCA no se encontró investigaciones nacionales, existen estudios locales, pero no de aceites esenciales y no se determinó ni la composición química del mismo menos aún actividad sobre *Trichophyton rubrum*.

En el año 2011 URCUHUARANGA demostró la actividad anti cándida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lepechinia meyenii* (WALP) EPI. se realizó por el método de difusión en agar Sabouraud, donde concluye que a diferentes concentraciones del extracto se halla diferencias significativas (18). Asimismo, Tenorio en el año 2018 evalúa la fitoquímica y determina la actividad antimicrobiana del aceite esencial de los órganos aéreos de *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling donde concluye que el aceite esencial posee componentes activos con actividad antimicrobiana (12).

Como se puede ver los estudios demuestran la actividad antimicrobiana y antifúngica de *L. meyenii* pero no sobre la cepa de *Trichophyton rubrum* ni propiamente del aceite esencial.

ACHAHUANCO evalúa la actividad antibacteriana sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Propionibacterium acnés* de *Flourensia polycephala* Dillon donde el extracto etanólico y glicólico de la especie tiene actividad antibacteriana contra estas cepas(11).

Respecto a la formulación de esmalte Existe un estudio local como el de Velázquez (13), utilizó el aceite esencial de *Origanum vulgare*, concluyendo que se puede considerar como complemento a la terapia antimicótica; y que es una alternativa útil contra los dermatofitos. Lo que despierta el interés de estudiar y evaluar nuevos aceites esenciales propios de nuestra región que se asemejarían en su composición por lo que se les atribuiría una actividad antifúngica.

2.3. BASES TEÓRICO CIENTÍFICAS

2.3.1. *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca)

2.3.1.1. Clasificación taxonómica

REINO: Plantae

SUBREINO: Traqueophyta

CLASE: Magnoliopsida

ORDEN: Asterales

FAMILIA: Asteraceae

GENERO: *Flourensia*

ESPECIE: *Flourensia polycephala* Dillon (19)

Figura 1. *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca)



Figura 1. *Flourensia polycephala* Dillon. Fue extraído de “Museo Nacional de Historia Natural – Instituto Smithsonian” (20)

2.3.1.2. Nombres Comunes

“phauka” (21), “pauwka” (19), “phauca” (11)

2.3.1.3. Descripción Botánica de la especie

Las Asteráceas son las familias predominantes del planeta, abarca casi 1.700 géneros y de ellos se dividen en 23.000 a 26.000 spp. en el mundo, excepto en la Antártida (22). En el Perú ocupa el segundo lugar entre las familias más diversas ya que posee cerca de 250 géneros y 1590 especies, generalmente hierbas anuales o bianuales, en menor cantidad arbustos y subarbustos y unas cuantas enredaderas o lianas (23) (22). En cuanto a su hábitat predominan en zonas abiertas y son poco frecuentes en bosques húmedos tropicales (22)

El género *Flourensia* tiene una disposición anfítropical con 20 taxones en América del Sur, su difusión se da en zonas como Perú, Bolivia y Argentina. Entre estos taxones se reconoce *F. macrophylla*, *F. angustifolia*, *F. Polycephala*, *F. peruviana*, ubicadas en su mayoría en la zona sur del Perú (24)

Las especies del género *Flourensia* han cobrado importancia por sus resinas con alto potencial de valor económico (22). Crecen en zonas serranas, son arbustos con capítulos radiados incluye flores de color amarilla, lustrosas debido a la resina que exudan sus ramas y hojas. (23).

2.3.1.4. Antecedentes etnobotánicos y etnofarmacológicos

Las *Flourensias* son comúnmente usadas en la medicina tradicional para aliviar enfermedades gastrointestinales sea como purgantes, así mismo para enfermedades del tracto respiratorio como expectorantes y en enfermedades osteodegenerativas como antirreumáticas. Otros usos que le dan a las resinas y los extractos del género *Flourensia* son para combatir insectos, plagas algas, termitas así mismo como citotóxicos, fitotóxicos y antifúngicos (23)

En el Cusco se usan en heridas (las hojas chancadas), en golpes (macerado de hojas secas con alcohol) y como antirreumáticas en combinación con otras plantas ("ch'iri ch'iri", "yawarchonq'a" y "maich'a") como emplasto (25)

2.3.1.5. Fitoquímica, Farmacología Y Toxicología

Se ha demostrado la existencia de metabolitos secundarios en estudios previos sobre el género *Flourensia* en diversos órganos de las plantas y gran variedad de actividades

biológicas. Barrón e Ibrahim (1996) ponen en manifiesto al género *Flourensia* dentro de Asteráceae como una de las cinco más trascendentales en relación con la acumulación de flavonoides isoprenilados (23). Según el trabajo de Arjona M, se identifican compuestos como sesquiterpenos con núcleo eudesmano, lactonas sesquiterpénicas, flavonoides, benzofuranos y cromenos entre otros que se producen por distintas vías biosintéticas (24). Los principales metabolitos, es decir los terpenos, derivan de la vía del mevalonato, el cual se va a formar de tres moléculas de Acetil-coenzima A proveniente de la biosíntesis de difosfato de dimetilalilo e isopentenil difosfato. Los sesquiterpenoides tipo eudesmano gozan de gran diversidad de acciones biológicas, tales como reguladores de crecimiento de plantas, posibles efectos antitumorales en seres humanos, así como compuestos con actividad insecticida, antifúngica. En el género *Flourensia* se han informado diversos núcleos de sesquiterpenos de los cuales resaltan el bisaboleno con actividad fitotóxica, así mismo resaltan la presencia de lactonas sesquiterpénicas en este género como la carabrona y los eudesmanólidos como septuplinólido e isoalantolactona (24).

En una investigación sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de *Flourensia cernua* la cual pertenece al mismo género de *Flourensia polycephala*, se ha encontrado efecto bactericida sobre cepas de *Mycobacterium tuberculosis* y algunos agentes fitopatógenos, además de actividad fungicida (26).

Además de los efectos benéficos se ha informado que pueden producir toxicidad crónica a nivel hepático, el experimento se dio con ovejas las cuales fueron alimentadas con alfalfa complementadas con *Flourensia cernua*, las cuales no solo sufrieron de hepatotoxicidad, también tres del grupo experimental murieron (24).

Se han informado investigaciones de la actividad antifúngica sobre cultivos comerciales: *Alternaria* sp, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* utilizando *F. cernua*, *F. microphylla* y *F. retinophylla* de los cuales solo *F. cernua* y *F. retinophylla* en 1000 µL inhibieron en su totalidad a *R. solani*, a una concentración de 1500 µL las 3 especies de *Flourensia* inhibieron los 3 patógenos. Según Téllez los extractos de hexano, de dietil éter y de etanol de *F. cernua* poseen actividad antifúngica, antialgal y antitermita, El aceite esencial de la fracción hexano tuvo actividad antifúngica frente a los hongos *Colletotrichum fragariae* Brooks, *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. & Sacc. y *Colletotrichum accutatum* Simmonds (24).

2.3.2. *Lepechinia meyenii* Walpers Epling (Puna salvia)

2.3.2.1. Clasificación taxonómica

Según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988), citado en el trabajo de Calderón (2018), la clasificación sistemática de la planta es la siguiente (27):

REINO: Plantae

SUBREINO: Tracheobionta

DIVISIÓN: Magnoliophyta

CLASE: Magnoliopsida

SUBCLASE: Asteridae

ORDEN: Lamiales

FAMILIA: Lamiaceae

SUBFAMILIA: Nepetoideae

TRIBU: Mentheae

GÉNERO: *Lepechinia* Willd.

ESPECIE: *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling

2.3.2.2. Nombres comunes: “puna Salvia”, “salvia”, “pacha salvia”, “salvia de puna”.

2.3.2.3. Descripción botánica de la especie

Lepechinia meyenii es una especie que predomina en Bolivia, Argentina y Perú, en la cordillera de los andes entre los 3800 y 4200 msnm (28). Es una hierba que forma tejido leñoso ocasionalmente, entre otras características: el tallo es subterráneo cuadrangular de aproximadamente 4 mm de diámetro; las hojas son opuestas de forma ovadas, obtusas y las flores en glomérulos foliosos. Su crecimiento es mayor en lugares secos, llanos y ocasionalmente laderas. En el Perú está difundido en Cusco, Áncash, Huánuco, la Libertad, Puno, principalmente (29)

Figura 2. *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (Puna salvia)



Figura 2. *Lepechinia meyenii* (Walp). Epling. Fue extraído de “Museo Nacional de Historia Natural – Instituto Smithsonian” (30)

2.3.2.4. Antecedentes etnobotánicos y etnofarmacológicos

Según el estudio de Fajardo S. et al., en Cusco específicamente en la provincia de Espinar, *Lepechinia meyenii* es la tercera planta más usada por la población. (29)

Se tiene evidencia de su acción antiespasmódica por lo cual se usa como carminativo en meteorismo y síntomas digestivos. En el tejido epidérmico y muscular se utiliza como hemostático y antiinflamatorio. Asimismo, se ha visto relacionado en el uso contra enfermedades respiratorias, reumatismos y malaria (31).

Estimula las defensas y reduce la sudoración en estados de debilidad. Es antifúngico, antibacteriano y antioxidante (32).

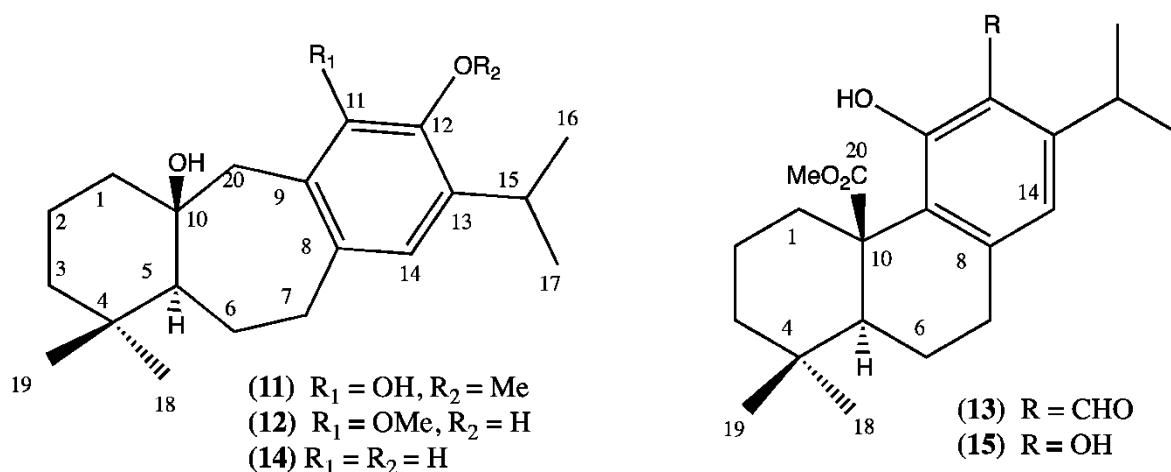
Diferentes investigaciones han demostrado que los aceites esenciales provenientes de plantas tienen efectos antimicrobianos, de ellos se han identificado que ciertos compuestos de estas plantas son efectivos contra bacterias patógenas sobre todo las gram positivas y gram negativas, mohos, levaduras, donde los compuestos compatibles a ser responsables de las propiedades antimicrobianas, así como propiedades aromáticas y antioxidante son los sesquiterpenos, diterpenos y monoterpenos (10).

2.3.2.5. Fitoquímica, Farmacología y Toxicología

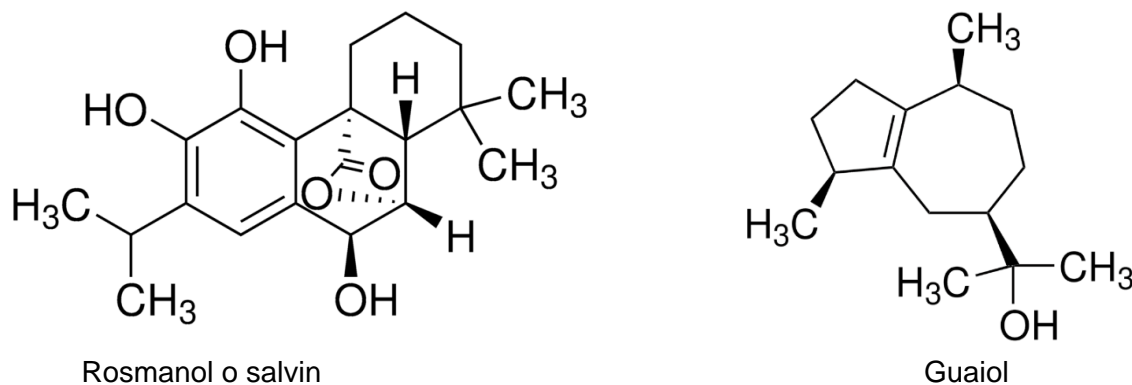
Diferentes estudios fitoquímicos señalan a las especies del género *Lepechinia* como las responsables de la biosíntesis de diterpenos tricíclicos, flavonoides y triterpenos (12)

Lepechinia meyenii según un ensayo fitoquímico del extracto metanólico de la planta sin raíz, presenta en orden de mayor a menor abundancia compuestos fenólicos, flavonoides, triterpenos y/o esteroides, taninos y saponinas. Las plantas tienen varias partes, cada una con propiedades distintas como las partes aéreas de *L. meyenii* de donde se puede aislar derivados de ácido carnosico, abeo-abietatrienos, pisiferol, rosmanol o salvin, salvicanol, isosalvicanol, entre otros y para el aceite esencial se reporta la presencia del sesquiterpeno guaiol (33)

Figura 3. Estructuras de diterpenos aislados de *Lepechinia meyenii*



salvicanol (11), isosalvicanol (12), éster metílico del ácido 12-formil-11-hidroxi-abieta-8,11,13-trien-2-oico (13), pisiferanol (14), y éster metílico del ácido carnosico (15)



Fuente: Recolectado de "Phytochemistry, Bioactivity, and Ethnopharmacology of the Genus *Lepechinia* Willd. (Lamiaceae): A Review(2024) (34)

En el estudio “Perfil químico y actividad antioxidante de aceites esenciales de hierbas aromáticas altoandinas del Perú” se utilizaron las hojas de *L. meyenii* (Walp) Epling, las cuales se recolectaron en Andahuaylas, de la región de Apurímac (33), la **Tabla 1.** muestra la relación de composición química, donde el análisis fitoquímico fue brindado por la cromatografía de gases con detector selectivo de masas se identificó y cuantificó 61 compuestos químicos del aceite esencial mencionado, el hidrocarburo sesquiterpenico fue el de mayor cantidad con porcentaje de 55.73% (33).

Por otra parte, estudios farmacológicos reportan actividad antibacteriana en organismos microscópicos gram positivos como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. faecalis* y *S. beta-hemoliticus*; y gram negativos tales como *Salmonella*, *E. coli*, *P. aeruginosa*; y actividad anfúngica contra *T. mentagrophytes* y *C. albicans*.

El mecanismo de acción documentado de los monoterpenos y sesquiterpenos, con acción antibacteriana y antimicótica, se condiciona a que es volátil e hidrófobo además tiene efectos antimicrobianos posteriores sobre las estructuras celulares. (35).

Tabla 1. Composición química del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling

Número	Nombre del compuesto (NIST08.L)	tR (min)	% en la muestra (áreas relativas)
1	α -Pinoeno	13.38	1.96
2	β -Pinoeno	14.87	1.63
3	β -Mirceno	15.01	0.14
4	o-Cimeno	16.30	0.43
5	D-Limoneno	16.48	6.48
6	Eucaliptol	16.62	2.72
7	β -Linalol	18.55	0.22
8	Acetato de 1-Octen-3-ilo	18.65	0.35
9	Acetato de 2-Octil	19.03	0.25
10	Tujona	19.33	0.62
11	cis-Tagetona	19.98	0.27
12	3-Pinanona	21.24	0.24
13	4-terpineol	21.29	0.20
14	Mirtenol	21.75	0.89
15	Pulegona	23.00	0.38
16	Acetato de trans-Pinocarvilo	24.56	2.44
17	Acetato de Mirtenilo	25.35	11.41
18	α -Cubebeno	26.06	0.68
19	Copaeno	26.94	2.06
20	α -Gurjuneno	27.83	1.34
21	β -Cariofileno	28.21	1.39
22	α -Bergamoteno	28.32	2.19
23	β -Cubebeno	28.43	0.49
24	(Z)- β -Farneseno	28.63	0.42
25	Allo-Aromadendreno	28.70	0.37
26	α -Cariofileno	29.17	0.39
27	Germacreno D	29.29	0.31
28	γ -Muroleno	29.61	0.66
29	(Z,E)-Farneseno	29.75	0.19
30	(E)- β -Farneseno	29.80	0.22
31	α -Farneseno	30.03	3.81
32	Himachala-3(12),4-dieno	30.08	0.25
33	α -Muuroleno	30.16	0.94
34	β -Bisaboleno	30.28	2.42
35	α -Amorfenol	30.63	2.30
36	δ -Cadineno	30.69	3.63
37	Calameneno	30.84	0.80

Fuente: Compuestos obtenidos del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walp) Epling, obtenido de la Revista de Investigación en Ciencias Agronómicas y Veterinaria. (33)

2.3.3. Aceites esenciales

La Comisión de la Farmacopea Europea define los aceites esenciales de forma similar a la de las normas sobre materias primas aromáticas naturales de la Organización Internacional de Normalización ISO 9235:2013, como:

“Producto oloroso, generalmente de composición compleja, obtenido a partir de una materia prima vegetal definido botánicamente, por destilación con vapor, por destilación seca, o por un proceso mecánico apropiado sin calentamiento. Los aceites esenciales normalmente se separan de la fase acuosa mediante un proceso físico que no afecta significativamente a su composición” (36)

Por ende, podemos decir que los aceites esenciales están constituidos por la fracción volátil y semivolátil de los productos del metabolismo secundario de las plantas. Estos compuestos pueden aislarse mediante numerosos métodos de extracción, dando lugar habitualmente a composiciones de elevada complejidad (36)

2.3.3.1. Composición química de los aceites esenciales

Es muy importante precisar que, para una misma categoría taxonómica de la planta de origen, la composición de un aceite esencial puede presentar una gran variabilidad (36)

- Presencia de quimiotipos o “razas químicas”, de naturaleza genética, vinculados a procedencias geográficas específicas, pero también presentes en una misma población.
- Factores abióticos, relacionados con la temperatura, precipitación, luz, naturaleza del suelo, pH, salinidad, etc., variables que afectan a la fisiología de la planta y cuya influencia suele ser más cuantitativa que cualitativa.
- Factores relacionados con la propia evolución de la planta a lo largo de su ciclo vegetativo, así como con el órgano considerado.
- Método de extracción utilizado.

Los aceites esenciales están compuestos principalmente por terpenos, moléculas formadas por unidades de isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno) y concretamente por monoterpenos, sesquiterpenos y diterpenos, constituidos por dos, tres o cuatro unidades de isopreno, respectivamente, así como por sus derivados oxigenados: alcoholes, aldehídos y cetonas, ésteres y epóxidos, denominándose en general

“terpenoides”. También forman parte de los aceites esenciales otros tipos de compuestos como los fenilpropanoides, así como alcoholes, aldehídos y cetonas alifáticas, etc (37)

Tabla 2. Grupos funcionales de las moléculas constituyentes de los aceites esenciales

GRUPO FUNCIONAL	NATURALEZA QUIMICA	EJEMPLO
HIDROCARBUROS	Terpénicos Aromáticos Sesquiterpénicos	Limoneno, α-terpineno Cumeno, ρ-cimeno Trans- βCariofileno
ALDEHIDOS	Monoterpénicos Alifáticos Aromáticos	Citral Nonanal, octadenal Cinamaldehido
ALCOHOLES	Monoterpénicos Alifáticos Sesquiterpénicos Aromáticos	Geraniol, citronelol 3-Decanol Espatuleno, cedrol Alcohol bencílico
FENOLES	Aromáticos	Timol, carvacrol

Fuente: Aceites Esenciales obtenido de la revista de la Universidad de Antioquia (37)

2.3.3.2. Clasificación de los aceites esenciales

a) Por su consistencia

- Fluidos: fluidos volátiles a temperatura ambiente.
- Bálsamos: viscosos, poco volátiles y sufren reacciones de polimerización
- Oleorresinas: líquidos o semisólidos, viscosos, con aromas altamente concentradas (37).

b) Por su origen

- Naturales: no experimentan modificaciones físicas ni químicas luego de su obtención, son muy costosas

- Artificiales: obtenidos por métodos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus compuestos.
 - Sintéticas: Elaborados generalmente por procesos de síntesis química. Son más económicos y se utilizan en la industria de aromatizantes y saborizantes (37).
- c) **Por el punto de vista químico** Pueden clasificarse por la clase de metabolito que lo compone de forma mayoritaria.
- Monoterpenoides: Alto contenido en monoterpenos.
 - Sesquiterpenoides: Alto contenido en sesquiterpenos
 - Fenilpropanoides: Alto contenido en fenilpropanos (37).

2.3.3.3. Distribución y estado natural

Las principales familias donde se hallan los aceites esenciales de las sesenta que las conforman son: Labiadas, Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas, etc. Y están distribuidas dentro de la planta en las hojas, raíces, pericarpio del fruto en las semillas, flores y frutos (37).

Géneros como Ranunculales, Violales y Primulales contienen a los monoterpenoides, y muy poco en Rutales, Cornales, Lamiales y Asterales. A diferencia de los géneros como Magnoliales, Rutales, Cornales y Asterales que contienen a los sesquiterpenoides (37),

2.3.3.4. Extracción de aceites esenciales

a) Destilación por arrastre con vapor de agua

Son utilizados con el objetivo de separar sustancias orgánicas insolubles en agua y poco volátiles, cuya técnica utiliza una cámara inerte y se somete a corrientes de vapor de agua, y un condensador, la muestra se recolecta en un recipiente con agua, lo que conlleva a una separación de fases. Se utiliza específicamente para esencias fluidas en perfumería. Tiene un alto rendimiento y se obtiene aceite puro es muy utilizada en industria (37)

b) Extracción con solventes volátiles

Se utilizan solventes tales como alcohol, cloroformo, entre otros que solubilizan la esencia de la planta, pero al mismo tiempo extraen otras como grasas, ceras y

pigmentos lo que resulta una esencia impura. Es utilizada a nivel de laboratorio por manejar solventes con riesgo de explosión, además de ser costosos (37)

c) Enflorado o enfleurage

Utiliza un aceite vegetal que actúa como vehículo extractor, donde la esencia llega a solubilizarse. Posterior a ello se hace uso de medios físico químicos para separarlos. Este método es empleado para obtener esencias florales. Es costoso y posee un rendimiento bajo (37)

d) Extracción con fluidos supercríticos

Por este método se extrae componentes no volátiles, lo que lo hace no muy útil. Emplea una cámara de acero inoxidable que contiene la muestra vegetal, en ella circula un líquido supercrítico (CO₂) que solubiliza y arrastra la esencia, este líquido luego es eliminado por descompresión sucesiva para luego obtener la esencia pura. Presenta muchas ventajas tanto en la manipulación, porcentaje de rendimiento alto y el producto final llega a no alterarse químicamente; pero el equipo que se emplea es costoso (37).

2.3.3.5. Mecanismo de acción de los aceites esenciales contra microorganismos

El mecanismo de acción depende del tipo de microorganismo y fundamentalmente está relacionada a la membrana y pared celular de este.

Para los hongos, el objetivo es la destrucción de la pared celular y la membrana del citoplasma para su coagulación

Varios autores atribuyen modos de acción específicos para determinados metabolitos de las plantas sobre los microorganismos; así pues, Bruneton indica para flavonoides y fenoles, un mecanismo donde se inhibe la síntesis de ADN, por su capacidad de inserción en la membrana celular, precipitando las proteínas protoplasmáticas las desnaturalizan y actúan como venenos de estas, siendo esta su explicación para su acción antimicrobiana (38).

Por su parte Miranda, destaca las posibles interacciones farmacodinámicas de sinergia y adición que existe entre los flavonoides, triterpenos, lactonas

sesquiterpénicas y cumarinas las cuales formarían una molécula compleja que inhibiría el desarrollo de las bacterias (39).

Con respecto a taninos, Córdova, señala que posee acción astringente, puesto que este metabolito se combina con proteínas de la piel y mucosa para formar un compuesto insoluble, así los microorganismos no llegan a desarrollarse (40).

Mientras que, para la acción antifúngica, se resalta los grupos funcionales de los metabolitos (carácter lipofílico e hidrofílico). Por ejemplo, los terpenos son agentes liposubles, que influye desfavorablemente en la actividad de la enzima catalizadora en la membrana, otros componentes de los aceites esenciales actúan como desacopladores, interfiriendo en la translocación de protones sobre membranas y en consecuencia inhiben la fosforilación del ADP (38)

2.3.4. Onicomycosis

Es una infección fúngica crónica de la uña del pie o de la mano causada por dermatofitos, no dermatofitos y levaduras (41). Alrededor del 90% de las onicomycosis en uñas de los pies y el 75% de las uñas de las manos son provocadas por *T. mentagrophytes* y *T. rubrum* (42). Las manifestaciones clínicas se pueden presentar tanto la lámina ungueal, la matriz ungueal y el lecho ungueal de la uña e incluye la hiperqueratosis subungueal, decoloración de la uña, onicauxis y onicolisis (42),

2.3.4.1. Epidemiología

Aproximadamente el 5,5% de la población mundial padece de onicomycosis. Es más común en adultos que en niños y va aumentando con la edad (42). Es así que la mayor incidencia de la onicomycosis está determinada por la edad, el clima, la ocupación, la frecuencia de viajes, participación de deportes, piscinas públicas y calzado oclusivo así mismo por enfermedades como el VIH, diabetes, o por terapia inmunosupresora.

2.3.4.2. Etiología

Los agentes causales más frecuentes de la onicomycosis son los dermatofitos, la invasión de la placa ungueal por estos se llama *Tinea unguium* donde el agente causal más común es *T. rubrum* (7)

Los mohos no dermatofitos (NDM) representan el 1,5-6% de las onicomicosis afectando en su mayoría las uñas de los pies que de las manos. Se dividen en 2 categorías (43):

Tabla 3. Categorías de los mohos no dermatofitos en la onicomicosis

Categorías de los NDM en la onicomicosis	Ejemplos
Agentes etiológicos	<i>Scytalidium dimidiatum</i> y <i>Scytalidium hyalinum</i>
Agentes contaminantes (oportunistas)	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i> , <i>Aspergillus sydowii</i> y <i>Onychocola canadensis</i>

Fuente: Leung AK. Tinea pedis: Drugs Context. Reino Unido; (2023)

En cuanto a las levaduras, *Cándida albicans* representa el 70% de los casos y se manifiesta más en personas con inmunidad disminuida o defectuosa consecuencia del envejecimiento, inmunosupresión, infección por VIH, enfermedades vasculares y antibióticos de amplio espectro (43).

2.3.4.3. Complicaciones

Puede servir de reservorio de la *Tinea pedis*, *Tinea corporis* y *Tinea cruris*; en personas inmunocomprometidas y los diabéticos puede haber riesgo de infecciones bacterianas como la celulitis y la paroniquia. La onicomicosis puede causar molestias al caminar, estar de pie debido al dolor, parestesia y deformidades de las uñas causando dificultades al recortar las placas ungueales gruesas y al calzar los zapatos (42).

2.3.4.4. Recolección de muestras

Las muestras de uñas de las manos y de los pies son separadas, se obtienen cuando el paciente no ha tomado ningún medicamento antimicótico o aplicado algún medicamento tópico antifúngico durante 2-4 semanas. Los recortes deben ser diminutos manteniéndolos en medios sin humedad para evitar la propagación de esporas fúngicas o bacterianas, se deben procesar máximo en una semana. Debe limpiarse con alcohol toda la unidad ungueal. Se retira la lámina ungueal onicolítica con un cortaúñas y se realiza un raspado con bisturí del lecho ungueal

hiperqueratosico. El muestreo de la lámina ungueal distal se debe evitar ya que contiene contaminantes que ocultan el desarrollo de hongos patógenos (43).

2.3.4.5. Métodos de Diagnostico

Microscopia directa

En una solución de KOH al 10-30% o NaOH combinado con glicerol al 5% se emulsionan los lípidos de la muestra para luego examinarse con un aumento de 10x y seguidamente de 40x, en ella se buscan hifas fúngicas, artrosporas o formas de levaduras. La microscopia directa no identifica al hongo en específico, solo establece la presencia o ausencia de hongos (43)

Cultivo

Aunque la microscopia directa es negativa se debe enviar la mitad de la muestra para cultivo. (43)

Tabla 4. Medios utilizados para el cultivo

Medio primario: Contienen cicloheximida que inhiben los NDM y las bacterias	DTM Mycocell (BBL) Micobioticos (DIFCO)
Medio Secundario: Libres de cicloheximida, permiten el aislamiento de NDM, se pueden agregar antibióticos para eliminar la contaminación bacteriana Las muestras se incuban a 25-30 °C	Agar glucosa Sabouraud (SGA) Medio Ovgall de Littman Agar papa dextrosa (PDA)

Fuente: Leung AK. Tinea pedis: Drugs Context. Reino Unido; (2023)

2.3.4.6. Histopatología

Se utiliza cuando el KOH y el cultivo son negativos en pacientes con sospecha de onicomicosis. Para el análisis histopatológico se utiliza la tinción con ácido peryódico de Schiff (PAS) el cual tiñe el glucógeno y las mucoproteínas en la pared celular fúngica (43).

2.3.5. Agente etiológico en estudio: *Trichophyton rubrum*

Trichophyton rubrum es el dermatofito más frecuente en la onicomicosis. En una revisión de estudios multinacionales de prevalencia en hospitales, en los que se encontraron dermatofitos en el 65 % de los casos de onicomicosis (incluido el 82 % de los casos en América del Norte), la infección por *T. rubrum* fue la más común y representó aproximadamente el 45 % de las infecciones (44).

2.3.5.1. Patogenia

La patogénesis de la dermatofitosis profunda del tipo "granuloma de Majocchi" se basa en la identificación de tejido "extraño" a nivel dérmico, subproducto del daño de los folículos pilosos (queratina, cabello), lo que puede explicar el importante constituyente inflamatorio, más al contrario en pacientes con inmunodeficiencias, se favorecería la propagación incluso a nivel linfático y hemático de estos hongos.

T. rubrum actúa invadiendo la capa más externa de la epidermis a través del estrato corneo, degrada la queratina y segrega y produce enzimas proteolíticas altamente virulentas (44)

2.3.5.2. Posición taxonómica

Phylum: Ascomycota

Clase: Euecomycetes

Orden: Onygenales

Familia: Arthrodermatacea

Género: *Trichophyton*

Especie: *T. rubrum* (Malmsten, 1845)

Otros nombres: *Trichophyton megninii*, *Trichophyton purpureum*, *Trichophyton vinosum* (45)

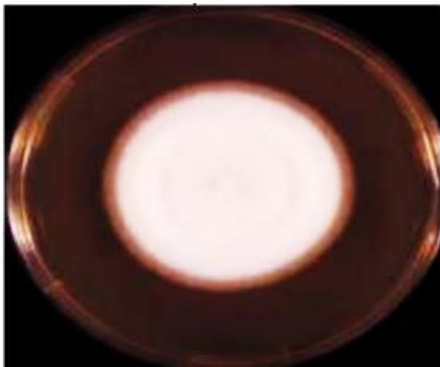
2.3.5.3. Características morfológicas

Son hongos filamentosos que poseen microconidios piriformes con escasa cantidad de macroconidios, con tabiques, de formas irregulares, pared fina y lisa, al final de la hifa. Las Clamidosporas intercalares se encuentran en abundancia, con existencia de hifas en raqueta y sin filamentos espirales (45)

Características macroscópicas: Crece en agar Sabouraud y también crece en el medio selectivo de Taplin. Hay una variedad vellosa o aterciopelada, blanca, seca, y en algunas ocasiones con micelio color rosa. En la variedad granulosa, la colonia es pulverulenta, blanca o blanca-amarillenta. El reverso de la colonia muestra un pigmento rojo o purpura (45)

Características microscópicas: Con abundantes hifas delgadas, tabicadas, con abundantes microconidias o microaleuroconidios (sobre todo en la variedad gránulos). Las microconidias son pocas y ovaladas, están dispuestas lateralmente en la hifa. Las macroconidias son alargadas y de paredes delgadas de 4 a 10 septos; las formas granulosas tienen muchas microconidias (45)

Figura 4. Características macroscópicas y microscópicas de *Trichophyton rubrum*



Macroscopía de *Trichophyton rubrum* creciendo en Agar Sabouraud Dextrosa después de 14 días de incubación colonias blancas algodonosas/esponjosas.



Microscopía de fenotipos blancos de *T. rubrum* ($\times 400$), que muestran micelio hialino normal, septado y ramificado, macroconidios y microconidios ($\times 400$)

Fuente: Estrada. Fungal infections, s.f. (45)

2.3.5.4. Manifestaciones Clínicas

Provoca *Tinea pedis*, *Tinea corporis*, y *Tinea unguium*. La lesión se halla inflamada en la periferia y descolorida en el centro. Los cambios de cabello "in vivo" son de naturaleza ectotrix (45).

2.3.5.5. Identificación

El examen microscópico preparado a partir del cultivo mostró microconidias alargadas en ambos lados del micelio. En la hifa se observó clamidosporas y cuerpos en raqueta. El examen de ureasa resulta positivo. Produce pigmentación de color rojo. Para la

diferenciación con el *Trichophyton mentagrophytes* se realiza el examen del anzuelo con pelos, donde en ambas especies se produce órganos de perforación (45).

2.3.6. Medios de Cultivo

Son medios donde se desarrollará el hongo el cual tiene que tener condiciones y componentes necesarios y óptimos, muchos incluyen derivados de fuentes naturales como peptona, caseína hidrolizada, extracto de levadura, etc.

Las condiciones básicas para el desarrollo de fúngicos de interés medico son: ambientes aerobios, temperaturas de 22 a 37 °C, medios de cultivos nitrogenados y carbohidratados y un pH en el intervalo de 6.0 y 6.5, concentraciones de agar que varía de 15 a 20 g/L. No es necesario la adición de peptona y el agua común es de preferencia ya que posee elementos traza (46)

2.3.6.1. Cultivo de *Trichophyton rubrum*

El ideal para este tipo de hongo el agar Sabouraud con cloruro de sodio al 5%, otros que se pueden usar son: agar Littman Oxgall, agar peptona 1%, medio de urea de Christensen. Se estudiaron dos cepas diferentes, una granular, que forma colonias planas carece de micelio aéreo; la otra más común es la aterciopelada que posee micelio aéreo algodonoso de color blanco.

La pigmentación suele estar presente en colores que van desde un rosa, amarillo, marrón hasta un violeta, como también no tenerla. Se distingue al *T. rubrum* gracias a que produce un pigmento rojo en agar dextrosa-maíz y forma un halo verde en el medio de Littman. Cultivos donde se incluya extracto de papa produce pigmento rojo vino para *Trichophyton rubrum* mientras que para *Trychophyton metagrophytes* no. (47)

2.3.6.2. Crecimiento y reproducción micótica

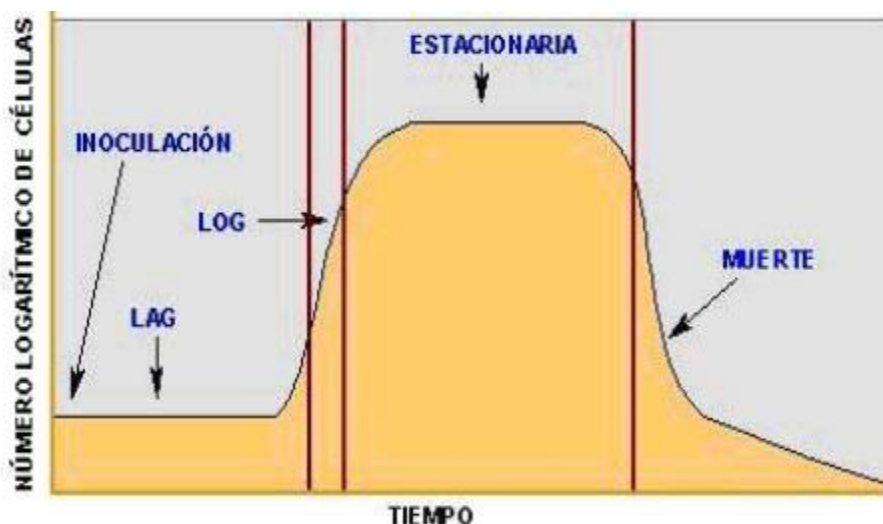
La reproducción en hongos es asexual o sexual (esporas), la más común es la reproducción asexual también conocida con el término de anamórfica, donde los nuevos hongos se dividen por mitosis y son idénticos genéticamente al progenitor. Por su parte los hongos filamentosos se reproducen al fragmentarse las hifas o formando estructuras sofisticadas llamadas células conidiógenas (45).

Crecimiento: La potencialidad depende de la composición y condiciones del ambiente del medio de cultivo de hongos, el crecimiento se mide con un incremento de masa celular o en el incremento de número de células.

La curva peso seco versus tiempo presenta diferentes fases como:

- a) Fase lag o retardada: En este caso durante un tiempo no hay cambios debido a que las células en el nuevo medio necesitan enzimas y coenzimas, las células individualmente incrementan en tamaño, se vuelven más activas y biosintetizan protoplasma.
- b) Fase logarítmica o exponencial: En esta fase la velocidad del crecimiento y el acumulo de micelio en peso seco son máximos. Son casi uniformes en cuanto a características fisiológicas la actividad metabólica, población y la composición.
- c) Fase estacionaria: Implica el momento en que se suspende el crecimiento de la fase exponencial paulatinamente debido al decaimiento de los nutrientes y al acumulo de subproductos tóxicos.
- d) Fase de muerte: el acumulo de subproductos tóxicos en concentraciones inhibitorias y el agotamiento de nutrientes para el crecimiento fúngico producen la autólisis del hongo (45).

Figura 5. Fases de desarrollo de un microorganismo



Fuente: Estrada, Micología General (45)

2.3.7. Cepas ATCC

Las cepas Estándar de Control de calidad, garantizan que el microorganismo en el cultivo, mantenga sus características morfológicas, fisiológicas, típicas y que sean reproducibles y el método de diagnóstico pueda ser fiable para la validación de un proceso en el laboratorio. (48)

Algunos ejemplos de cepas son: American Type Culture Collection (ATCC), la National Collection of Industrial Bacteria- Survey (NCIC), Japanese Federation of Culture Collection of Microorganism (JFCC), Colección Nacional – Lille (CCTM), entre otras de interés clínico (48).

Las cepas ATCC por sus siglas en inglés *American Type Culture Collection*, son una de las colecciones más importantes a nivel mundial. Se usan como control en disciplinas farmacéuticas, alimenticias cosméticas, clínicas y ambientales. Dichas cepas garantizan la autenticidad del microorganismo debido a las características fenotípicas y genotípicas, lo que hace confiables el uso de productos comerciales o generados en laboratorio (48)

2.3.8. Medición de la Actividad Antimicótica

Las pruebas con agentes antibacterianos son parecidas en cuanto a diseño suministrando una medida cuantificable de la actividad de Lo ideal de los métodos de sensibilidad antifúngica in vitro, es que correlacionen con la actividad in vivo prediciendo lo que pueda surgir con la terapia, que la actividad relativa entre dos o más antifúngicos se pueda medir, monitorizar la resistencia, descubrir nuevos agentes terapéuticos y su posible potencial. La sensibilidad antimicótica se mide por pruebas ya conocidas como las pruebas de microdilución y macrodilución en caldo, dilución en agar y el método de Kirby Bauer en disco difusión. Recientemente se evaluó métodos como el E-test que comprende una tira con concentración degradante de antifúngico de difusión en agar, y el Test de microdilución colorimétrica

2.3.8.1. Método de difusión en agar

El método consiste en inocular a los microorganismos en la superficie de la placa de agar, agregando los discos empapados con una concentración específica del antifúngico. Las placas se incuban por 18 horas entre los 35 °C a 37 °C. Mientras la incubación se realiza, se difunde el antibiótico radialmente del disco a hacia el resto

del agar, por lo que va a disminuir la concentración a medida que se expande en el agar.

Al pasar un tiempo en el medio, la cantidad del antifúngico o formulación es incapaz de inhibir al germen por lo que termina de avanzar. Por tanto, se puede hallar el diámetro de área de inhibición alrededor del disco y se categoriza como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) de acuerdo a las guías establecidas a nivel internacional. Estos diámetros se les conocen como zonas de inhibición, los cuales son resultados cuantitativos mientras que su categorización son resultados cualitativos (49)

Actualmente se utiliza técnicas como la e-test (AB Biodisk) la cual permite hallazgos más precisos y cuantitativos de la concentración mínima inhibitoria en el método de difusión en agar. Este método se basa en la constante difusión de gradiente de concentración de formulación antimicrobiana procedente de la tira plástica hacia el agar. El método al comparar con las técnicas en caldo o agar de susceptibilidad antibiótica es superior. La flexibilidad de este test lo hace reproducible en un amplio número de pruebas de susceptibilidad antibióticas que incluye pruebas micóticas

2.3.8.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La concentración inhibitoria mínima (CIM) de un agente antimicrobiano es la mínima concentración del agente antimicrobiano que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada en el sistema de prueba. Determinamos la concentración en el laboratorio incubando una cantidad conocida de bacterias con diluciones definidas del agente antimicrobiano. Utilizando los criterios de interpretación del NCCLS los resultados son interpretados como susceptible, intermedio o resistente. Las pruebas de la CIM pueden ser realizadas usando como medios de cultivo en caldo o agar, pero la microdilución en caldo es el método más utilizado en los laboratorios clínicos

Dilución en caldo

Se realiza mediante macrodilución o microdilución a partir de un agente fúngico estándar o diluciones dobles progresivas del agente antimicrobiano o antifúngico. Tras el periodo de incubación se realizan cultivos en placas consiguientemente se calcula la Concentración Mínima Inhibitoria y se compara con un control negativo y positivo

El método de dilución en caldo considera la presencia o ausencia del agente microbiano o fúngico en un caldo con presencia de grado de concentración de antimicrobiano o antifúngico. En la primera evaluación se visualiza si los pocillo o tubos presentan turbidez, si se usan tubos de ensayo serán macrodiluciones, en caso sean placas de multipocullo serán microdiluciones. Según estudios se recomienda usar Mueller-Hilton el cual permite agregar suplementos, entre otras características tener un pH entre 7.2 a 7.4 ajustado con la siguiente formula: Ca^{2+} (20-25 mg/l) y Mg^{2+} (10-12.5 mg/l) (50)

2.3.9. Tratamiento en Onicomycosis

En la onicomycosis, el tratamiento farmacológico tiene que poseer propiedades específicas como una penetración efectiva, amplio espectro en las uñas, pocos efectos adversos y en general debe ser efectivo.

En la actualidad estudios científicos demuestran que el tratamiento combinado es decir tópico y oral incrementan las tasas de curación, sin embargo, dependiendo al grado de infección se pueden usar una sola terapia. Existen también tratamientos basados en dispositivos (51).

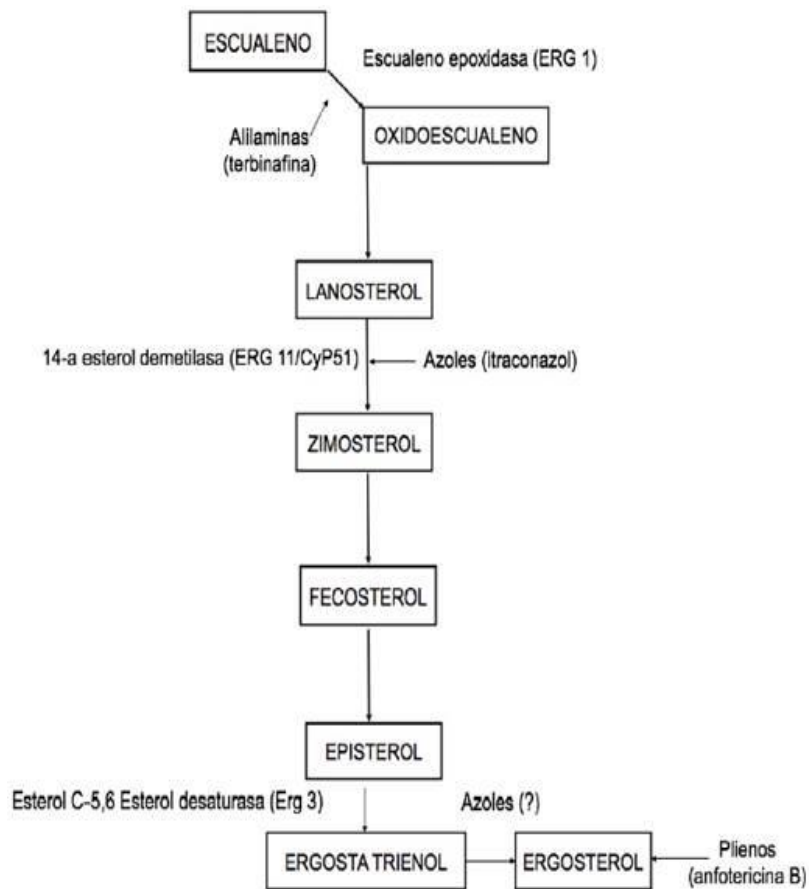
La terbinafina es el fármaco de elección para infecciones causadas por *Trichophyton rubrum*, ya que también no produce significativas reacciones adversas. Cuando la infección es grave se utilizan antimicóticos tales como anfotericina B, algunos azoles, fluocitosina que estos si producen más efectos adversos e interacciones farmacológicas (51).

Los antimicóticos comunes utilizados en forma tópica son el esmalte de uñas el ciclopirox 8%, amorolfina 5%, terbinafina 10%, estos son ineficaces en infecciones avanzadas y graves si se utilizan solas (51).

2.3.9.1. Mecanismo de acción general de los antimicóticos

Los fármacos antimicóticos inhiben la síntesis de ergosterol que es componente de la membrana celular fúngica. Dependiendo al tipo de antifúngico estos actúan en diferentes etapas de la síntesis. Por ejemplo, antimicóticos polienos alteran la permeabilidad de la membrana interactuando con el ergosterol; por su parte imidazoles y triazoles inhiben la síntesis de ergosterol al afectar el sistema citocromo P450. En el caso de terbinafina, este afecta epoxidando al escualeno (52).

Figura 6. Mecanismo de acción de los antifúngicos que actúan en la vía de síntesis del ergosterol.



Fuente. López, Karina. Mecanismos de resistencia antifúngica de los azoles (2016)

2.3.9.2. Clasificación

La clasificación de los agentes antifúngicos podría ser por su estructura química (polienos, azoles, alilaminas, lipopéptidos, morfolina, derivados de piridona, benzofurano, tiocarbamato, aceites esenciales, etc.), por su origen (sustancias producidas por los organismos vivos o químico derivado). Por su espectro de acción (espectro amplio o limitado) por su mecanismo de acción (fungistático o fungicida) o debido a la vía de administración o el empleo en el anfitrión y por su toxicidad y la selectividad de su acción.

2.3.9.3. Descripción de Antimicóticos representativos y usados en el presente estudio

a) Azoles

Desde la aparición de estos fármacos (1978) la terapia de la micosis ha evolucionado, ya que estos son de espectro amplio, además se redujeron las duraciones de tratamiento y frecuencia de administración (53).

Mecanismo de acción de azoles

Alteran la síntesis de ergosterol de la membrana fúngica, inhibiendo la monooxidasa del citocromo P450 (esterol 14-alfa-desmetilasa), en efecto se acumula 14 – metilesterol, estos rompen la unión estrecha de fosfolípidos, que afecta las funciones de las enzimas de membrana, inhiben el crecimiento micótico (53)

- Fluconazol

Farmacocinética: Al ser un bis-triazol fluorado su administración por vía oral e intravenosa, en cuando a la absorción las concentraciones plasmáticas son las mismas, no se ve alterada la biodisponibilidad por alimentos ni por la acidez del estómago. La distribución llega bien a los diferentes compartimentos. En líquido cefalorraquídeo se encontró concentraciones del 50 al 90% de la plasmática. Las concentraciones en saliva, el esputo, las uñas y secreciones vaginales son las mismas que las plasmáticas. Tiene una semivida de eliminación de 25 horas aproximadamente, sin cambios en la orina (53)

Indicaciones y posología:

En pacientes inmunosuprimidos o normales:

- meningitis criptocócica
- candidiasis vaginal
- Candidiasis de la piel
- Candidiasis faríngea
- Tiña de uñas
- Tiña del cuerpo
- Tiña inguinal

La dosis depende a la indicación, en adultos es entre 100 a 400 mg diarios, en niños de 1 a 6 mg/kg. Además, se utiliza como profilaxis en pacientes con trasplantes de médula ósea.

Onicomicosis: 150 mg una vez por semana, suele requerir 3 a 6 meses en manos y de 6 a 12 meses en pies.

Reacciones adversas:

- Digestivas: frecuentes (náuseas, diarrea, cefalea y dolor abdominal), estreñimiento
- Dermatológicas: frecuentes (erupciones cutáneas)
- Hepáticas: frecuentes (aumento de transaminasas, fosfatasa alcalina); raras (hepatotoxicidad, insuficiencia hepática)

No es recomendable en embarazo ni lactancia (53)

b) Alilaminas

Este grupo de antimicóticos inhiben la síntesis de ergosterol sobre la enzima escualeno peroxidasa, además la acumulación de esta enzima aumenta la permeabilidad de la membrana fúngica lo que produce su muerte (54)

- Terbinafina

Está indicado por vía oral y tópica, principalmente en infecciones dermatofíticas como tiña de las uñas, tiña del cuerpo, tiña inguinal, tiña del cuero cabelludo (54)

Posología: En adultos la dosis es de 250 mg/24h y en niños no recomendado.

La duración de tratamiento de un paciente a otro varia, se prolonga a lo largo de días después de la desaparición de síntomas, va de 2 a 4 semanas generalmente.

En la tiña de uñas, suele requerir de 6 semanas en manos a 12 semanas en pies

Farmacocinética: En cuanto a la absorción alcanza altas concentraciones en plasma a las 2 horas siguientes a su administración debido a que es una molécula muy lipofílica, la biodisponibilidad es ligeramente afectada por la comida y pH del medio. La terbinafina es altamente liposoluble. Difunde bien sobre la dermis, alcanza concentraciones altas en folículos pilosos, pelo y tejido adiposo. Se ha observado que existen depósitos en uñas, lo que protegerían de recaídas. Su metabolización es en hígado, se excreta fundamentalmente por la orina la vida media de eliminación es de 17 horas (54).

Reacciones adversas: No presenta interacciones farmacológicas significativas

- Digestivas: muy frecuentes, náuseas, sensación de plenitud gástrica, dispepsia, dolor abdominal, diarrea.
- Dermatológicas: muy frecuentes, erupciones cutáneas, urticaria, muy raro reacciones de foto sensibilidad.
- Hepáticas: raras, insuficiencia hepática y hepatitis aguda (54)

En la administración por vía tópica, las reacciones adversas son inferiores y se observaron irritación, sequedad, quemazón eritema a nivel local. La dosis y frecuencia con la crema 1% es de 1 vez por día de una a dos semanas en tiña del cuerpo, inguinal y candidiasis; y de dos a cuatro veces al día para tiña de uñas (54)

c) Otros Compuestos

- Ciclopirox

El ciclopirox es un derivado de la hidroxipiridona con actividad antifúngica de amplio espectro contra *T. rubrum*, *S. brevicaulis* y especies de *Cándida*. El ciclopirox inhibe los procesos enzimáticos dependientes de metales, incluida la absorción de nutrientes, la producción de energía celular y la degradación del peróxido intracelular tóxico.

La duración recomendada del tratamiento es de hasta 24 semanas en las uñas de las manos y de hasta 48 semanas en las uñas de los pies. El eritema periungueal y del pliegue ungueal son los efectos secundarios más comunes (7)

- Amorolfina

La amorolfina pertenece al grupo de las morfolininas de fármacos antimicóticos sintéticos y exhibe actividad fungistática y fungicida de amplio espectro. Inhibe las enzimas delta 14 reductasa y delta 8 y delta 7 isomerasa en la vía biosintética del ergosterol y es fungicida contra *C. albicans* y *T. mentagrophytes*. Está disponible en forma de laca al 5% y se aplica a la uña afectada una o dos veces por semana durante 6 a 12 meses, después de eliminar la mayor cantidad posible de áreas enfermas de la uña mediante un limado suave. Persiste en la uña durante 14 días una vez finalizado el tratamiento. Se ha demostrado que la laca de uñas de amorolfina es eficaz en alrededor del 50% de los casos de onicomycosis distal de las uñas de manos y pies (7)

2.3.10. Aparato ungueal

Las uñas son láminas translúcidas compuestas de queratina dura, que protegen las superficies superior y terminal de cada uno de los dedos de la mano y del pie. Las láminas están situadas sobre un lecho ungueal, al cual aparentemente se hallan fundidas, excepto en la terminación distal o extrema, donde existe un borde libre. En la terminación cercana o proximal es visible una lúnula más clara, y el borde posterior está ligeramente solapado por una zona estrecha de capa córnea de la epidermis, que se conoce como cutícula

La lámina está constituida por capas compactas y adheridas de células planas que han perdido su núcleo. Las células contienen queratina dura, con un elevado contenido de azufre, principalmente en forma de cisteína, que constituye aproximadamente el 9-12 por 100 del peso de la uña. Las fibrillas de queratina están orientadas paralelamente a la superficie de la uña de un lado a otro. Existe una diferenciación natural entre la uña dorsal, más dura, y la uña intermedia, más flexible. La uña contiene aproximadamente un 7-12 por 100 de humedad y un 0,15-0,76 por 100 de grasa en adultos, y un 1,38 por 100 en bebés. El calcio constituye aproximadamente el 0,02-0,04 por 100 del peso, y no contribuye a su dureza. Incluso esta cantidad puede proceder de su entorno. Se han detectado trazas de otros elementos y se han medido en recortes de uñas. La matriz y el lecho de la uña poseen un rico suministro de sangre procedente de dos arcos arteriales que se encuentran debajo de la lámina de la uña (55)

En base a la estructura del aparato ungueal la permeabilidad en las uñas generalmente es deficiente sin embargo cuando la uña se encuentra hidratada la permeabilidad aumenta. Uno de los problemas de los antifúngicos tópicos es la penetración de las uñas, ya que la permeabilidad de una uña enferma es menor debido a que esta es más gruesa. Estudios demuestran que los medicamentos con alta solubilidad y menor tamaño molecular son altamente demandantes para la administración trans-ungular (4)

Figura 7. Partes del aparato ungueal



Fuente: P. Martínez Núñez. Traumatismo ungueal (2020)

2.3.11. Formas farmacéuticas para la administración ungueal

a) Soluciones

Son preparados concentrados de uno o más principios activos en un solvente adecuado. Se aplican en la superficie de la uña mediante un cepillo, la diferencia con la laca de uñas es que no es capaz de formar una película insoluble en la superficie de la uña. Cuando la solución acuosa o alcohólica concentrada es formulada en un vehículo volátil se le denomina pintura.

Entre algunas soluciones indicadas para el tratamiento de onicomicosis se encuentran la solución de tioconazol, solución de salicilato y la solución de ácido undecilénico (56)

b) Semisólidos

- Geles

Tienen la capacidad de hidratar la placa ungueal por su abundante contenido de agua mejorando la penetración del fármaco debido a la dilatación de poros de la matriz de queratina.

- Ungüento/Cremas

Su aplicación es limitada en comparación a los geles por su naturaleza hidrofóbica, resultan más útiles en el tratamiento de hiperqueratosis subungular (56)

c) Parches

Se aplica sobre la superficie de la uña dañada, no cubre partes de la piel adyacente, evitando la transferencia sistémica, posee una capa adhesiva y su recubrimiento es no oclusivo (56)

d) Polvos

Utilizados en infecciones cutáneas y ungueales producidas por *Cándida* y dermatofitos con exudado (56)

e) Esmalte de uñas

Es una formulación preferida para el uso del tratamiento de onicomycosis, ya que existe resistencia del fármaco de permanecer en la uña además de poseer un aspecto estéticamente agradable.

Tras la aplicación en la placa de la uña con el pincel, depositan una película polimérica insoluble en agua y al evaporarse el disolvente, la concentración del activo es mayor promoviendo una buena y efectiva administración trans-ungular, la película polimérica oclusiva reduce la pérdida de agua en la superficie de la placa ungueal generando hidratación en las siguientes capas impulsando la diseminación del fármaco en el lecho ungueal. El contacto del fármaco antifúngico con la placa insertada durante largo tiempo se debe al residuo de la película del esmalte que actúa como un reservorio del activo (56).

Parámetros y atributos a evaluar en el esmalte de uñas

- Organolépticos: Aspecto, homogeneidad, color, olor y funcionalidad.
- Físicoquímicos: pH y viscosidad, identificación o cuantificación del activo.
- Microbiológicos: Recuento de microorganismos mesófilos, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Echerichia coli*, *Candida albicans*. (57)

Valoraciones del esmalte de uñas

- Contenido no volátil
- Tiempo de secado
- Suavidad para fluir
- Brillo
- Contenido de activo
- Permeación ungueal in vitro
- Determinación de la actividad antimicrobiana

2.3.12. Formulación de esmaltes de uñas

En una formulación de esmaltes de uñas se debe tomar en cuenta las propiedades deseables de los excipientes de la misma, para determinar las características de la formulación tales como: velocidad de secado, aspecto, adhesión, suavidad para fluir, brillo, uniformidad de la aplicación. Un buen indicio del comportamiento del esmalte de uñas es observando una capa del esmalte de uñas sobre una placa de vidrio limpia y transparente; la aplicación con el pincel también debe ser considerada al momento de evaluar para ver cualquier impedimento en la aplicación. Para valorar la resistencia de la película se realizan ensayos de abrasión in vitro. Con respecto al secado, esta desaconsejable la práctica de soplar sobre la película aplicada, puesto que aumenta la velocidad de secado, pero no garantiza la ausencia de humedad el cual puede afectar la adhesión y brillo de la película. En cuanto a la determinación del brillo y resistencia de uso, es preferible aplicar una sola vez la película, puesto que el espesor determina estas dos valoraciones. Una buena práctica es dejar secar la primera capa antes de aplicar la segunda puesto que la evaporación del disolvente puede producir pequeñas burbujas en la capa superior, originando el efecto “piel de naranja” (55)

2.3.12.1. Excipientes dentro de la formulación

-Disolventes:

Dispersan las partes no volátiles del esmalte, aportan uniformidad y homogeneidad a la película, la buena formulación con este excipiente imparte brillo a la película aplicada. Algunos ejemplos de disolventes son Acetato de etilo, acetato de butilo, etc. (56)

-Diluyentes:

Se emplean como estabilizadores de viscosidades del sistema y del brillo de la película. Además, puede actuar como plastificante de acoplamiento que aporte mejores propiedades al disolvente. Ejemplos de diluyentes son alcohol etílico, alcohol butílico, alcohol isopropílico (56)

-Plastificantes:

Aportan rigidez, flexibilidad y alargamiento en la película aplicada, además de mejorar el flujo, brillo, estabilidad a la luz y adherencia una vez evaporados los solventes (56).

Debe ser estable e inodoro o ser de un olor agradable ya que no se evapora, si no que permanece en contacto con la uña (55) Ejemplos de plastificantes son cetonas, esterres, amidas, esterres glicólicos, etc.; (56)

-Formadores de película:

También llamados filmogenos, confieren resistencia al agua, al entrar en contacto el esmalte de uñas con la uña, habrá una transferencia calórica que comenzara a evaporar los solventes que estabilizan la dispersión coloidal, una vez el polímero se inestabiliza comienza a plastificar de modo que forma una película (56).

Algunos ejemplos de filmogenos son: esterres de celulosa (hidroxipropilmetilcelulosa-HPMC, hidroxietilmetilcelulosa-TYLOSA), derivados vinilios (alcohol polivinilico, polivinilpirrolidona-PVP), otros (polietilenglicoles (Carbowax Mr), polímeros de ácido metacrilico (Eudragit Mr)) (55)

2.3.12.2. Esmalte de uñas de hidroxipropilquitosano

El esmalte de uñas de hidroxipropilquitosano (HPCH) es un dispositivo medico basado en una nueva tecnología desarrollada para reestructurar y remineralizar las uñas afectadas por malformaciones, fragilidad y dolor local (58). El HCPH es un derivado semisintético del quitosano que actúa como una solución hidroalcohólica filmogena, se disuelve en agua tiene afinidad por el aire es altamente elástico y forma una película suave y casi invisible. Existen investigaciones de las propiedades microbiológicas y la protección contra la colonización de hongos en las uñas, en un experimento in vitro, la aplicación de 10-20 µL (0,5% HPCH y 0,5% piroctone olamina) en una rebanada de uña bovina puesta en una placa Petri inoculada con *T. rubrum*, impidió el crecimiento del patógeno dentro y alrededor de la uña, se concluyó que la laca con HPCH impidió la infección experimental de las uñas sea antes o después de la contaminación por *T. rubrum* (58)

2.4. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

Aceite esencial: Son líquidos volátiles que poseen componentes aromáticos característicos de vegetales. Así pues, son responsables de múltiples efectos terapéuticos que podrían atribuirse a los metabolitos secundarios presentes en las plantas. Son muy utilizados en industrias farmacéuticas, cosméticas y alimentarias (37).

Antimicótico: Es un grupo de fármacos con diversos efectos sobre microorganismos fúngicos causantes de micosis superficiales, subcutáneas y profundas (59).

Cepa: Es un grupo de microorganismos que pertenecen a una variante originaria de una sola célula. Para preservar sus características únicas, las cepas frecuentemente se reproducen asexualmente. (17).

Concentración Mínima Inhibitoria: La concentración más baja de un agente antimicrobiano que impide el crecimiento visible de un microorganismo en una prueba de susceptibilidad a la dilución en agar o caldo (50)

Dermatofito. Se trata de hongos filamentosos que infectan la superficie de la piel y los apéndices. Tienen capacidad de penetrar las capas más externas queratinizadas de la piel, el cabello y las uñas. Provocan una variedad de síntomas clínicos: desde síntomas leves hasta lesiones inflamatorias y purulentas intensas (60)

Disco de Sensibilidad: Se utilizan para evaluar la susceptibilidad antimicótica es un disco de papel de 6 milímetros de diámetro generalmente el cual es impregnado con el antifúngico (49)

Escala de Mc Farland: Patrón de turbidez basado en suspensión de BaSO₄. El patrón usado es el de 0,5 (49)

Esterilización Procedimiento el cual permite la eliminación definitiva de microorganismos. Se realizan con procedimientos químicos, físicos o gaseosos (49)

Hidroxiopropilquitosano: Es un derivado sintético, soluble en agua del quitosano, con un grado de sustitución del 80%, considerado un biopolímero natural modificado a partir de la quitina. Estudios demostraron que protege la queratina, mantiene la hidratación y facilita la penetración de sus otros componentes en la matriz ungueal (61)

Incubar: Mantener los cultivos fúngicos en condiciones favorables para su crecimiento y reproducción (49)

Inoculo: Proporción de un cultivo micótico que se transfiere a un medio de cultivo (49)

Medio de Cultivo: Son medios artificiales, que pueden ser sólidos, semisólidos o líquidos, necesarios para el crecimiento y reproducción de hongos (49)

Onicomycosis: enfermedad de la uña causada por hongos, de tipo dermatofitos, levaduras y los mohos no dermatofitos (62)

Queratinolíticos: Hongos con la capacidad para destruir y/o descomponer a la queratina (63)

CAPITULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Muestra vegetal

- Hojas de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling y *Flourensia polycephala* Dillon

3.1.2. Muestra microbiológica

- *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

3.1.3. Patrón comparativo antimicótico

- Terbinafina Clorhidrato 0.624ug/ml
- Esmalte antimicótico de Ciclopirox al 8%

3.1.4. Medio de cultivo

- Agar Dextrosa Sabouraud
- Caldo Dextrosa Sabouraud
- Agar Mac konkey
- Agar Manitol

3.2. MATERIALES E INSTRUMENTOS DE LABORATORIO

3.2.1. Materiales de campo

- Bolsas de polietileno
- Tijera podadora
- Papel kraff
- Cuaderno de campo
- Cámara fotográfica
- Plumón indeleble
- Etiquetas autoadhesivas
- lapiceros

3.2.2. Materiales de laboratorio

- Papel aluminio
- Gradilla
- Ligas

- Pinzas
- Baguetas
- Papel filtro
- Embudos
- Termómetro digital
- Placas Petri de 100 x 15 mm con tapa
- Goteros
- Mechero bunsen
- Vaso de precipitados de 50mL, 100mL y 250mL
- Picnómetro con termómetro
- Probeta de 25 mL, 50mL, 100 mL
- Matraz de 100, 200 y 500mL
- Tubos de ensayo con tapa rosca
- Pipetas de 100,200, 500 y 1000uL
- Asas de siembra y aguja de kohle
- Discos de difusión estériles de 6 mm

3.2.3. Equipos de laboratorio

- Balanza analítica: marca OHAUS, modelo PA313
- Estufa
- Cocinilla eléctrica: marca AREC Heating Magnetic Stirrer
- Autoclave: marca INDUMELAB, modelo AT-TM50
- Detector de masas: marca AGILENT 5975B
- Cromatógrafo marca AGILENT 6890N, columna Agilent HP-5MS 5% Fenil Metil Siloxano 30m x 0.25id x 0.5um film
- Incubadora: marca BINDER, modelo DIN 12880
- Micropipetas marca DRAGONLAB, modelo KE 00244257
- Refractómetro portátil: marca ISOLAB-Alemania, código: 618.32.001

3.2.4. Insumos para la elaboración del esmalte

- Hidroxipropil quitosano
- Etanol al 96%
- Agua estéril

- Aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling
- Aceite esencial de *Flourensia polycephala* Dillon

3.2.5. Otros materiales

- Cronometro
- Papel filtro
- Hisopos estériles
- Gasas
- Vernier
- Jeringas de 1mL
- Algodón
- Barbijos
- Guantes no quirúrgicos
- Detergente

3.3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.3.1. Tipo de investigación

- El presente trabajo de investigación de la actividad antimicótica del esmalte de uñas formulado con la mezcla de los aceites esenciales de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) y *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (Puna salvia) frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 es de tipo Cuasi-experimental, ya que se manipulo una o más variables independientes de forma intencional en grupos de muestra no aleatorizada para ver su actividad antimicótica y la relación de una o más variables dependientes, concerniente a los volúmenes de la extracción de los aceites frente a la cepa del hongo *Trichophyton rubrum* ATCC 28188
- Es un estudio prospectivo, ya que el diseño de la investigación se realizó antes de que ocurra el fenómeno, y se reúnan los datos a evaluar.

3.3.2. Diseño de la investigación

3.3.2.1. Diseño de la Prueba antimicótica de los aceites esenciales

Se siguió el diseño de prueba post prueba y grupo control

Tabla 5. Diseño de Post prueba y Grupo control del aceite esencial de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca)

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICION DE LA PRUEBA (OBSERVACION)
G ₁	X ₁	O ₁
G ₂	X ₂	O ₂
G ₃	X ₃	O ₃
G ₄	X ₄	O ₄
G ₅	X ₅	O ₅
G ₆	X ₆	O ₆
G ₇	X ₇	O ₇
G ₈	X ₈	O ₈
G ₉	X ₉	O ₉

Fuente: Elaboración propia

Donde:

- G₁, G₂, G₃, G₄, G₅, G₆, G₇, G₈, G₉: Cepas estándar de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188
- X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆, X₇: Diferentes concentraciones del aceite esencial de *Flourensia polycephala* Dillon "Pauca"
- X₈: Concentración del fármaco terbinafina que se utilizara como patrón para la prueba antimicótica
- X₉: Etanol 96°, solución que se usara como blanco para la prueba antimicótica
- O₁, O₂, O₃, O₄, O₅, O₆, O₇: Observación y medición de los halos de inhibición producidos por el aceite esencial de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca)
- O₈: Observación y medición de los halos de inhibición que fueron producidos por el patrón.
- O₉: Medición de los halos de inhibición que fueron producidos por el blanco.

Tabla 6. Diseño de post prueba y grupo control del aceite esencial de las hojas de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (Puna salvia)

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICION DE LA PRUEBA (OBSERVACION)
G ₁	Y ₁	O ₁
G ₂	Y ₂	O ₂
G ₃	Y ₃	O ₃
G ₄	Y ₄	O ₄
G ₅	Y ₅	O ₅
G ₆	Y ₆	O ₆
G ₇	Y ₇	O ₇
G ₈	Y ₈	O ₈
G ₉	X ₉	O ₉

Fuente: Elaboración propia

Donde:

- G₁, G₂, G₃, G₄, G₅, G₆, G₇, G₈, G₉: Cepas estándar de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188
- Y₁, Y₂, Y₃, Y₄, Y₅, Y₆, Y₇: Diferentes concentraciones del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* "Puna salvia"
- Y₈: Concentración del fármaco terbinafina que se utilizara como patrón para la prueba antimicótica
- Y₉: Etanol 96°, solución que se usara como blanco para la prueba antimicótica
- O₁, O₂, O₃, O₄, O₅, O₆, O₇: Observación y medición de los halos de inhibición producidos por el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* Walpers Epling (Puna salvia)
- O₈: Observación y medición de los halos de inhibición que fueron producidos por el patrón.
- O₉: Observación y medición de los halos de inhibición que fueron producidos por el blanco.

3.3.2.2. Diseño de la prueba antimicótica del esmalte elaborado en base a los aceites esenciales de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) y *Lepechinia Walpers Epling* (Puna salvia)

Tabla 7. Diseño de post prueba y grupo control del esmalte de uñas elaborado con los aceites esenciales

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICION DE LA PRUEBA (OBSERVACION)
G ₁	X ₁ Y ₁	O ₁
G ₂	X ₂ Y ₂	O ₂
G ₃	X ₃ Y ₃	O ₃
G ₄	X ₄ Y ₄	O ₄
G ₅	X ₅ Y ₅	O ₅

Fuente: Elaboración propia

Donde:

- G₁, G₂, G₃, G₄, G₅: Cepas estándar de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188
- X₁ Y₁, X₂ Y₂, X₃ Y₃: Diferentes concentraciones del esmalte formulado con los aceites esenciales de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) y *Lepechinia Walpers Epling* (Puna salvia).
- X₄ Y₄. Esmalte antimicótico de ciclopirox 8% que se usó como patrón
- X₅Y₅: Esmalte base, que se usó como control.
- O₁, O₂, O₃: Observación y medición de los halos de inhibición.
- O₄: Observación y medición de los halos de inhibición producidos por el patrón.
- O₅: Observación y medición de los halos de inhibición producidos por el blanco.

3.4. IDENTIFICACION Y OPERACIONALIZACION DE LAS VARIABLES

3.4.1. Variables Implicadas

3.4.1.1. Variables Independientes

I. CONCENTRACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL OBTENIDO DE LAS HOJAS SECAS DE *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca)

Definición Conceptual

Es la cantidad del aceite esencial de disuelto entre la cantidad del etanol 96° a utilizar, por ende, nos referimos a la cantidad de AE que se necesita con el objetivo de que la acción farmacológica sea efectiva

Definición Operacional

- Naturaleza: Cuantitativa
- Medición: Directa
- Escala: Razón
- Instrumento de medición: Micropipeta
- Procedimiento de medición: Se procedió a medir el volumen de aceite esencial de *Flourensia polycephala* Dillon para cada disco.
- Indicador: Volumen del aceite esencial expresado en microlitros
- Expresión final: 90, 80, 70, 50, 30, 20 y 10% de aceite esencial de *Flourensia polycephala* Dillon.

II. CONCENTRACION DEL ACEITE ESENCIAL OBTENIDA DE LAS HOJAS SECAS DE *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (Puna salvia)

Definición Conceptual

Cantidad de la esencia de *Lepechinia meyenii* Walpers Epling (puna salvia) disuelto en etanol 96°, que se requiere para que cumpla la acción farmacológica efectiva

Definición Operacional

- Naturaleza: Cuantitativa
- Medición: Directa
- Escala: Razón
- Instrumento de medición: Micropipeta
- Procedimiento de medición Se procedió a medir el volumen de aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (puna salvia) para cada disco
- Indicador: Volumen de aceite esencial expresado en microlitros
- Expresión final: 90, 80, 70, 50, 30, 20 y 10% de aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling

III. CONCENTRACION DE LOS ACEITES ESENCIALES OBTENIDAS DE LAS HOJAS SECAS DE *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) Y *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (Puna salvia); Y DEL HIDROXIPROPILQUITOSANO EN EL ESMALTE DE UÑAS

Definición Conceptual

La cantidad de los aceites esenciales (*Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling y *Flourensia polycephala* Dillon) y del hidroxipropil quitosano disueltos en la formulación del esmalte

Definición Operacional

- Naturaleza: Cuantitativa
- Medición: Directa
- Escala: Razón
- Instrumento de medición: Micropipeta
- Procedimiento de medición: Se procedió a medir el volumen del hidroxipropil quitosano (uL), seguidamente se midió el volumen de los aceites esenciales (uL) para ser incluidas en la formulación y elaboración del esmalte de uñas
- Indicador: Porcentaje en la formulación del esmalte
- Expresión final: 0.5%, 1% y 2% de concentración de aceites y 5% de hidroxipropilquitosano en la formulación de esmalte

3.4.1.2. Variables dependientes

I. ACTIVIDAD ANTIMICOTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) FRENTE A CEPAS DE *Trichophyton rubrum*

Definición Conceptual

Capacidad del aceite esencial de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) al poseer metabolitos secundarios capaces de ocasionar una disfunción de las cavidades de la célula fúngica de *Trichophyton rubrum* evitando su desarrollo o, alterando su posibilidad de subsistencia sea directa o indirectamente (64)

A. METODO DE DISCO DIFUSION

Definición Operacional

- Naturaleza: Cualitativa

- Medición: Directa
- Escala: Razón
- Instrumento de medición: Vernier
- Procedimiento de medición: Se midieron los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento fúngico producido por las diferentes concentraciones del aceite esencial.
- Indicador: Diámetro del Halo de inhibición del crecimiento
- Expresión final:
 - Susceptible: ≥ 20 mm
 - Susceptible-Dependiente de la dosis: 15 -19 mm
 - Intermedio: 15 - 19 mm
 - Resistente: ≤ 14 mm

B. METODO DE MADRODILUCION

Definición Operacional

- Naturaleza: Cuantitativa
- Medición: Directa
- Escala: Razón
- Instrumento de medición: Ficha de recolección de datos
- Procedimiento de medición: Se observó el grado de turbidez que presentaron los medios de cultivo, inoculados con *T. rubrum* expuestos al aceite esencial.
- Indicador: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)
- Expresión final: Grado de turbidez
 - Ausencia de Turbidez
 - Presencia de Turbidez

II. ACTIVIDAD ANTIMICOTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (Puna salvia) FRENTE A CEPAS DE *Trichophyton rubrum*

Definición Conceptual

Capacidad del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (Puna salvia), al poseer metabolitos secundarios capaces de ocasionar una disfunción de las cavidades de la célula fúngica de *Trichophyton rubrum* evitando su desarrollo o, alterando su posibilidad de subsistencia sea directa o indirectamente (64)

A. METODO DE DISCO DIFUSION

Definición Operacional

- Naturaleza: Cualitativa
- Medición: Directa
- Escala: Razón
- Instrumento de medición: Vernier
- Procedimiento de medición: Se midió los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento fúngico producido por las diferentes concentraciones del aceite esencial.
- Indicador: Diámetro del halo de inhibición del crecimiento
- Expresión final:
 - Susceptible: ≥ 20 mm
 - Susceptible-Dependiente de la dosis: 15 -19 mm
 - Intermedio: 15 - 19 mm
 - Resistente: ≤ 14 mm

B. METODO DE MACRODILUCION

Definición Operacional

- Naturaleza: Cuantitativa
- Medición: Directa
- Escala: Razón
- Instrumento de medición: Ficha de recolección de datos
- Procedimiento de medición: se observó el grado de turbidez que presentaron los medios de cultivo, inoculados con *T. rubrum* expuestos al aceite esencial.
- Indicador: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)
- Expresión final: Grado de turbidez
 - Ausencia de Turbidez
 - Presencia de Turbidez

III. ACTIVIDAD ANTIMICOTICA DEL ESMALTE DE UÑAS ELABORADO CON LOS ACEITES ESENCIALES

Definición Conceptual

Capacidad del esmalte de uñas de generar una variación en las cavidades de la célula del hongo de *T. rubrum* que impidan su desarrollo, alterando su posibilidad de subsistencia sea directa o indirectamente, promoviendo la activación de los sistemas de defensa del huésped (64).

A. DIMENCIONES DE LOS HALOS DE INHIBICION DEL CRECIMIENTO MICOTICO

Definición Conceptual

Es el halo en torno al disco de antimicótico en el que no se produce crecimiento fúngico en una placa de agar inoculada con el microorganismo (49).

Definición Operacional

- Naturaleza: Cuantitativa
- Medición: Directa
- Escala: Razón
- Instrumento de medición: Vernier
- Procedimiento de medición: Se midió el diámetro de los halos de inhibición del crecimiento fúngico
- Indicador: Diámetro del halo de inhibición
- Expresión final:
 - Susceptible: ≥ 20 mm
 - Susceptible-Dependiente de la dosis: 15 -19 mm
 - Intermedio: 15 - 19 mm
 - Resistente: ≤ 14 mm

IV. CARACTERIZACION DEL ESMALTE DE UÑAS

A. PARAMETROS ORGANOLEPTICOS

Definición Conceptual

Características de las sustancias y productos que son perceptibles por los sentidos, refiriéndose al aspecto sensorial identificado por: aspecto, color, olor y sabor; estas características establecen los parámetros de aprobación del producto (57)

SUBINDICADORES

Aspecto

Definición Conceptual

Dicho de una sustancia o de una mezcla de varias, de compensación y estructura uniforme (66)

Definición Operacional

- Naturaleza: Cualitativa
- Medición: Directa
- Escala: Nominal
- Instrumento de medición: Ficha de recolección de datos
- Procedimiento de medición: Se determina observando contra luz sobre fondo blanco la presencia de partículas, alteraciones macroscópicas y/o turbidez
- Expresión final: normal, sin alteración (Homogéneo); levemente separado, levemente precipitado o levemente turbio; separado, precipitado o turbio (67)

Olor

Definición Conceptual

Es la propiedad de una sustancia originada por partículas aromáticas esparcidas de los cuerpos volátiles capaz de activar el sentido del olfato (66)

Definición Operacional

- Naturaleza: Cualitativa
- Medición: Directa
- Escala: Nominal
- Instrumento de medida: Ficha de recolección de datos
- Procedimiento de medición: Se introdujo para determinar las características del olor una tira de papel en la muestra.
- Indicador: Olor característico

- Expresión final: normal, sin alteración (característico); levemente modificada; modificada; intensamente modificada (67)

Color

Definición Conceptual

Es el análisis visual donde se realiza la comparación entre el color patrón almacenado en un estándar y el color de la muestra en estudio y puede ser ejecutado en condiciones de luz “blanca” natural o artificial, o en cámaras especiales con diversas longitudes de onda (68)

Definición Operacional

- Naturaleza: Cualitativa
- Medición: Directa
- Escala: Nominal
- Instrumento de medida: Ficha de recolección de datos
- Procedimiento de medición: Comparación visual de la muestra con soluciones coloridas de concentraciones conocidas
- Expresión final: normal, sin alteración (Amarillo transparente); levemente modificada; modificada; intensamente modificada (67)

B. PARAMETROS FISICOQUIMICOS

Definición Conceptual

Son parámetros cuantificables y previamente establecidos, Son criterios básicos para establecer la estabilidad de un producto cosmético (69).

SUBINDICADORES

pH

Definición Conceptual

Es una medida del número iones de hidrógeno presentes, que determina el grado de acidez, neutralidad o alcalinidad de una solución. Se calcula en una escala de 0 (valor más ácido) a 14 (valor más básico) (70)

Definición Operacional

- Naturaleza: Cuantitativa
 - medición: Indirecta
 - Escala: Razón
 - Instrumento de medición: pH-metro
 - Procedimiento de medición: Determinar el valor del pH directamente de la muestra
 - Expresión final: Valor del pH
 - Rango aceptable: El pH de la placa ungueal humana es de 4.7 a 5.5 (71)
- *Artículo de referencia: The pH of the human nail plate. S. Murdan

Estabilidad

Definición Conceptual

Los estudios de estabilidad permiten comprender y documentar los posibles cambios en las características del esmalte de uñas sean físicos, organolépticos, químicos o microbiológicos, que pueden darse al estar expuestos a diferentes factores ambientales y que podrían suponer un daño en el uso de la población (67)

Definición Operacional

- Naturaleza: Cuantitativa
 - medición: Indirecta
 - Escala: Nominal
 - Instrumento de medición: Estufa
 - Procedimiento de medición: Se mantuvo en estufa a 37 °C durante 15 días
 - Expresión final: Estable (Muestra homogénea, sin cambios de color, olor y consistencia) o Inestable (57)
- *Programa de Calidad para el Sector Cosmético. ONUDI. (2018)

Suavidad Para Fluir

Definición Conceptual

Es la capacidad del esmalte para tolerar las deformaciones hechas por el pincel donde será distribuido, en este caso la uña (1)

Definición Operacional

- Naturaleza: Cuantitativa
- medición: Indirecta
- Escala: Razón
- Instrumento de medición: Placas de vidrio de dos pulgadas y cronometro
- Procedimiento de medición: Verter la muestra sobre una placa de vidrio desde una altura de 5cm y esperar el tiempo de recorrido de la medida.
- Expresión final: Segundos
- Rango aceptable: <1minuto (72).
* Nails polish specification. Indian Standards (First revision)

Modelo De Penetración

Definición Conceptual

Capacidad del esmalte de uñas elaborado para llegar a zonas más profundas del aparato ungueal y liberar el principio activo (73)

Definición Operacional

- Naturaleza: Cuantitativa
- Medición: Directa
- Escala: Razón
- Instrumento de medición: Vernier digital o pie de rey
- Procedimiento de medición:
Se realizó discos de uñas de 6 mm, que serán colocadas en la superficie de las placas de agar sembradas con inóculo de *T. rubrum*. Luego se aplicó el esmalte en la superficie del disco de uña, las placas se incubaron durante 7 días a 25 °C y los halos de inhibición fueron medidos.
- Expresión final: Expresión final:
 - Susceptible: ≥ 20 mm
 - Susceptible-Dependiente de la dosis: 15 -19 mm
 - Intermedio: 15 - 19 mm
 - Resistente: ≤ 14 mm

Tiempo De Secado

Definición Conceptual

Está determinado por el contenido de pérdida de la humedad de la muestra en función del tiempo en condiciones de temperatura, presión, humedad y velocidad constantes (72)

Definición Operacional

- Naturaleza: Cuantitativa
- medición: Indirecta
- Escala: Razón
- Instrumento de medición: Cronometro
- Procedimiento de medición: Se tomó el tiempo con ayuda de un cronometro para formar una película seca al tacto en una lámina portaobjetos.
- Expresión final: Segundos o Minutos
- Rango aceptable: 4 – 8 minutos (74)
 - * Manual de Cosméticos de la FDA (FDA Handbook on Cosmetics)

C. CONTROL MICROBIOLÓGICO

Definición Conceptual

Procedimiento que se sigue para determinar la presencia, identificación, y cantidad de microorganismos patógenos e indicadores de contaminación en una muestra en este caso el esmalte formulado. El control microbiológico es un requerimiento fundamental para garantizar la calidad de los productos y la seguridad del consumidor (65)

Definición Operacional

- Naturaleza: Cualitativa
- Medición: Indirecta
- Escala: Nominal
- Instrumento de medición: Ficha de recolección
- Procedimiento de medición: Se sembró el esmalte de uñas en agar
- Expresión final: Ausencia o Presencia y numero de UFC/ml

3.4.2. Variables no implicadas

3.4.2.1. Variables intervinientes

I. Del Hongo

Microorganismo: Cepas fúngicas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

Medio de cultivo: Se utilizó el Agar Dextrosa Sabouraud y el caldo Sabouraud para la activación de los microorganismos

Temperatura de crecimiento: Se trabajó con las cepas de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 a temperatura de 25-30°C en un lapso de 5-7 días

II. De Las Plantas De Estudio

Zona de recolección:

- *Flourensia polycephala* Dillion (pauca): la especie vegetal se recolectó en el distrito de Oropesa, Departamento del Cusco.
- *Lepechinia meyenii* (puna salvia): la especie vegetal se recolectó en el distrito de Amparaes, Departamento del Cusco.

Temporada de recolección:

- La especie vegetal *Flourensia polycephala* Dillion (pauca) se recolectó en el mes de marzo del 2024
- La especie vegetal *Lepechinia meyenii* (puna salvia) se recolectó en el mes de marzo del 2024

Horario de recolección

- La especie vegetal *Flourensia polycephala* Dillion “pauca” se recolectó durante el día
- La especie vegetal *Lepechinia meyenii* “puna salvia” se recolectó durante el día

Partes de la planta en estudio:

- Se utilizó las partes aéreas de la planta; hojas de *Flourensia polycephala* Dillion “pauca”
- Se utilizó las partes aéreas de la planta; hojas y flores de *Lepechinia meyenii* “puna salvia”

4.4.2.2. Criterios de inclusión y exclusión

I. Criterios De Inclusión

- De La Especie Vegetal

Se tomaron hojas libres de hongos, plagas u hojas con daños evidentes

- Del Hongo

Se trabajaron con cepas en buenas condiciones, sin contaminantes de *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

II. Criterios De Exclusión

- De La Especie Vegetal

Se descartó muestras que posean deterioro o cierto grado de contaminación o aquellas sometidas a agroquímicos

- Del Hongo

Se excluyó cepas en pésimo estado o cepas que no tengan las cualidades básicas de una cepa como tal

- De La Formulación

Se descartaron formulaciones que no cuenten con el control de calidad establecido en este trabajo.

Tabla 8. Operacionalización de Variables

VARIABLES		INDICADORES	SUB INDICADORES	NATURALEZA	MEDICION				EXPRESION FINAL DE LA VARIABLE
					FORMA	ESCALA	PROCEDIMIENTO	INSTRUMENTO	
INDEPENDIENTES	Concentración del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling (puna salvia)	Volumen del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i>		Cuantitativa	Directa	Proporción o razón	Se procedió a medir el volumen de aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling para cada disco,	Micropipeta	90, 80, 70, 50, 30, 20 y 10% de aceite esencial de
	Concentración del aceite esencial de <i>Flourensia polycephala</i> Dillon (pauca)	Volumen del aceite esencial de <i>Flourensia polycephala</i> Dillon		Cuantitativa	Directa	Proporción o razón	Se procedió a medir el volumen de aceite esencial de <i>Flourensia polycephala</i> Dillon para cada disco	Micropipeta	90, 80, 70, 50, 30, 20 y 10% de aceite esencial
	Concentración de los aceites esenciales de <i>Lepechinia meyenii</i> y <i>Flourensia polycephala</i> Dillon en el esmalte de uñas	Porcentaje		Cuantitativa	Directa	Proporción o razón	Se procedió a medir el volumen de los aceites esenciales los cuales se incluirán en la formulación y elaboración del esmalte de uñas.	Micropipeta	0.5%, 1%. 2% de concentración de aceites y 5% de hidropropilquitosano en la formulación de esmalte

Fuente: Elaboración propia

DEPENDIENTES	VARIABLES	INDICADORES	SUB INDICADORES	NATURALEZA	MEDICION			EXPRESION FINAL DE LA VARIABLE	
					FORMA	ESCALA	PROCEDIMIENTO		INSTRUMENTO
	Actividad antimicótica del aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling frente a cepas de <i>Trichophyton rubrum</i>	Diámetro del halo de inhibición del crecimiento fúngico.		Cualitativa	Directa	Nominal	Se procedió a medir los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento fúngico generado por las distintas concentraciones del aceite esencial.	Vernier	Susceptible: ≥20 mm Susceptible-Dependiente de la dosis: 15 -19 mm Intermedio: 15 - 19 mm Resistente: ≤14 mm
		CMI		Cuantitativa	Directa	Proporción o razón	Se observó el grado de turbidez de los tubos	Ficha de recolección de Datos	Grado de turbidez
	Actividad antimicótica del aceite esencial de <i>Flourensia polycephala</i> Dillon frente a cepas de <i>Trichophyton rubrum</i>	Diámetro del halo de inhibición del crecimiento fúngico.		Cualitativa	Directa	Nominal	Se procedió a medir los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento fúngico generado por las distintas concentraciones del aceite esencial.	Vernier	Susceptible: ≥20 mm Susceptible-Dependiente de la dosis: 15 -19 mm Intermedio: 15 - 19 mm Resistente: ≤14 mm
		CMI		Cuantitativa	Directa	Proporción o razón	Se observó el grado de turbidez de los tubos	Ficha de recolección de Datos	Grado de turbidez
	Actividad antimicótica del esmalte de uñas elaborado a base de los aceites esenciales de <i>Lepechinia Meyenii</i> (Walpers) Epling y <i>Flourensia polycephala</i> Dillon frente a cepas de <i>Trichophyton rubrum</i>	Diámetro de los halos de inhibición del crecimiento fúngico		Cualitativa	Directa	Nominal	Se midió los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento fúngico generado por el esmalte de uñas.	Vernier	Susceptible: ≥20 mm Susceptible-Dependiente de la dosis: 15 -19 mm Intermedio: 15 - 19 mm Resistente: ≤14 mm
		Parámetro Organolépticos	COLOR		Cualitativa	Directa	Nominal	Tomar una muestra en una placa de vidrio y observar el color	Ficha de recolección de datos
	OLOR			Cualitativa	Directa	Nominal	Con una tira de papel introducir en la muestra determinar las características del olor	Ficha de recolección de datos	Característico/No característico
	Aspecto			Cualitativa	Directa	Nominal	Observación contra luz presencia de partículas o turbidez	Ficha de recolección de datos	Conforme / no conforme
	Parámetros Físicoquímicos	pH		Cuantitativa	Indirecta	razón	Determinar el valor del pH directamente de la muestra	pH-metro	Valor del pH dentro del valor de referencia
		Estabilidad		Cualitativa	Directa	Nominal	Mantener el esmalte de uñas a 30 °C durante 30 días	Ficha de recolección de Datos	Estable/Inestable
	Otros parámetros	Suavidad para Fluir		Cuantitativa	Indirecta	Razón	Verter la muestra sobre una placa de vidrio de 1.5 y esperar el tiempo de recorrido de la medida.	Placas de Vidrio de Dos pulgadas y cronometro	Segundos
		Modelo de penetración		Cuantitativa	Directa	razón	se aplicó el esmalte en la superficie del disco de uña, las placas se incubarán durante 7 días a 25 °C y se medirán los halos de inhibición	Vernier	Susceptible: ≥20 mm Susceptible-Dependiente de la dosis: 15 -19 mm Intermedio: 15 - 19 mm Resistente: ≤14 mm
		Tiempo de secado		Cuantitativa	Indirecta	razón	Se tomó el tiempo con ayuda de un cronometro para formar una película seca al tacto en la uña	Cronometro	Segundos o Minutos
	Control microbiológico			Cualitativa	Indirecta	Nominal	Siembra del esmalte de uñas	Ficha de recolección de datos	Presencia o ausencia de Microorganismos mesófilos, <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> ,

Tabla 9. Variables no Implicadas

VARIABLES INTERVINIENTES	NATURALEZA	FORMA DE MEDICION	ESCALA DE MEDICION	EXPRESION FINAL
Características del Hongo Tipo de cepa Medios de cultivo Temperatura de incubación Estado de crecimiento	Cualitativa	Directa	Nominal	Cepas estándar de <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 28188
Características de las plantas en estudio Estadio de crecimiento lugar de recolección temporada de recolección Técnica de recolección parte de las plantas a estudiar	Cualitativa	Directa	Nominal	Hojas y Flores sanas, libre de daños evidentes

Fuente: Elaboración propia

3.5. PROCEDIMIENTO

3.5.1. Recolección de la muestra

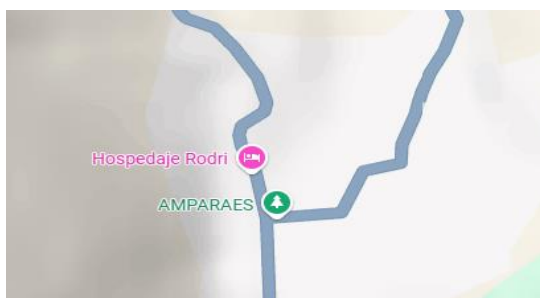
Con el objetivo de Identificar taxonómicamente las especies estudiadas se recolectaron dichas especies vegetales (Ver Anexo 10) (Ver Fotografías 1 y 2).

La recolección es un componente crucial en la producción de plantas medicinales, dado que su calidad está fuertemente determinada por la calidad del producto final adquirido. Es imprescindible establecer con antelación el momento y el método más adecuado para llevarlo a cabo. La presencia de componentes activos en las plantas medicinales se basa en elementos como:

- a) El proceso de madurez de la planta
 - b) El progreso estacional (las temperaturas más elevadas generan oxidaciones)
 - c) El nivel de insolación por hora y día durante el día
 - d) La precipitación (75)
- Las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca), se recolectaron en el mes de marzo - abril, en la comunidad de Pinagua distrito de Oropeza, provincia de Quispicanchi, departamento del Cusco, a una altitud de 3510 m s. n. m. y coordenadas (-13.586574, -71.742550)



- Las hojas y flores de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (Puna salvia) se recolectaron en el mes de marzo- abril aquellas plantas que crecen en el centro poblado de Amparaes, Distrito de Lares, provincia de Calca, región Cusco a una altitud 4244 msnm y coordenadas (-13.048954003483853, -71.94833486822222)



3.5.2. Selección y secado de la muestra

Una vez obtenidas las muestras vegetales se procedió a la selección y limpieza de los mejores ejemplares de las hojas y flores de la especie vegetal de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling y hojas de *Flourensia polycephala* Dillon, luego se colocaron sobre papel kraft para que se sequen, esto se hizo en un lugar fresco, limpio, aireado y sombreado a temperatura ambiente (75)

3.5.3. Identificación botánica

Este tipo de ensayos permiten confirmar la identidad de la droga detectando posibles falsificaciones y estableciendo, en muchos casos, incluso el grado de calidad de esa droga (75).

Se presento al profesor asociado al Herbario Vargas Cuz, facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco una muestra vegetal herborizada de ambas especies (*Flourensia polycephala* Dillon y *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling, para la determinación taxonómica e identificación botánica respectiva (Ver Anexo 1) (Ver Fotografías 3 y 4).

3.5.4. Determinación de la humedad

La determinación de la humedad se realizó por el método gravimétrico según la farmacopea brasileña, tres veces en placas Petri, con la siguiente indicación:

Pesar exactamente de 1 a 10 g, transferirlos a un filtro-pesador de peso exacto. Secar la muestra entre 100°C y 105°C durante 5h hasta que el peso de dos pesadas consecutivas difiera en no más del 0,25% de la muestra. Calcule el contenido de humedad de las muestras secadas al aire (70)

$$\% H = \frac{M1 - M2}{M1} \times 100$$

Dónde:

%H: Porcentaje de humedad

M1: Peso de muestra fresca

M2: Peso de muestra seca

3.5.5. Determinación del porcentaje de rendimiento

Los aceites esenciales fueron obtenidos por el método de arrastre por vapor realizado en el laboratorio de Química.

Se define como la relación entre la cantidad de aceite en mililitros y el material vegetal fresco o seco utilizado en gramos (76). Según la ecuación:

$$\% \text{RAE} = \frac{\text{Vol. AE (mL)}}{\text{Pmuestra (g)}} \times 100$$

Donde:

%RAE: Rendimiento expresado en porcentaje.

Vol. AE: Volumen del aceite esencial extraído en mL.

P muestra: Peso de la materia vegetal empleado en la destilación en gramos

3.5.6. Pruebas de solubilidad

Se consideró un volumen de 0.5 mililitros en varios tubos de ensayo para cada AE (puna salvia y pauca). Luego, cada tubo de ensayo recibió 1 ml de disolventes con distintos grados de polaridad, desde el más polar hasta el menos polar (Ver Fotografías 5 y 6) (77)

Tabla 10. Solventes para la prueba de solubilidad

Agua destilada
Etanol 40%
Etanol 70%
Etanol 90%
Metanol
Cloroformo
Tween 80
Dimetilsulfoxido (DMSO)

Fuente: Elaboración propia basado en Guía de Laboratorio de Química Orgánica;2018.

3.5.7. Determinación de las características organolépticas y fisicoquímicas de los aceites esenciales

3.5.7.1. Características organolépticas

- *Apariencia:* Se utilizó el análisis visual para examinar la apariencia.
- *Color:* Se sostuvo un tubo de ensayo limpio, se llenó hasta 2/3 de su capacidad con aceite esencial y mantener hacia la luz para revelar el color.
- *Olor:* Se insertó un trozo de papel de 10cm x 1cm en la muestra, colocándose en un extremo y se inhaló.
- *Sabor:* Se consumirá una cantidad considerable de aceite esencial y se valorará con el sentido del gusto (78)

. 3.5.7.2. Características fisicoquímicas

Las siguientes pruebas se realizaron en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco:

I. Determinación De La Densidad

Densidad de masa (ρ) de una sustancia es la razón de su masa por su volumen, a 20°C (79)

Método picnométrico:

- Se pesó un picnómetro de 10 ml no contaminado, seco y calibrado. La calibración implica determinar la masa del picnómetro vacío y la masa de su contenido utilizando agua a una temperatura de 20°C.
- Se añadió la muestra de aceite esencial al picnómetro. Una vez que alcance los 20 °C, pese el objeto; la masa del AE será igual a la resta del picnómetro lleno menos el vacío (Ver Fotografías 7 y 8)
- Se utilizó la densidad relativa para calcular la densidad de masa (79)

II. Índice De Refracción

Se define como la correlación entre la velocidad de la luz en el vacío y su velocidad en la materia. Por razones prácticas, la refracción se mide con respecto al aire y la materia, por lo que la diferencia entre los valores obtenidos de ambas mediciones no es importante para este propósito. Es interesante esta prueba ya que permite encontrar sustancias adulteradas. El equipo a utilizar será el refractómetro ABBE, medida a 20°C (Ver Fotografía 9) (80)

III. Rotación Óptica

Se diluyo el aceite esencial en metanol al 99% para hallar el poder rotatorio específico, este conocido como el ángulo en el que gira el plano de polarización de la luz después de pasar a través de una solución de aceite esencial que tiene 1 dm de espesor y contiene 1 g de ingrediente activo por mililitro (81)

Está relacionada a una longitud de onda particular de luz y se mide en grados y minutos a una temperatura, normalmente 20°C. Viene dada por la ecuación siguiente (81):

$$(\alpha)_D^{20^\circ C} = \frac{AxV}{LxP}$$

Donde:

A es el ángulo de rotación observado (en grados);

L es el espesor atravesado (en dm);

V es el volumen de la solución (en mL);

P es el peso de la sustancia disuelta (en g)

IV. Índice De Acidez

Hace referencia al nivel de acidez del aceite esencial y se entiende como la cantidad de mg de KOH necesarios para neutralizar la acidez presente en 1g de aceite esencial (82)

V. Índice De Saponificación

Es la suma de los índices de acidez y de éster, este último término definido como la cantidad de mg de KOH suficientes para la saponificación de los esteres presentes en 1g de aceite esencial (83).

3.5.8. Determinación de la composición química de los aceites esenciales por cromatografía de gases - espectrometría de masas (CG-SM)

Este método utiliza la diferencia en la distribución de especies de una mezcla entre dos fases inmiscibles como base para el proceso de separación. La fase estacionaria en la columna es la fase estacionaria y la fase móvil es el gas portador que se mueve a través de ella. Así mismo se fundamenta es la distribución de masa, la exclusión de

tamaño o el mecanismo de adsorción. Es aplicable a sustancias y sus derivados utilizados para identificación, pruebas de pureza y cuantificación que se evaporan a temperaturas que se manejan (70). Es utilizado el CG para cuantificar los componentes mayoritarios y principales de los aceites esenciales en estudio que son particularmente importantes para la calidad de estos

Los aceites esenciales fueron analizados en el laboratorio de cromatografía y espectrometría – Pabellón de Control de Calidad de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (Ver Anexos 2, 3 y 4).

3.5.9. Determinación de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (Puna salvia) y *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) sobre *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, por disco difusión

A nivel mundial, es el método más común utilizado para las pruebas de sensibilidad a los antifúngicos, ya que proporciona resultados de carácter cuantitativos al leer la zona de inhibición y además ofrece una clasificación interpretativa cualitativa, como sensibilidad o resistencia, modificaciones a los protocolos de los documentos del Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI) M38-A y el Subcomité de Pruebas de Susceptibilidad Antifúngica del Comité Europeo de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana (EUCAST) que generalmente se aplican a mohos y levaduras fermentativas, para ajustar las condiciones para el crecimiento de dermatofitos.

Fundamento:

Sobre la superficie de agar de una placa Petri que ya ha sido inoculada con microorganismos se colocan discos de papel empapados con distintos agentes antifúngicos. El filtro absorbe agua y el agente antifúngico se difunde en el agar cuando el disco empapado en antifúngico entra en contacto con la superficie húmeda del agar

Como resultado de la completa dispersión de los antimicóticos en todo el espesor del agar, se produce un gradiente de concentración. En el caso de agentes antimicóticos la incubación es de 7 a 14 días y se observara que los discos pueden estar rodeados o no por una zona inhibidora del crecimiento antimicótico (49).

Tabla 11. Método de Disco Difusión

ESPECIFICACIONES	<i>Trichophyton rubrum</i>
Patrón positivo	Terbinafina
Patrón negativo	Etanol 96°
Medio de cultivo	Agar Sabouraud Dextrosa Emmons
Tiempo de Crecimiento	7-14 días
Temperatura	25-30°C
Lectura	Diámetro de los halos en mm

Fuente: Recopilación basada en *Trichophyton rubrum* derivado de ATCC® 28188 microbiologics (Ver Anexo 5 y 7) (84)

3.5.9.1. Activación de cepas de *Trichophyton rubrum*

- I. Las cepas se sembraron en agar Sabouraud.
- II. Se llevó a un proceso de incubación a 25 °C por 7 a 14 días para corroborar su viabilidad.
- III. Posteriormente se reprodujeron en placas de Agar Sabouraud, conservándose de 2 a 8 °C (Ver Anexo 6) (Ver Fotografías 11 y 12) (84).

3.5.9.2. Preparación del inóculo

Las cepas activadas de *Trichophyton rubrum* fueron extraídas. Luego las placas se cubrieron con 5 mL de agua destilada estéril y la superficie será ligeramente raspada con un asa estéril o un hisopo. La mezcla de conidios y fragmentos de hifas se filtrarán a través de un papel filtro de 8 um y recogió en tubo de ensayo estéril. Este procedimiento eliminara la mayoría de las hifas, produciendo inóculos compuestos principalmente de esporas. Partiendo de una longitud de onda de 530 nm y una transmitancia del 68 al 70% en el espectrofotómetro, la turbidez final del inóculo se ajustará a una escala de 0,5 de McFarland (Ver Fotografía 13) (49)

3.5.9.3. Preparación de los discos de sensibilidad

- I. Se prepararon discos de papel filtro de un diámetro de 6 mm (Schleicher & Schuell, España)
- II. Se pesó 2 mg de terbinafina (patrón) y se diluyo en 1 mL de metanol

- III. Los aceites esenciales fueron diluidos en etanol 96°, con las siguientes concentraciones: 90, 80, 70, 50, 30, 20 y 10%
- IV. Los discos fueron impregnados con las diferentes concentraciones de aceite y del patrón con los que se trabajaran, se colocaran 5 uL de concentración en cada cara del disco, con un total de 10 uL por disco de concentración preparada.
- V. Después se secaron por siete horas a temperatura ambiente, se colocó sobre la superficie de agar (Ver Fotografía 16) (49)

Tabla 12. Concentración del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (Puna salvia) por disco

Concentración del aceite esencial (%)	Concentración del aceite esencial (v/v)	Aceite esencial (µL)	Etanol 96° (µL)	µL /DISCO
90	900ul/ml	900	100	10
80	800ul/ml	800	200	10
70	700ul/ml	700	300	10
50	500ul/ml	500	500	10
30	300ul/ml	300	700	10
20	200ul/ml	200	800	10
10	100ul/ml	100	900	10

Fuente: Elaborado en base a Sanga Mendizábal, Rodrigo. 2022

Tabla 13. Concentración del aceite esencial de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) por disco

Concentración del aceite esencial (%)	Concentración del aceite esencial (v/v)	Aceite esencial (µL)	Etanol 96° (µL)	µL /DISCO
90	900ul/ml	900	100	10
80	800ul/ml	800	200	10
70	700ul/ml	700	300	10
50	500ul/ml	500	500	10
30	300ul/ml	300	700	10
20	200ul/ml	200	800	10
10	100ul/ml	100	900	10

Fuente: Elaborado en base a Sanga Mendizábal, Rodrigo. 2022

3.5.9.4. Inoculación al medio de cultivo

- I. Óptimamente, dentro de los 15 minutos después de ajustar la turbidez de la suspensión del inóculo, se introdujo un hisopo de algodón esterilizado; éste deberá girarse varias veces y presionarse firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de líquido del inóculo.
- II. Se inoculo sobre el agar Sabouraud estéril y seco esparciendo uniformemente el hisopo. Para asegurar una distribución uniforme del inóculo, este procedimiento de rayado se repetirá tres veces, girando cada vez la placa unos 60 grados.
- III. Antes de insertar los discos con los aceites esenciales, se puede dejar la tapa ligeramente abierta durante tres a cinco minutos, esto permitirá que se absorba la humedad adicional de la superficie.
- IV. Los discos de 6 milímetros de diámetro se esterilizaron e impregnaron con las diversas concentraciones de los aceites esenciales para ser colocados en el agar, cada disco debe presionarse hacia abajo para asegurar su contacto completo con la superficie para poder asegurar un contacto completo (Ver Fotografía 17)
- V. En cuanto los discos entren en contacto con el agar no deben moverse, además la distribución de los discos debe ser cuidadosa (máximo cinco discos por placa de cien milímetros y doce por placa de ciento cincuenta milímetros) (49)

3.5.9.5. Incubación

- I. Dentro de los 15 minutos posteriores las placas se colocaron en posición invertida para evitar que el agua condensada caiga sobre el agar, a una temperatura de 25 °C por 4 a 7 días (Ver Fotografía 18).
- II. El antimicótico Terbinafina se utilizó como patrón de comparación y el etanol 96° como patrón negativo, repetiremos la prueba por triplicado (49)

3.5.9.6. Lectura de los halos de inhibición e interpretación de resultados

- I. Mediante un vernier se midieron los diámetros de los halos de inhibición abarcando también al disco.

- II. La placa se sostiene unos centímetros por encima de un fondo negro no reflectante iluminado con luz reflejada. Mida el diámetro de la zona al milímetro entero más cercano en el punto en el que hay una reducción importante en el crecimiento (Ver Fotografía 20) (49)

Categoría De Interpretación De Las Pruebas De Sensibilidad

- Sensible: El antifúngico recomendado a dosis adecuada tiene una probabilidad de éxito terapéutico para la especie tratante
- Susceptible-Dependiente de la dosis: incluye cepas aisladas con CMI de agentes antifúngicos que se aproximan a los niveles sanguíneos y tisulares normalmente alcanzables y para los cuales las tasas de respuesta pueden ser más bajas que las de las cepas susceptibles. La susceptibilidad depende de alcanzar el nivel sanguíneo máximo posible.
- Intermedio: Se puede conseguir el efecto terapéutico si hay posibilidad de elevar la dosis o que el antifúngico llegue al sitio diana de infección.
- Resistente: Los antifúngicos a dosis adecuados no consiguen el efecto terapéutico deseado o es muy débil, ya que existen mecanismos de resistencia o posee deficiente eficacia terapéutica (49).

Tabla 14. Categoría interpretativa de la zona de inhibición según las directrices del CLSI

Categoría interpretativa	Diámetro de la zona (mm)
Susceptible	≥20 mm
Susceptible-Dependiente de la dosis	15 -19 mm
Intermedio	15 - 19 mm
Resistente	≤14 mm

Fuente: Estándares proporcionados por la CLSI. Directriz M44. 2018 (49).

3.5.10. Determinación de la concentración mínima inhibitoria de los aceites esenciales por el método de Macrodilución

El CLSI (Comité de Normas Clínicas y de Laboratorio), que desarrolló y describió la actual directriz M61 (2020), aprobó recientemente la prueba estandarizada de susceptibilidad a los hongos de los dermatofitos utilizando el método de dilución en

caldo, que se considera el estándar de oro. La concentración inhibidora mínima (CIM) se puede determinar cultivando hongos particulares en presencia de agentes antifúngicos en diversas concentraciones (50)

Procedimiento:

Para cada mezcla de hongo y antifúngico, el método de macrodilución utiliza un juego de tubos de ensayo separado.

Cada tubo contenía 1 ml de medio de cultivo que fue el caldo Sabouraud, este contenía el inóculo ajustado, equivalente al estándar 0,5 de la escala de McFarland, aproximadamente 10^6 ufc/mL,

Los tubos de ensayo contenían 1ml de aceite esencial de *F. polycephala* y *L. meyenii* se prepararon a concentraciones de 90%, 80%, 70%, 50% 30%, 20% y 10%, y se calculó la CMI al observar la turbidez de cada dilución.

El último tubo no recibe aceite esencial (antifúngico) y sirve de control de crecimiento. Asimismo, se utilizó un patrón positivo de terbinafina y uno negativo de etanol 96. Durante el período de incubación de 5 a 7 días, se mantuvo los tubos a 25 a 30°C(Ver Fotografía 24) (50)

3.5.10.1. Lectura e interpretación de la CMI

La CIM es la menor concentración de antifúngico capaz de inhibir completamente el crecimiento mitótico en el tubo, el punto final queda definido a simple vista por la falta de turbidez del caldo (50)

Tabla 15. Método de Macro dilución en Caldo Sabouraud

ESPECIFICACIONES	<i>Trichophyton rubrum</i>
Método	Macrodilución
Control positivo	Terbinafina
Control negativo	Etanol 96°
Medio de cultivo	Caldo Sabouraud
Temperatura	25 – 30 °C. De 5 a 7 días
Punto de Lectura	Grado de turbidez

Fuente: Recopilación basada en Ficha técnica Caldo Dextrosa Sabouraud (Ver Anexo 8)

Tabla 16. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca)

Principio Activo	Concentraciones del aceite esencial (%)	Concentraciones del aceite esencial(v/v)	Número de tubos para cada concentración
Aceite esencial de <i>Flourensia polycephala</i> Dillon (pauca)	90%	900ul/ml	3
	80%	800ul/ml	3
	70%	700ul/ml	3
	50%	500ul/ml	3
	30%	300ul/ml	3
	20%	200ul/ml	3
	10%	100ul/ml	3

Fuente: Elaborado en base a Sanga Mendizábal, Rodrigo (2022)

Tabla 17. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (Puna salvia)

Principio activo	Concentraciones del aceite esencial (%)	Concentraciones del aceite esencial (v/v)	Número de tubos para cada concentración
Aceite esencial de <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling (Puna salvia)	90%	900ul/ml	3
	80%	800ul/ml	3
	70%	700ul/ml	3
	50%	500ul/ml	3
	30%	300ul/ml	3
	20%	200ul/ml	3
	10%	100ul/ml	3

Fuente: Elaborado en base a Sanga Mendizábal, Rodrigo (2022)

3.5.11. Preformulación del esmalte de uñas

Se realizaron ensayos de preformulación para obtener el esmalte de uñas ideal, durante esta etapa se seleccionarán los excipientes junto al hidroxipropilquitosano que serán compatibles con los aceites esenciales y que cumplan con los requisitos establecidos. Asimismo, se tomó en cuenta las Concentraciones mínimas inhibitorias

de cada aceite, que se determinó en el estudio de sensibilidad fúngica y se procedió a formular los esmaltes de uña (Ver Fotografías 27, 28 y 29).

Se considera como referencia la patente europea inventada por MAILLAND (85), donde proporciona una composición que comprende:

- a) Un extracto de hierbas que sería el principio activo en la composición está en el intervalo de 0,5 a 10 % en peso de la composición total.
- b) Agente formador de película (hidroxipropilquitosano y ácido láctico) está en el intervalo de 0,5 a 5 % en peso de la composición total.
- c) El codisolvente utilizado (etanol96°) en combinación con agua está presente típicamente en una cantidad de preferiblemente de 35 a 70 % en peso en peso del agua para impartir las propiedades indicadas anteriormente.
- d) Los potenciadores de la penetración (DMSO y acetato de etilo), pueden utilizar en una cantidad de 1 a 5 % en peso en peso de la composición total.

La composición de la presente invención consiste en los componentes a, b, c y d, cuyos porcentajes suman por lo tanto 100.

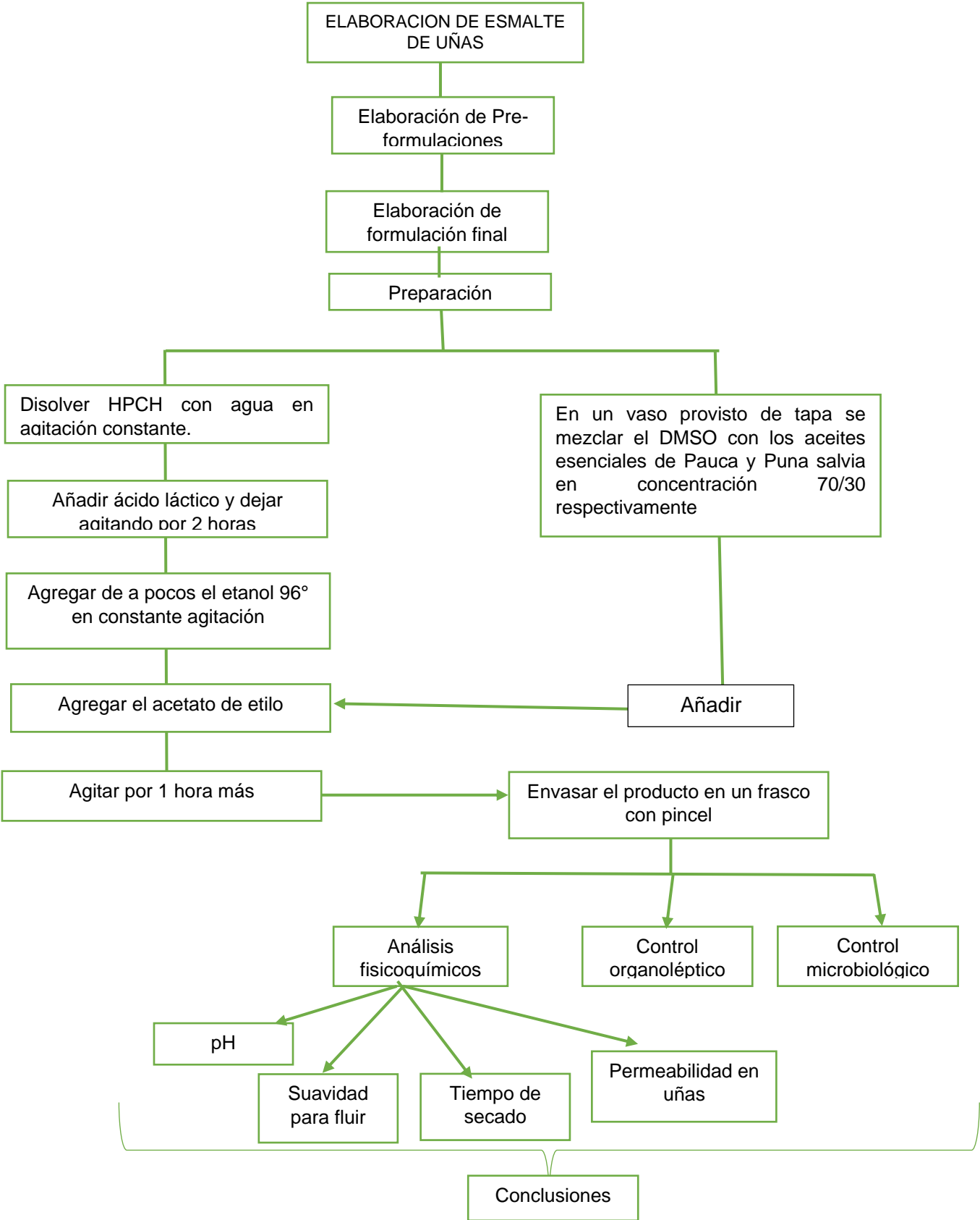
Estudio de compatibilidad aceites esenciales- excipientes

Se almacenaron a las temperaturas prescritas (5 °C y 10 °C) durante al menos 1 hora. Se tomarán imágenes de las muestras antes y después del tiempo de exposición a cada temperatura para evaluar el aspecto de la solución (85)

3.5.12. Formulación del esmalte de uñas

De las preformulaciones que se realizaron; se tomaron diferentes cantidades dentro de los intervalos establecidos por la patente, así llegando al esmalte con los aceites esenciales que presenten mejores características fisicoquímicas y organolépticas asimismo sean compatibles con los excipientes (Ver fotografías 30 y 31). En el siguiente flujograma se indica el procedimiento el cual se siguió)

Flujograma 1. Elaboración del esmalte de uñas con los aceites esenciales de *Flourensia polycephala* Dillon y *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling



Fuente: Elaboración propia

3.5.13. Evaluación In Vitro de la actividad antimicótica del esmalte de uñas por el método de Difusión en agar

Los esmaltes de uña formulados con la mezcla de los aceites esenciales de *Flourensia polycephala* Dillon y *Lepechinia meyeri* (Walpers) Epling a concentraciones mínimas inhibitorias respectivas, hidroxipropilquitosano, entre otros excipientes compatibles entre sí; fueron los 3 esmaltes mencionados en el punto 3.6.11. se llevó a una evaluación in vitro por el método de disco difusión

Procedimiento:

- I. Se impregnaron en discos de 6 milímetros de diámetro que después se aplicarán en la superficie de agar Sabouraud, una vez listo se llevaron a incubación por siete días a 25 °C
- II. Ciclopirox al 8% fue el patrón positivo a comparar la actividad antimicótica, y el esmalte base se incluirá como control negativo.
- III. El ensayo se llevó a cabo por triplicado, así mismo, nos ayudamos con un vernier para medir el diámetro en milímetros (49)

3.5.14. Caracterización del esmalte de uñas

Son pruebas que determinaron la calidad del esmalte de uñas, las muestras fueron analizadas en el laboratorio con las siguientes indicaciones y comparadas con un esmalte patrón base:

3.5.14.1. Parámetros Organolépticos

- Color: Uniforme, no se altera durante la vida media de la laca mientras su almacenamiento y no deja residuos.
- Olor: Tienen que ser propios de sus especies y géneros al cual pertenecen los componentes del esmalte en el transcurso de su almacenamiento
- Apariencia: De consistencia homogénea que no exista separación de fases (Ver Fotografía 32) (67)

3.5.14.2. Parámetros Físicoquímicos

- pH

Fue obtenido gracias a un medidor de pH, se encargará de medir el voltaje producido por su preparación cosmética, comparándolo con el voltaje producido por soluciones de calibración (Ver Fotografía 34) (67)

- Estabilidad

Se realizó un estudio de estabilidad acelerado donde según la OMS y la ICH sugieren que los esmaltes de uñas formulados serán almacenados a una temperatura de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ y humedad relativa $75\% \pm 5\%$ por 15 días. En el transcurso y al final se evaluará que los parámetros organolépticos no estén alterados tampoco se hayan formado fases, ni sedimentación (57)

3.5.14.3. Otros parámetros

- Modelo de penetración de uña

El hidroxipropilquitosano aparte de ser el formador de película se utilizó por estudios donde indican que es muy buen potenciador en la penetración de uñas, lo que se espera evaluar con esta prueba, además de la eficacia y liberación del activo (5)

Procedimiento:

1. Se crearon discos ungueales humanas de 6 milímetros.
2. Se preparó placas de agar Sabouraud inoculado con el hongo a estudiar (*T. rubrum*)
3. El esmalte fue aplicado en dichos discos, luego estas placas se llevarán a incubación por siete días a 25°C , para después medir las zonas de inhibición (Ver Fotografía 37) (1)

- Tiempo de Secado

Procedimiento:

1. Sobre portaobjetos se aplicó una muestra de película del esmalte utilizando un pincel.
2. Con la ayuda de un cronometro controlamos el tiempo que forma una capa seca al tacto (Ver Fotografía 36) (72)

- Suavidad para fluir

Procedimiento

1. Un poco de esmalte será vertido de una altura de 4 cm, la placa Petri será puesta en forma vertical.
2. Se controlará los minutos o segundos que demora en expandirse sobre la placa comparándola con el esmalte comercial (Ver Fotografía 35) (72)

- Microbiológico

Las pruebas microbiológicas de productos no estériles se realizaron de acuerdo con las pautas para pruebas microbiológicas generales y pruebas microbiológicas especializadas. Se tomarán en cuenta los criterios de aceptación para formulaciones no estériles tales como microorganismos aeróbicos totales (RTMA) y los hongos y levaduras filamentosos (RTCHL), así como microorganismos específicos (*E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*) (65)

Procedimiento

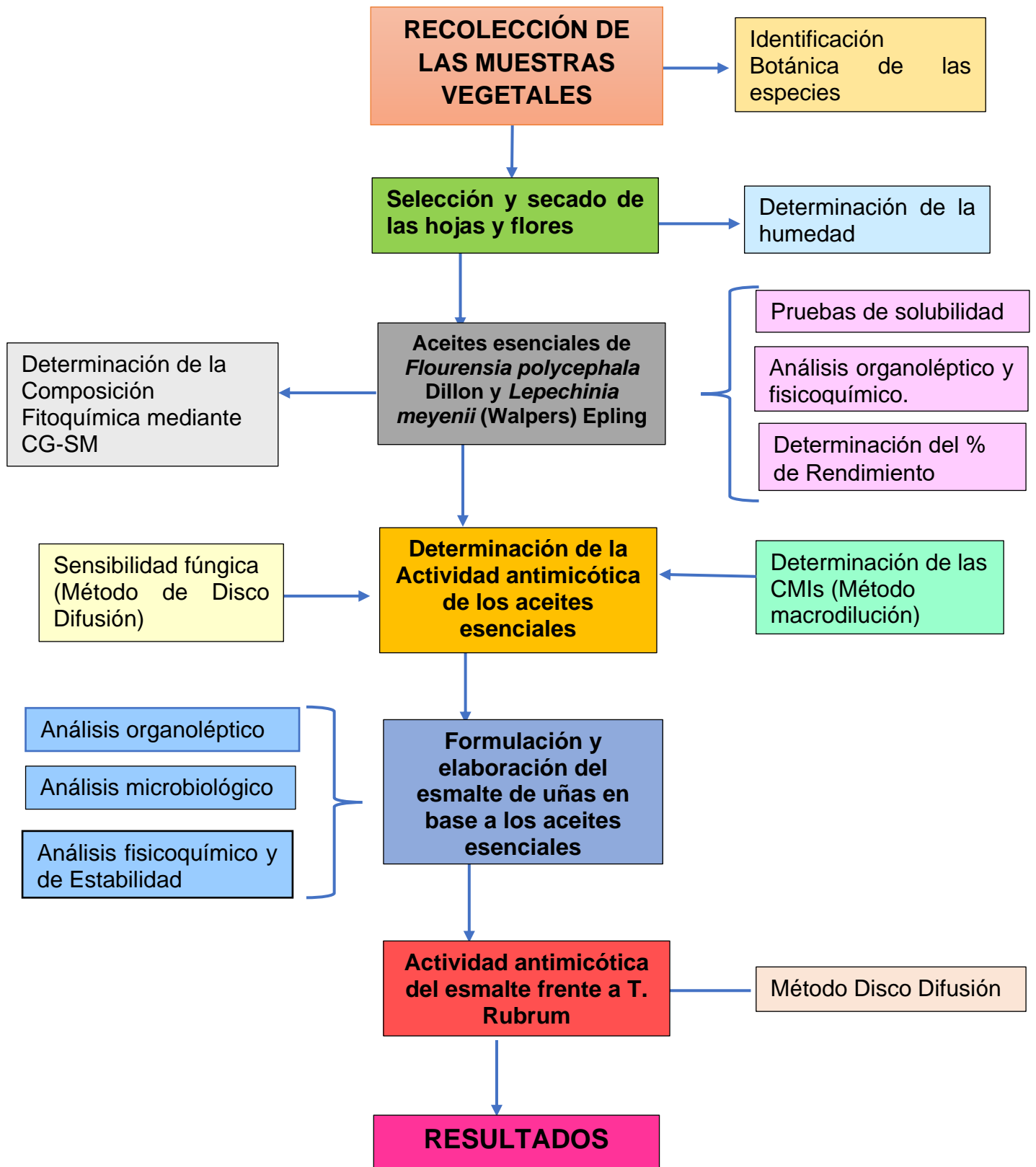
Se prepararon Agar Nutritivo para la determinación de Aerobios, agar Mac Conkey para *P. aeruginosa* y *E. coli*, Agar Manitol para *S. aureus* y Agar Sabouraud para hongos y levaduras. Se cultiva el esmalte de uñas formulado (Ver Fotografías 38 y 39)

Tabla 18. Especificaciones microbiológicas

Área de aplicación	Recuento Total de Microorganismos Aerobios (ufc/g o ufc/mL)	Recuento Total Combinado de Hongos Filamentosos Y Levaduras (ufc/g o ufc/mL)	Microrganismos Específicos
Productos cosméticos susceptibles de contaminación microbiológica.	5x10 ³	10 ¹	Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> (1g o 1 mL)
			Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosas</i> (1g o 1 mL)
			Ausencia de <i>Escherichia coli</i> (1g o 1mL)

Fuente: Comunidad Andina. Reglamento técnico andino sobre especificaciones técnicas microbiológicas de productos cosméticos. (2019) (65)

Flujograma 2. Procedimiento de la Investigación



Fuente: Elaboración propia

3.6. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

En el presente trabajo de investigación, la técnica utilizada para evaluar los indicadores de las variables de estudio será la observación directa, así mismo, se realizará también el registro fotográfico.

Los instrumentos de recolección de datos, son elaborados por el propio investigador, tales como:

- Anexo N°1 CERTIFICADO DE IDENTIFICACION BOTANICA DE LAS ESPECIES
- Anexo N°2 ANÁLISIS CROMATOGRAFICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lepechinia meyenni* (Walpers) Epling
- Anexo N°3 ANÁLISIS CROMATOGRAFICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Flourensia polycephala* Dillon
- Anexo N°4 CONDICIONES DE ANALISIS CROMATOGRAFICO DE LOS ACEITES ESENCIALES
- Anexo N°5 CERTIFICADO DE ANALISIS DE *Trichophyton rubrum* ATCC 28188
- Anexo N°6 INSTRUCCIONES DE ACTIVACION DE LA CEPA ATCC 28188
- Anexo N°7 AGAR SABOURAUD DEXTROSA
- Anexo N°8 CALDO SABOURAUD DEXTROSA
- Anexo N°9 CERTIFICADO DE ANALISIS DEL HIDROXIPROPILQUITOSANO
- Anexo N°10 FICHA DE RECOLECCION DE LAS ESPECIES VEGETALES
- Anexo N°11 FICHA DE RECOLECCION DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD
- Anexo N°12 FICHA DE RECOLECCION DE LAS CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES
- Anexo N°13 FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOTICA DE LOS ACEITES ESENCIALES POR EL METODO DE DISCO DIFUSION
- Anexo N°14 FICHA DE RECOLECCION DE DATOS DEL METODO DE MACRODILUCION PARA DETERMINAR LA CMI DE LOS ACEITES ESENCIALES
- Anexo N°15 FICHA DE RECOLECCION DE LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ESMALTE DE UÑAS
- Anexo N°16 FICHA DE RECOLECCION DEL CONTROL DE CALIDAD DEL ESMALTE DE UÑAS

- Anexo N°17 FICHA DE RECOLECCION DEL TIEMPO DE SECADO DEL ESMALTE DE UÑAS
- Anexo N°18 FICHA DE RECOLECCION DEL MODELO DE PENETRACIÓN DE UÑA
- Anexo N°19 ARCHIVO FOTOGRAFICO

3.7. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE DATOS

Para procesar los datos obtenidos en la investigación se utilizarán los softwares que se mencionan a continuación:

- Microsoft Office Excel 2016:
- Paquete estadístico Statistical Package For Social Sciencies (SPSS) versión 10.0.

A nivel descriptivo se organizarán los datos mediante tablas estadísticas y se representarán mediante diagrama de columnas y diagrama de cajas.

La evaluación de la hipótesis del estudio se realizará con un 95% de confianza, mediante la prueba estadística paramétrica de análisis de varianza (ANOVA), se realizarán las pruebas posteriores para las comparaciones múltiples de los tratamientos mediante la prueba de Tukey

CAPITULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1. DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE *Flourensia polycephala* Dillon y *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling

Cuadro 1. Porcentaje de humedad de las hojas de *Flourensia polycephala* Dillon y *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling

Especies Vegetales	N° de determinaciones	Peso de la muestra fresca	Peso de la muestra seca	% de humedad	Promedio de % de humedad
<i>Flourensia polycephala</i> Dillon	1	5,005 g	1,289 g	74,25 %	74,16 %
	2	5,001 g	1,294 g	74,13 %	
	3	5,008 g	1,296 g	74,12 %	
<i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling	1	5,009 g	1,685 g	66,36 %	66,71 %
	2	5,004 g	1,665 g	66,73 %	
	3	5,006 g	1,650 g	67,04 %	

Fuente: Datos experimentales del estudio (Ver Anexo 11)

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

En el cuadro 1 el porcentaje de humedad obtenido de *Flourensia polycephala* Dillon presenta un promedio del 74.16% mientras que *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling tiene un promedio de 66.71%.

En el estudio de Achahuanco et al. (11), sobre *F. polycephala* obtuvieron un porcentaje de humedad de 67.21 % y en comparación al dato obtenido de las muestras 74.16 % esta diferencia se debe a la zona y época de recolección, ya que según el estudio de Castro (19), quien obtuvo un porcentaje de humedad de 72,53% de la misma especie en estudio muestra similitud por recolección en la misma localidad lo que respalda los datos obtenidos de acuerdo al porcentaje de humedad de esta especie dentro de la región.

El porcentaje de humedad de que *L. meyenii* encontrado en el estudio local de Torres et al. (12), fue de 66.3% el cual concuerda con el resultado de este estudio de 66,71 %, cabe destacar que no hay gran diferencia significativa lo cual indica que a este porcentaje se mantienen sus compuestos activos

El contenido de humedad influye el rendimiento de aceites esenciales, así como en sus compuestos farmacológicamente activos, el porcentaje de humedad está sujeto al tipo de secado, ubicación geográfica, época de recolección, permitiendo mantener el porcentaje de contenido de sus metabolitos activos del aceite esencial (75)

4.2. DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE RENDIMIENTO DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Flourensia polycephala* Dillon y *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling

Cuadro 2. Determinación del porcentaje de rendimiento de los aceites esenciales

ESPECIE	PESO DE HOJAS Y FLORES SECAS	ACEITE EXTRAIDO	% DE RENDIMIENTO DE ACEITE ESENCIAL
<i>Flourensia polycephala</i> Dillon	4000gr	50.79ml	1.26%
<i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling	4000gr	46.72ml	1.16%

Fuente: Datos experimentales del estudio (Ver Anexo 12)

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

La importancia de hallar el porcentaje de extracción es que nos permite conocer la cantidad necesaria de materia prima que necesitaremos para la ejecución de las diferentes pruebas en la investigación. En el cuadro se muestra los datos obtenidos a partir de la extracción de hojas de *F. polycephala* Dillon y *L. meyenii* (Walpers) Epling por el método de arrastre por vapor, siendo de 1.26% y 1.16% respectivamente.

Para *L. meyenii*, Huaraca (33), mostro un rendimiento del 0,87 % y Calderón (27) de 0.07%, mientras que para *F. polycephala* Dillon el porcentaje de extracción obtenido por maceración con etanol al 70% fue de 52.10% (11) Por ende, podemos afirmar que los rendimientos son variables de acuerdo con los factores que inciden en la producción, como fertilidad del suelo, disponibilidad de agua, temperatura, etc

Según los Criterios Fitoquímicos que describe Bandoni (86), el Rendimiento de esencia sobre peso seco de la parte útil, un valor >1% la categoriza como alto porcentaje de rendimiento cuyas especies aromáticas se considerarían promisorias.

Como se puede observar estas dos especies poseen un alto porcentaje de extracción y entre ellas la diferencia es mínima, lo cual nos indica que estas plantas son buenas materias primas para la realización del trabajo de investigación.

4.3. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES

Cuadro 3. Características organolépticas de los aceites esenciales

CARACTERÍSTICAS	<i>Flourensia polycephala</i> Dillon	<i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling
APARIENCIA	Oleosa	Oleosa
OLOR	Característico	Característico
COLOR	Amarillento intenso PMS 3955*	Amarillento pálido PMS 3935*
SABOR	Amargo	Amargo-Afrutado

Fuente: Datos experimentales del estudio (Ver Anexo 13)

*Códigos de color según la escala de Pantone (87)

ANÁLISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

La caracterización organoléptica mediante el análisis sensorial da resultados en el cuadro 3 donde el aceite esencial de *Flourensia polycephala* tiene un color amarillento intenso con código PMS 3955, mientras que *Lepechinia meyenii* es amarillento pálido con código PMS 3935, dichos códigos según la escala de colores de Pantone (87); ambos de apariencia oleosa, los aceites presentan un olor característico a cada variedad vegetal de las que provenían y un sabor amargo (86). Dado a la elaboración de un esmalte de uñas las características organolépticas son fundamentales ya que influyen en la aceptación del producto final sea en aplicaciones cosméticas como terapéuticas.

En comparación con los resultados de Calderón (27), sobre el color del aceite esencial de *Lepechinia meyenii*, donde indica que es de color amarillo intenso frente al aceite esencial de *Minthostachys mollis* Griseb que es de un color amarillo tenue. Los resultados obtenidos muestran que *Lepechinia meyenii* tiene una coloración menos intensa frente a *Flourensia polycephala*. En dicho estudio también afirma que posee un olor característico lo que corrobora el resultado obtenido en esta investigación.

4.4. ANÁLISIS FISICOQUÍMICO DE LOS ACEITES ESENCIALES

Cuadro 4. Propiedades fisicoquímicas de los aceites esenciales

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS	ACEITE ESENCIAL DE <i>Flourensia polycephala</i> Dillon	ACEITE ESENCIAL DE <i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling
Densidad	0.8589g/ml	0.9284g/ml
Índice de refracción	1.4709	1.4766
Índice de saponificación	17.952	21.695
Índice de acidez	6.947	3.477
Rotación óptica	0.086°	-0.032°

Fuente: Datos experimentales del estudio (Ver Anexo 11)

ANÁLISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

En el cuadro se muestra los resultados de densidad, índice de refracción, índice de saponificación, índice de acidez y rotación óptica; para la determinación de estas propiedades se trabajaron de acuerdo a las normas ISO estipuladas para aceites esenciales

En cuanto a la densidad se puede ver que el aceite de puna salvia es mayor (0.9284g/ml) respecto a la densidad del aceite esencial de pauca (0.8589g/ml). Según Calderón (27), el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* mostró una densidad de 0.8677 g/mL mientras que para Huaraca (33) de 0,942. Por su lado Bandoni (86) indica que la temperatura de trabajo es normalmente a 20 °C y casi todas las esencias poseen una densidad menor que el agua (densidad <1)

Esta determinación permite algunas veces deducir acerca de la composición de los aceites, los que son más ligeros que el agua es generalmente rica en hidrocarburos terpenicos, alcoholes, esterres y cetonas como posiblemente serán la composición tanto de puna salvia como el de pauca (79)

Respecto al índice de refracción de los aceites esenciales se usa para controlar la pureza y la calidad, debido a que cada tipo de aceite esencial posee un índice de refracción característico, los valores oscilan entre 1,46 y 1,61 a 20°C, y en algunos casos puede revelar la presencia de productos extraños (80). En general los resultados del índice de refracción de los aceites esenciales de *L. meyenii* y *F. polycephala*, son similares estos valores indica un mayor grado de saturación, con la razón cis/trans de los dobles enlaces que puede estar influenciado por el daño que sufre el aceite tras la oxidación.

El análisis de índice de acidez es un referente para determinar el grado de enranciamiento (deterioro del aceite en contacto con el aire, humedad, temperatura, tiempo), este índice es menor cuanto más largo son los ácidos grasos componentes de los glicéridos de la grasa. Por lo tanto, son de alto cuidado en la conservación.

Según las normas ISO en la determinación del índice de acidez de grasas y aceites vegetales crudos oscila entre 1 a 4. Se puede observar que el de puna salvia está dentro de estos parámetros y el de pauca ligeramente elevado sin embargo es menor a 10 donde también se considera óptimo por no ser aceite refinado (82)

El índice de saponificación ofrece una medida del peso molecular promedio de los triglicéridos que constituye la grasa. Las grasas que contienen ácidos grasos de cadena corta consumen más KOH en su saponificación mostrando IS más grandes y las que poseen ácidos grasos de cadena larga consumen menos álcali exhibiendo valores pequeños de Índice de saponificación (78)

Por último, en cuanto a la rotación óptica se dice que La mayoría de los aceites esenciales son ópticamente activos (desvían el plano de polarización de la luz), siendo un isómero óptico el que predomina, ayuda a determinar alguna adulteración al contener sustancias inactivas. Siendo levógiras (L) o Dextrógiras (D). su magnitud garantiza que el aceite no este mezclado con otros productos, sin embargo, este parámetro es variable y cambia de un año a otro, o época de colecta de las especies. Un estudio determina para el aceite de *L. meyenii* que posee una rotación óptica Levógira (L) -10,6 (11), al igual que el nuestro con un valor de -0.032° , el de pauca es Dextrogira.

4.5. DETERMINACION DE LAS PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DE LOS ACEITES ESENCIALES

Se utilizó diferentes solventes de diversa polaridad para las pruebas de solubilidad de los aceites esenciales, obteniéndose lo siguiente:

Cuadro 5. Grado de solubilidad de los aceites esenciales

SOLVENTE	GRADO DE SOLUBILIDAD	
	<i>Flourensia polycephala</i> Dillon	<i>Lepechinia meyenii</i> (Walpers) Epling
Agua destilada	+	+
Etanol 40%	+	+
Etanol 70%	+	+
Etanol 96%	+++	+++
Metanol	+++	+++
Cloroformo	+++	+++
Tween 80	++	++
Dimetilsulfoxido (DMSO)	+++	+++

Donde:

- +++: Totalmente
- ++ : Parcialmente Soluble
- + : Poco soluble
- - : Insoluble

Fuente: Datos experimentales del estudio (Ver Anexo 11)

ANALISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Se puede apreciar en el cuadro que el grado de solubilidad de los aceites esenciales tanto de *Flourensia polycephala* como *Lepechinia meyenii* en diferentes solventes, son totalmente solubles en metanol, cloroformo, Dimetilsulfoxido (DMSO) y etanol al 96%, sin embargo, presentan poca solubilidad en agua destilada y etanol al 70% y 40%, además son parcialmente solubles en tween 80.

La capacidad de estos aceites esenciales de ser solubles en compuestos orgánicos se debe a la alta polaridad de los mismos. Además, la solubilidad de las esencias en alcohol, da una idea de su contenido en monoterpenos. Cuando el aceite esencial solubiliza a menor porcentaje de alcohol, menor será el contenido de monoterpenos y mayor será su contenido de compuestos oxigenados, como alcoholes o fenoles (3)

Los aceites esenciales estudiados muestran mayor solubilidad en solventes orgánicos apolares o semipolares, esta prueba es relevante para continuar con la determinación de los siguientes objetivos ya que nos muestra el solvente a ser utilizado tanto en las diluciones de los aceites esenciales para obtener las concentraciones deseadas y determinar la actividad antimicótica, así como para la formulación del esmalte de uñas puesto que ayuda a identificar los vehículos adecuados para el desarrollo del mismo

4.6. DETERMINACION DE LA COMPOSICION QUIMICA DE LOS ACEITES ESENCIALES POR EL METODO DE CROMATOGRAFIA DE GASES ACOPLADO A ESPECTROMETRIA DE GASES

Cuadro 6. Composición química del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling

Pico	TR	Compuestos orgánicos volátiles (VOC) Librería Nist 11	CAS	Qual	Área	Contenido Relativo %
1	8.10	.alpha.-Pinene	000080-56-8	97	4347093	4.7
2	9.55	(-)-β-Pinene	018172-67-3	97	16948485	18.4
3	9.86	3-Carene	013466-78-9	96	7302521	7.9
4	10.71	α-Terpinene	000099-86-5	97	955485	1.0
5	10.84	D-Limonene	005989-27-5	99	3312192	3.6
6	11.54	beta-Thujene	028634-89-1	91	2544207	2.8
7	11.86	.gamma.-Terpinene	000099-85-4	95	3880758	4.2
8	12.43	Eucalyptol	000470-82-6	99	3014161	3.3
9	12.58	Terpinolene	000586-62-9	96	705892	0.8
10	12.90	o-Cymene	000527-84-4	97	1656531	1.8
11	16.16	1-Octen-3-yl-acetate	002442-10-6	90	824524	0.9
12	19.71	.alfa.-Copaene	1000360-33-0	99	731333	0.8
13	20.80	(-)-alpha-Gurjunene	000489-40-7	99	1160935	1.3
14	21.24	Guaiol	000489-86-1	97	4253703	4.6
15	22.45	Terpinen-4-ol	000562-74-3	97	556373	0.6
16	23.00	(-)-trans-Pinocarveol	000547-61-5	72	1474430	1.6
17	24.00	cis-isopinocampone	015358-88-0	96	1349404	1.5
18	24.53	(+)-epi-Bicyclosesquiphellandrene	054274-73-6	92	451586	0.5
19	26.64	(+)-delta-Cadinene	000483-76-1	95	3591424	3.9
20	26.95	alpha-amorphene	000483-75-0	98	1402565	1.5
21	29.49	(+)-Bulnesol	022451-73-6	93	849299	0.9
22	36.70	Guaiol	000489-86-1	99	5825803	6.3
23	38.28	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-	150320-52-8	93	570168	0.6
24	39.23	.alpha.-Bisabolol	000515-69-5	90	482693	0.5
25	39.62	(+)-Bulnesol	022451-73-6	95	1379783	1.5
26	39.83	Epiglobulol	1000150-05-1	80	453734	0.5
27	40.34	gamma-Eudesmol	001209-71-8	95	504135	0.5

Qual = Porcentaje de coincidencia con la base de datos Nist 11

CAS = Numero para identificar la molécula

TR = Tiempo de Retención, tiempo al cual son detectados (ver cromatograma)

Nota: Los resultados expresa en contenido relativo de compuestos orgánicos volátiles en % presentes en la muestra, se reporta solo la coincidencia más del 70% (Qual) con la base de datos espectrales de National Institute of Standards and Technology versión 11 (NIST v11)

Fuente: Datos obtenidos en el laboratorio de Cromatografía y Espectrometría-UNSAAC (Ver anexo 2)

Cuadro 7. Composición Química del aceite esencial de *Flourensia polycephala* Dillon

Pic o	TR	Compuestos orgánicos volátiles (VOC) Librería Nist 11	CAS	Qual	Área	Contenid o Relativo %
1	7.95	Santolina triene	002153-66-4	98	1892943 1	24.8
2	8.12	.alpha.-Pinene	000080-56-8	97	8496656	11.1
3	9.53	.beta.-Pinene	000127-91-3	97	1121305	1.5
4	9.73	Sabinene	003387-41-5	91	1622597	2.1
5	9.97	.beta.-Myrcene	000123-35-3	94	9536740	12.5
6	10.3 5	.alpha.-Phellandrene	000099-83-2	91	454351	0.6
7	10.8 6	D-Limonene	005989-27-5	99	1355504 6	17.8
8	11.5 4	beta-Thujene	028634-89-1	91	3036698	4.0
9	18.7 0	delta-Elemene	020307-84-0	96	2065796	2.7
10	23.9 6	Caryophyllene	000087-44-5	99	1253067	1.6
11	24.7 4	2-Isopropenyl-4a,8- dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7- octahydronaphthalene	1000192-43-5	94	542275	0.7
12	25.0 4	.beta.-curcumene	1000374-17-4	93	5087074	6.7
13	26.7 7	alpha-Selinene	000473-13-2	99	2064387	2.7
14	27.0 6	.beta.-copaene	1000374-18-9	95	1097440	1.4
15	27.3 9	alpha-Curcumene	000644-30-4	97	499233	0.7
16	27.9 2	1,5,5-Trimethyl-6- methylene-cyclohexene	000514-95-4	89	577592	0.8
17	30.3 1	.gamma.-Elemene	029873-99-2	91	517376	0.7
18	38.5 2	.gama.-eudesmol	1000374-18-5	99	3193043	4.2
19	40.8 2	beta-Eudesmol	000473-15-4	99	1585286	2.1

Qual = Porcentaje de coincidencia con la base de datos Nist 11

CAS = Numero para identificar la molécula

TR = Tiempo de Retención, tiempo al cual son detectados (ver cromatograma)

Nota: Los resultados expresa en contenido relativo de compuestos orgánicos volátiles en % presentes en la muestra, se reporta solo la coincidencia más del 70% (Qual) con la base de datos espectrales de National Institute of Standards and Technology versión 11 (NIST v11)

Fuente: Datos obtenidos en el laboratorio de Cromatografía y Espectrometría-UNSAAC (Ver anexo 4)

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

En el cuadro N° 6 y 7, se observan los resultados de la composición química de los aceites esenciales, estos se expresan en contenido relativo de compuestos orgánicos volátiles en % presentes en la muestra, se reporta solo la coincidencia más del 70% (Qual) con la base de datos espectrales de National Institute of Standards and Technology versión 11 (NIST v11)

Para *L. meyenii* se observa que el (-)- β -Pinene (18.4%) es el componente mayoritario, seguidos del Guaiol (10.9%), 3-Carene (7.9%), α -Pinene (4.7%), γ -Terpinene (4.2%), (+)-delta-Cadinene (3.9%), D-Limonene (3.6%) y Eucalyptol (3.3%), componentes que se le puede atribuir la actividad antimicótica del aceite esencial de *L. meyeri*.

Por su parte el aceite esencial de *F. polycephala* mostro como componente mayoritario a la Santolina triene (24.8%), seguidos del D-Limonene (17.8%), beta-Myrcene (12.5%), α -Pinene(11.1%), β -curcumene (6.7%).

Tenorio (12), arrojo resultados obtenidos del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* componentes como: β -pineno (6,82 %), canfeno (13,0 %), 3-careno (5,24 %)

Calderón (27), mostro al β -pineno (22.96%) como componente mayoritario, seguido de 3-careno (19.45%) y α -Pineno (12.48%).

Huaraca (33), determino a los hidrocarburos sesquiterpenicos la fracción principal de (55,73 %). Guaiol (16,32%), α -Pineno (1,96%), D-Limoneno (6,48%),

En nuestros aceites esenciales también se encontraron hidrocarburos sesquiterpenicos en mayor proporción tales como el guaiol, β -pineno, limoneno, α -pineno, y hidrocarburos monoterpenicos tales como mirceno, trieno de santolina, para *L. meyenii* y *F. polycephala* respectivamente. Los terpenoides presentan actividades antifúngicas relevantes que deberían incorporarse al estudio de la química medicinal.

Asimismo, se encontraron variaciones mininas en cuanto al contenido en porcentaje de los componentes de las especies estudiadas esto debido al lugar de procedencia, altitud, método de extracción entre otros

Cuando se estudian las actividades biológicas de los compuestos presentes en los aceites esenciales, además de comprender la acción de los componentes mayoritarios

de forma aislada, es importante considerar la acción sinérgica de sus moléculas constituyentes, ya que es posible que la actividad atribuida a los componentes principales pueda ser modulada por los componentes menores presentes en el aceite y que actúan en penetración, distribución celular y fijación de los componentes principales en las paredes y membranas (87). La acción antifúngica de los aceites puede probarse, pero su acción aún no está bien dilucidada. Hay acuerdo en que la mayoría de los compuestos aromáticos y fenólicos generan sus efectos mediante su acción directa en la membrana citoplasmática, causando cambios en su estructura y función. Se sostiene que la actividad antifúngica no se atribuye a un mecanismo concreto, sino a la existencia de múltiples metas en la célula, como la inhibición de la filamentación, desaparición de la matriz extracelular, eliminación del biofilm e inhibición del er No todos estos instrumentos logran metas independientes, algunos pueden involucrarse en la señalización o en respuestas en cadena. Aunque la interacción individual entre un metabolito secundario y otro sea mínima e inespecífica, la eficacia de la interacción individual de un metabolito secundario es menor (87).

4.7. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOTICA IN VITRO POR EL METODO DE DISCO DIFUSION FRENTE A *T. rubrum*.

4.7.1. Determinación de la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de *Flourensia polycephala* Dillon

Cuadro 8. Lectura de los halos de inhibición obtenidos del aceite esencial de *Flourensia polycephala* Dillon

HALOS DE INHIBICION (mm) DEL ACEITE ESENCIAL DE PHAUKA FRENTE A <i>T. rubrum</i>				
Concentración del aceite esencial de (%)	Diámetros de los halos de inhibición (mm)			
	I	II	III	PROMEDIO
TERBINAFINA	24.9	29.625	32.745	29.09
90	22.39	28.14	24.5	25.01
80	19.2	19.69	18.07	18.99
70	19.77	14.7	17.51	17.33
50	13.6	14.2	15.46	14.42
30	10.64	14.08	14.88	13.2
20	12.78	10.4	11.39	11.52
10	6	6	6	6
ETANOL 96°	6	6	6	6

Fuente: Datos experimentales del estudio (Ver Anexo 13)

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

En el cuadro se observan los resultados de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones de aceite esencial de Pauca frente a *T. rubrum*. Según las categorías interpretativas por la CLSI (49) , halos inferiores a 14 mm son resistentes al antifúngico el caso del aceite esencial al 10%, 20%, 30% y 50% así como del etanol, nuestro solvente. Y halos de inhibición entre 15 mm a 19mm intermedio o susceptible-dependiente dosis, que a una concentración del 70% y 80% del aceite observamos tales mediciones; y susceptible o sensible igual o superior a 20 mm, el caso del aceite esencial al 90% y del fármaco patrón (29.09mm)

Si bien esta especie no está estudiada como aceite esencial, ACHAHUANCO (11) en su estudio con extracto etanólico y glicólico, presenta halos máximos obtenidos que fueron de 18.43mm y 14.43mm a 13 mg/25ul y 4mg/25ul frente a *Staphylococcus aureus* respectivamente.

Cuadro 9. Estadísticas descriptivas de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esencial de Pauca, frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

	N	Media	Desviación Estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
TERBINAFINA (+)	3	29.090	3.950	19.278	38.902	24.900	32.745
90	3	25.010	2.909	17.784	32.236	22.390	28.140
80	3	18.987	0.831	16.923	21.050	18.070	19.690
70	3	17.327	2.540	11.017	23.636	14.700	19.770
50	3	14.420	0.949	12.062	16.778	13.600	15.460
30	3	13.200	2.253	7.604	18.796	10.640	14.880
20	3	11.523	1.196	8.553	14.493	10.400	12.780
10	3	6.000	0.000	6.000	6.000	6.000	6.000
ETANOL 96° (-)	3	6.000	0.000	6.000	6.000	6.000	6.000

Fuente: Datos estadísticos del Estudio

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

En el cuadro, se observa que el diámetro promedio de los halos de inhibición (mm) del aceite esencial de *Flourensia Polycephala* Dillion frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 disminuye cuanto menor es el grado de concentración del aceite esencial de Pauca (%).

Cuadro 10. Análisis de varianza de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esenciales de Pauca, frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1478.766	8	184.846	43.089	0.000
Dentro de grupos	77.218	18	4.290		
Total	1555.984	26			

Fuente: Datos estadísticos del Estudio

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

Al 95% de confiabilidad considerando el ANOVA donde $\text{sig} = 0.000 < 0.05$, se afirma que los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esenciales *Flourensia polycephala*, presenta diferencias estadísticamente significativas frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

Dado que existen diferencias en los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esenciales de *Flourensia polycephala* Dillon se utilizó la prueba POS HOC de TUKEY para determinar los grupos de similitud.

Cuadro 11. Comparación de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esencial de Pauca, frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

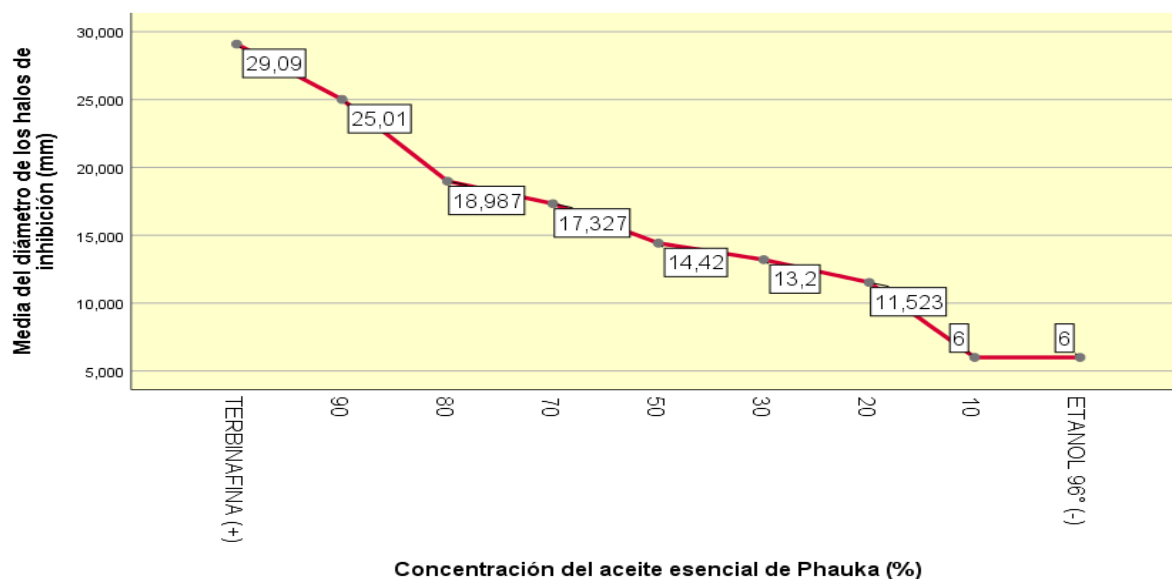
HSD Tukey					
Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
ETANOL 96° (-)	3	6.00000			
10	3	6.00000			
20	3	11.52333	11.52333		
30	3		13.20000	13.20000	
50	3		14.42000	14.42000	
70	3		17.32667	17.32667	
80	3			18.98667	
90	3				25.01000
TERBINAFINA (+)	3				29.09000
Sig.		0.079	0.058	0.059	0.334
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.					
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.					

Fuente: Datos estadísticos del Estudio

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

Según la prueba TUKEY se observa que la medida de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esenciales de *Flourensia polycephala* Dillon, presenta similitud respecto al etanol 96°, la concentración al 10% y al 20%, también hay similitud en los diámetros de los halos de inhibición (mm) cuando la concentración es al 20%, 30%, 50% y 70%, en el tercer grupo de similitud en los diámetros de los halos de inhibición (mm) se encuentran la concentración del 30%, 50%, 70% y 80%, y en el cuarto grupo de similitud se encuentra la concentración al 90% y la Terbinafina.

Figura 8. Comparación de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esenciales de *F. polycephala* Dillon, frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.



Fuente: Datos estadísticos del Estudio

4.7.2. Determinación de la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling

Cuadro 12. Lectura de los halos de inhibición obtenidos del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling

HALOS DE INHIBICION (mm) DEL ACEITE ESENCIAL DE PUNA SALVIA FRENTE A <i>T. rubrum</i>				
Concentración del aceite esencial de (%)	Diámetros de los halos de inhibición (mm)			
	I	II	III	PROMEDIO
TERBINAFINA	24.9	29.625	32.745	29.09
90	31.13	31.54	29.59	30.75
80	24.02	28.15	31.26	27.81
70	26.67	22.75	25.39	24.94
50	24.58	21.8	27.42	24.6
30	27.12	23.33	22.25	24.23
20	15.17	11.55	18.3	15.01
10	11.04	13.65	11.93	12.21
ETANOL 96°	6	6	6	6

Fuente: Datos experimentales del estudio (Ver Anexo 13)

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

En el cuadro se observan los resultados de halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de Puna salvia; que según las categorías interpretativas por la CLSI (49) Determinamos que a concentración de 10% del aceite esencial es resistente(12.21 mm) , al 20% posee actividad intermedia o susceptible-dependiente a la dosis con halo de inhibición de 15,01mm y a partir de 30% susceptible o sensible ya que los halos de inhibición son superiores a 24.23mm llegando incluso a tener halos próximos al fármaco patrón(29.09mm).

URCUHUARANGA (16), en su estudio con extracto hidroalcohólico de puna salvia al 50mg/ml determino 19.4 mm de diámetro para *C. glabrata* y 18 mm para *C. albicans*; por su parte Tenorio (12), hallo un halo de inhibición de $10,0 \pm 1$ mm frente a *Cándida albicans* a 30 μ L de aceite esencial

Merma (18), en su estudio indica que el aceite esencial de cjuñuca frente a *T. rubrum* presenta halos de inhibición al 10% de 9.33mm al 15% 14.72, 25% de 19.47 y al 50% de 26.14mm

Por su parte Velázquez (17), en su investigación del aceite esencial de orégano frente a *T. rubrum* presenta actividad a partir del aceite esencial al 70% con un halo de inhibición de 9.75mm al 85% de 11.80mm y al 100% 13.65%

Por lo tanto, podemos decir que el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling presento mayores halos de inhibición a concentraciones inferiores que la del aceite esencial de *Flourensia polycephala* Dillon y de otras especies vegetales frente a *T. rubrum*

Los resultados muestran que conforme disminuye la concentración de aceite también disminuye la inhibición de los microorganismos. Este método es cualitativo y son aquellos procedimientos que nos permiten clasificar directamente a un microorganismo como sensible o resistente, confirmando la sensibilidad antifúngica de estos aceites frente a *Trichophyton rubrum*.

Cuadro 13. Estadísticas descriptivas de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esenciales de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling, frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

	N	Media	Desviación Estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
TERBINAFINA (+)	3	29.090	3.950	19.278	38.902	24.900	32.745
90	3	30.753	1.028	28.199	33.307	29.590	31.540
80	3	29.810	5.628	15.830	43.790	24.020	35.260
70	3	24.937	1.999	19.971	29.902	22.750	26.670
50	3	24.600	2.810	17.619	31.581	21.800	27.420
30	3	24.233	2.558	17.880	30.587	22.250	27.120
20	3	15.007	3.378	6.615	23.398	11.550	18.300
10	3	12.207	1.327	8.911	15.503	11.040	13.650
ETANOL 96° (-)	3	6.000	0.000	6.000	6.000	6.000	6.000

Fuente: Datos estadísticos del Estudio

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

En el cuadro, se observa que el diámetro promedio de los halos de inhibición (mm) del aceite esenciales de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (puna salvia), frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 disminuye cuanto menor es el grado de concentración del aceite esencial de Puna Salvia (%).

Cuadro 14. Análisis de varianza de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esenciales de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling, frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

ANOVA					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1826.599	8	228.325	25.708	0.000
Dentro de grupos	159.866	18	8.881		
Total	1986.466	26			

Fuente: Datos estadísticos del Estudio

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

Al 95% de confiabilidad considerando el ANOVA donde $\text{sig} = 0.000 < 0.05$, se afirma que los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esenciales de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling, presenta diferencias estadísticamente significativas frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

Dado que existen diferencias en los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esenciales de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling se utilizó la prueba POS HOC de TUKEY para determinar grupos de similitud

Cuadro 15. Comparación de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esenciales de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling, frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

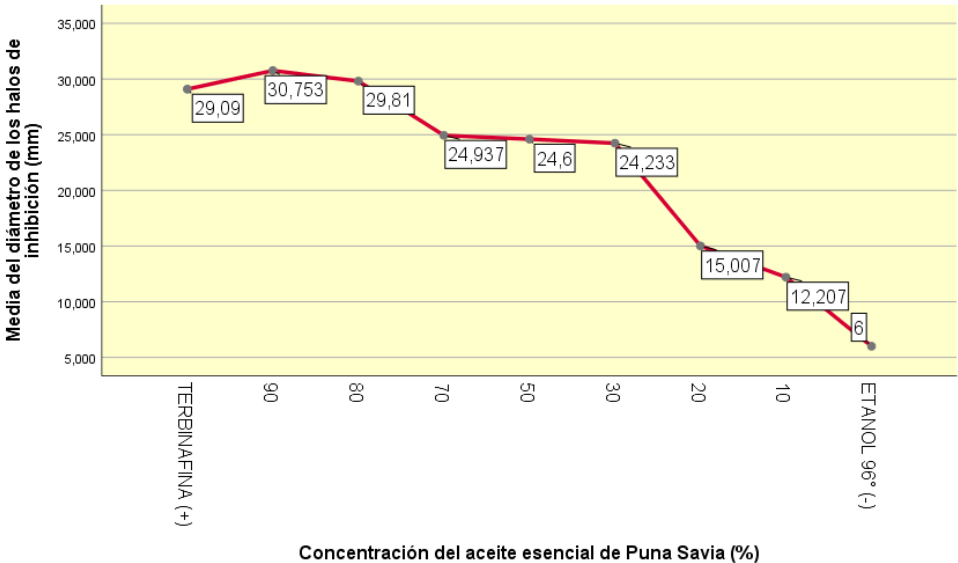
HSD Tukey ^a				
concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
ETANOL 96° (-)	3	6.00000		
10	3	12.20667	12.20667	
20	3		15.00667	
30	3			24.23333
50	3			24.60000
70	3			24.93667
TERBINAFINA (+)	3			29.09000
80	3			29.81000
90	3			30.75333
Sig.		0.272	0.957	0.222
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.				
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.				

Fuente: Datos estadísticos del Estudio

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

Según la prueba TUKEY se observa que la medida de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esenciales de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling presenta similitud respecto al etanol 96° y la concentración al 10%, también hay similitud en los diámetros de los halos de inhibición (mm) cuando la concentración es al 10 y 20, como tercer grupo de similitud en los diámetros de los halos de inhibición (mm) se encuentran todas aquellas con concentración de 30 en adelante, incluyendo la Terbinafina.

Figura 9. Comparación de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esencial de *Lepechinia meyenii*, frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 de acuerdo a la concentración.



Fuente: Datos estadísticos del Estudio

4.8. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA POR EL METODO DE MACRODILUCION

Seguidamente se procedió a determinar la CMI de los aceites esenciales mediante el método de macrodilución ya que es un método cuantitativo

4.8.1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Flourensia polycephala* Dillon

Cuadro 16. Concentración mínima inhibitoria obtenida del aceite esencial de *Flourensia polycephala* Dillon

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DEL ACEITE ESENCIAL DE PHAUKA FRENTE A <i>T. rubrum</i> DE ACUERDO A LA TURBIDEZ			
DILUCION	CONCENTRACION (v/v)	CONCENTRACION (En porcentaje)	OBSERVACION
C(+)	Terbinafina 0.624ug/ml		SIN TURBIDEZ
C1	900ul/ml	90%	
C2	800ul/ml	80%	
C3	700ul/ml	70%	
C4	500ul/ml	50%	TURBIDEZ
C5	300ul/ml	30%	
C6	200ul/ml	20%	
C7	100ul/ml	10%	
C(-)	Etanol 96°		

Fuente: Datos experimentales del estudio (Ver Anexo 14)

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

En el cuadro observamos el Grado de turbidez que se presenta en los tubos de la inhibición de crecimiento del aceite esencial de pauca frente a *T. rubrum* esto a diferentes concentraciones. Determinada por inspección visual según las normas de la CLSI, para esta metodología (50).

En general, para los antifúngicos fungistáticos, la CMI debe ser la concentración más baja de antifúngico que produce una reducción aparente del crecimiento del hongo ($\geq 50\%$), comparada con el crecimiento control. Para los antifúngicos fungicidas, la CMI es la concentración más baja de antifúngico que inhibe el crecimiento del hongo, o lo que es lo mismo, que produce una reducción del 100% del crecimiento (50). La lectura se hace visualmente en dermatofitos a los 4 días a 7 de incubación comparando la turbidez de los tubos con la del control.

Podemos observar que la turbidez es mayor a un 0.09g/ml y va disminuyendo hasta la concentración de 0.43g/ml. A partir de una concentración de 0.60g/ml visualmente no se observa turbidez. Por ende, consideramos una CMI de 0,60g/ml, estos resultados son similares al método de disco difusión donde se observa que a esta concentración es sensible.

Sayago (15), determina que el extracto etanólico de *F. fiebrigii* revela actividad antifúngica frente a aislamiento de *T. rubrum* valores de concentración mínima inhibitoria de 6.25 µg EAG/mL y Concentración mínima antifúngica de 100 µg EAG/mL. Achahuanco (11), donde utilizo extracto Etanólico 70% y Glicólico, mediante el método de pozos excavados obtuvo una CMI de 0.368mg/25uL y 0.13mg/25uL para *S. aureus* y 0.34mg/25uL y 0.84mg/25uL respectivamente sobre *P. acnés*.

4.8.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling

Cuadro 17. Concentración mínima inhibitoria obtenida del aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DEL ACEITE ESENCIAL DE PUNA SALVIA FRENTE A <i>T. rubrum</i> DE ACUERDO A LA TURBIDEZ			
DILUCION	CONCENTRACION (v/v)	CONCENTRACION (En porcentaje)	OBSERVACION
C(+)	Terbinafina 0.624ug/ml		SIN TURBIDEZ
C1	900ul/ml	90%	
C2	800ul/ml	80%	
C3	700ul/ml	70%	
C4	500ul/ml	50%	
C5	300ul/ml	30%	
C6	200ul/ml	20%	TURBIDEZ
C7	100ul/ml	10%	
C(-)	Etanol 96°		

Fuente: Datos experimentales del estudio (Ver Anexo 13)

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

En el cuadro se observa los grados de turbidez del aceite esencial *Puna salvia* a diferentes concentraciones. A diferencia del aceite esencial de Pauca se puede ver que este no presenta turbidez a una concentración mucho menor (a partir de 300ul/ml) es por ello que consideramos como CMI a esta concentración para la formulación del esmalte de uñas junto al CMI del aceite esencial de Pauca *que* es de (700ul/ml).

Ramírez et al. (13), determino actividad del aceite esencial de *Lepechinia mutica Benth* frente a *T. rubrum* de $2,2 < CMI \leq 4,5$ mg/ml y $CMF > 9$ mg/ml

Finamente Urcuhuaranga (16), hallo una concentración mínima inhibitoria frente a *C. glabrata* de 12,5 mg/mL y Concentración Fungicida Mínima de 25 mg/m; para *C. albicans* fue de 25 mg/mL y 50 mg/ml respectivamente.

4.9. PREFORMULACIONES DE LOS ESMALTES DE UÑAS

Cuadro 18. Preformulaciones del esmalte de uñas

Componentes de la Preformulación	PF-1 (% p/p)	PF-2 (% p/p)	PF-3 (% p/p)	PF-4 (% p/p)
Agua purificada	51%	51%	51%	29.9%
Etanol 90%	41.5%	45%	42%	58%
Aceite esencial de Phauka	5%	0.5%	0.5%	0.5%
Aceite esencial de Puna Salvia				
Hidroxipropil quitosano	0.5%	1%	2%	5%
Acetato de etilo	0.5%	1%	2%	4.1%
Ácido láctico	0.5%	1%	2%	2%
Dimetilsulfoxido (DMSO)	1%	0.5%	0.5%	0.5%
TOTAL	100%	100%	100%	100%

*PF : Preformulación

*%p/p : Porcentaje peso a peso

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANALISIS E INTERPRETACION DE DATOS

Se realizaron varias preformulaciones, de acuerdo a las patentes por Mailland (85), donde cada vez se obtuvo de estar cerca al esmalte ideal, En cuadro se resumen 4 de las preformulaciones donde se varió la composición ya que no se alcanzaba un esmalte con las características ideales tales como viscosidad, pH estabilidad y aspecto que se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 19. Características organolépticas y fisicoquímicas de las preformulaciones

Características organolépticas y fisicoquímicas	PF-1	PF-2	PF-3	PF-4
Color	Lechoso	Semilechoso	Amarillo blanquecino	Amarillo transparente
Olor	Característico	Característico	Característico	Característico
Aspecto	Acuoso	Acuoso semilechoso	Viscoso	Viscoso
pH	3.52	3.65	3.4	3.5
Estabilidad	Separación de fases se tornó lechoso	Separación de fases	No hay separación de fases	No hay separación de fases

*PF : Preformulación

Fuente: Datos experimentales del estudio

En la preformulación 1, se llegó a observar que el esmalte de uñas era de consistencia muy acuosa, de aspecto lechoso y con separación de fases a las 2 horas, esto debido a que no hubo buena dispersión de los aceites esenciales a los excipientes

En la preformulación 2, se llegó a observar que el esmalte de uñas era de consistencia muy acuosa, de aspecto semilechoso y con separación de fases a la media hora, esto debido a que no hubo buena dispersión de los aceites esenciales en los excipientes

En la preformulación 3, se llegó a observar que el esmalte de uñas era de consistencia un poco viscosa, de aspecto amarillo blanquecino y sin separación de fases, sin embargo, aún no cumplía con el aspecto adecuado.

En la preformulación 4, se llegó a observar que el esmalte de uñas era de consistencia viscosa, de aspecto amarillo transparente y sin separación de fases, sin embargo, el pH llegó a ser muy ácido.

Por tanto, en base esta última preformulación se consigue la base del esmalte ideal que con algunas modificaciones mínimas se procedió a formular los siguientes esmaltes.

4.10. FORMULACION Y ELABORACION DEL ESMALTE DE UÑAS CON LA MEZCLA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE *Flourensia polycephala* Dillon y *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling

Cuadro 20. Formulación del esmalte de uñas ideal

HPCH al 5%	Concentración de los aceites esenciales en función de la CMI [70/30]		
Componentes de la formula	Aceites 0.5%	Aceites 1%	Aceites 2%
	Porcentaje %	Porcentaje %	Porcentaje %
Agua purificada	29,9 %	28,9%	26,9%
Etanol 90%	58%	58%	58%
Aceite esencial de Pauca	0.5%	1%	2%
Aceite esencial de Puna Salvia			
Hidroxipropil quitosano	5%	5%	5%
Acetato de etilo	6%	6%	6%
Ácido láctico	0.1%	0.1%	0.1%
Dimetilsulfoxido (DMSO)	0.5%	1%	2%
TOTAL	100%	100%	100%

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Se formulo el esmalte base de acuerdo a la patente europea (85), respecto al principio activo que debe componer la formulación este indica que el extracto de hierba se puede usar solo o puede ser una mezcla de diferentes extractos. La cantidad preferida del componente está en el rango de 0,1 a 15 % en peso, más preferiblemente de 0,5 a 10 % en peso de la composición total. Al ser estos aceites esenciales y no extractos se prefirió formular con los porcentajes mínimos referidos en la patente, ya que al trabajar con una concentración de más del 5% además de no presentar buenas

características organolépticas y fisicoquímicas, que se observaron en las preformulaciones, estas podrían presentar toxicidad.

En las diferentes composiciones del esmalte se trabajó con una mezcla 1:1 de principio activo; es decir 50/50 de aceite esencial de *L. meyenii* y *F. polycephala* respectivamente; ajustando el diluyente en la formulación total.

Para las siguientes formulaciones se optó por la adición de ácido láctico en proporción al aceite, ya que cumple la función de dar estabilidad al pH, así mismo de facilitar la rápida disolución del HPCH en agua y agitación, optimiza el proceso de la elaboración del esmalte al reducir la cantidad de horas de agitación, de 12 horas a 3 horas hasta completa homogenización.

En las presentaciones de concentración de aceites al 0.5%, 1% y 2% se evaluaron los atributos como aspecto, pH, suavidad para fluir, tiempo de secado y estabilidad acelerada. Las 3 formulaciones mostraron buenas características que se presentan a continuación además de evaluar la actividad antimicótica del esmalte formulado

4.10.1. Parámetros organolépticos, pH y estabilidad

Cuadro 21. Características organolépticas y fisicoquímicas del esmalte de uñas

CARACTERISTICAS		Esmalte-1	Esmalte-2	Esmalte-3
Organolépticas	Color	Amarillo Transparente	Amarillo transparente	Amarillo transparente
	Olor	Característico	Característico	Característico
	Aspecto	Homogéneo	Homogéneo	Homogéneo
pH		5.313	5.009	5.161
Estudio de estabilidad		Estable	Estable	Estable

Fuente: Datos experimentales del estudio (Ver Anexo 16)

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

Posterior a la formulación de los esmaltes con la mezcla de los aceites esenciales, realizamos evaluaciones organolépticas, fisicoquímicas y de estabilidad. En el cuadro podemos observar que es de color amarillo transparente. Olor característico a esmalte

comercial (acetato de etilo) con la esencia característica de los aceites, un olor agradable. De aspecto homogéneo viscoso.

Respecto al pH es ligeramente ácido y tienden hacia la neutralidad, estos valores resultan ser adecuados para la aplicación por su compatibilidad con el pH de la placa ungueal humana que es entre 4.7-5.5 (71), impidiendo el desarrollo de microorganismos patógenos y que el esmalte no comprometa la integridad de las uñas.

El estudio de estabilidad se desarrolló según la ONUDI (67) mediante estudios de estabilidad acelerada En un tiempo de 15 días donde se llevó el esmalte a condiciones de temperatura de 40°C, y se observa y analiza si ocurren cambios organolépticos, fisicoquímicos y microbiológicos donde se observa que el esmalte es estable sin alterarse alguna característica y que estos parámetros estén dentro de los límites permisibles.

4.11. EVALUACION IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOTICA DEL ESMALTE DE UÑAS FRENTE A *T. rubrum*

Cuadro 22. Lectura de halos de inhibición obtenidos del esmalte de uñas

HALOS DE INHIBICIÓN DEL ESMALTE DE UÑAS DE LOS ACEITES ESENCIALES DE PUNA SALVIA Y PHAUKA FRENTE A <i>T. rubrum</i>					
ESMALTE CON HPCH al 5%	Concentración de los aceites esenciales en la formulación	DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICION (mm)			
		I	II	III	PROMEDIO
Esmalte base		6	6	6	6
E-1	0.5%	12.81	15.14	15.58	14.51
E-2	1%	15.71	18.87	16.25	16.94
E-3	2%	22.88	22.01	18.65	21.18
Ciclopirox 8%		28.62	27.01	28,45	27.815

Fuente: Datos experimentales del estudio (Ver Anexo 15)

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En el cuadro se observa los halos de inhibición de los tres esmaltes con hidroxipropilquitosano al 0.5%, y concentraciones de aceite al 0.5% 1% y 2%.

Respecto a los resultados el esmalte con aceite esencial al 0.5% tiene un halo de inhibición de 14.51mm, al 1% diámetro de 16.94mm y al 2% de 21.18mm, este último es superior a los demás y el más próximo al esmalte patrón (ciclopirox) que es de 27.82mm, respecto al esmalte base no posee actividad antifúngica como tal (6mm) tomándolo como control negativo

Velasque (17), es su estudio considera que el esmalte formulado con aceite esencial de orégano obtuvo un halo promedio de 15.19 mm.

Como se puede observar podemos afirmar que los esmaltes elaborados poseen actividad antifúngica en las tres concentraciones, sin embargo el esmalte al 2% es sumamente sensible, por lo cual es eficaz para inhibir el crecimiento de los hongos en las uñas frente a *T.rubrum*

Cuadro 23. Estadísticas descriptivas de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del esmalte de uñas con los aceites esenciales de Puna salvia y Pauca frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

	N	Media	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Esmanlte base	3	6.000	0.000	6.000	6.000	6.000	6.000
0.5%	3	14.510	1.489	10.812	18.208	12.810	15.580
1%	3	16.943	1.690	12.745	21.142	15.710	18.870
2%	3	21.180	2.234	15.631	26.729	18.650	22.880
Ciclopirox 8%	3	28.027	0.885	25.829	30.224	27.010	28.620
a. modelo = Aceite esenciales							

Fuente: Datos estadísticos del Estudio

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

En el cuadro 21, se observa que el diámetro promedio de los halos de inhibición (mm) del esmalte de uñas de los aceites esenciales de Puna Salvia y Phauka frente a a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188, el Ciclopirox con diámetro promedio de 28.027 ± 0.885 es mayor, seguido por la concentración del esmalte al 3% con diámetro promedio de 21.180 ± 2.234, y en menor diámetro promedio se da con 0.5% de concentración de 14.510 ± 1.489.

Cuadro 24. Análisis de varianza de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del esmalte de uñas con los aceites esenciales de Puna salvia y Pauca frente a a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	797.136	4	199.284	91.877	0.000
Dentro de grupos	21.690	10	2.169		
Total	818.826	14			
a. modelo = Aceite esenciales					

Fuente: Datos estadísticos del Estudio

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

Al 95% de confiabilidad considerando el ANOVA donde sig = 0.000 < 0.05, se afirma que de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del aceite esenciales de esmalte de uñas con los aceites esenciales de Puna Salvia y Pauca presenta diferencias estadísticamente significativas frente a a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

Dado que existen diferencias en los diámetros de los halos de inhibición (mm) de esmalte, se utilizó la prueba POS HOC de TUKEY para determinar los grupos de similitud.

Cuadro 25. Comparación de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del esmalte de uñas con los aceites esenciales de Puna salvia y Pauca frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

HSD Tukey					
concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
Esmanlte base	3	6.0000			
0.5%	3		14.5100		
1%	3		16.9433		
2%	3			21.1800	
Ciclopirox 8%	3				28.0267
Sig.		1.000	0.322	1.000	1.000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.					

Fuente: Datos estadísticos del Estudio

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

Según la prueba TUKEY se observa que la medida de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del esmalte de uñas presenta similitud cuando se usa la concentración del 0.5% y del 1%; como segundo grupo existe similitud de los diámetros de halos de inhibición (mm) cuando la concentración es del 1% y del 2% y como tercer grupo respecto a ciclopirox 8%.

Figura 10. Comparación de los diámetros de los halos de inhibición (mm) del esmalte de uñas



Fuente: Datos estadísticos del Estudio

4.12. CARACTERIZACION DEL ESMALTE DE UÑAS FORMULADO

4.12.1. Tiempo de secado

Cuadro 26. Tiempo de secado del esmalte de uñas

ESMALTE CON HPCH al 5%	Concentración de los aceites esenciales en la formulación	TIEMPO DE SECADO			
		I	II	III	PROMEDIO
E-1	0.5%	3min 20s	3 min 40s	4 min	3min 40seg
E-2	1%	3min 42s	3min 25s	4min 1s	3min 43seg
E-3	2%	3min 49s	3min 34s	3min 54s	3min 46seg
Ciclopirox 8%		3min 15s	3min 34s	3min 49s	3min 33seg

Fuente: Datos experimentales del estudio (Ver Anexo 17)

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

En el cuadro se puede observar el tiempo de secado de las tres formulaciones donde todas están alrededor de 3 minutos 40 segundos, incluido el esmalte patrón.

Según la normatividad de la FDA y del Manual de Cosméticos de la FDA (74) el intervalo es de 3 minutos hasta 7 minutos,

Velasque (17), en la formulación de su esmalte determino un tiempo de secado de 4 minutos 39 segundos. En otros estudios el tiempo de secado de las lacas se encontró en un rango de 54-68 segundos, excepto otras que tienen mayor tiempo de secado debido al potenciador de permeación utilizado, que disminuye la volatilidad de la laca preparada (88)

La combinación de disolventes y diluyentes son los que determinan el tiempo de secado y la viscosidad del producto, un tiempo de secado bastante corto impide que la película se forme uniformemente en la uña evitando su homogeneidad, y cuarteamiento de la película por lo que se define la importancia de esta mezcla en la formulación de esmaltes (55)

Si bien nuestro esmalte cumple con el tiempo de secado adecuado este también se debe al excipiente que se utilizaron en la formación de película que le brinda un aspecto más denso y viscoso.

4.12.2. Suavidad para fluir

Cuadro 27. Tiempo de la suavidad para fluir del esmalte de uñas

ESMALTE CON HPCH al 5%	Concentración de los aceites esenciales en la formulación	SUAVIDAD PARA FLUIR (segundos)			
		I	II	III	PROMEDIO
E-1	0.5%	23	24	17	21.33
E-2	1%	31	33	31	31.67
E-3	2%	35	33	34	34
Ciclopirox 8%		15	20	21	18.66

Fuente: Datos experimentales del estudio

ANALISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En el cuadro se muestran los resultados del parámetro suavidad por fluir se llevó a cabo según la oficina de normatividad de la India IS9245:1994 (72), El cual está relacionado con la viscosidad del mismo. Indica que se debe comparar con el esmalte patrón.

El esmalte 1, tuvo un tiempo de fluidez de 21 segundos debido a la poca concentración de aceite esencial por tanto suele ser menos viscoso ya que en su composición posee mayor cantidad de agua, baja cantidad de sólidos y la evaporación de solventes es rápida. El esmalte patrón también es de aspecto más acuoso es por ello que también demora 18.66 segundos en recorrer la lámina de portaobjetos.

Los esmaltes 2 y 3, poseen una fluidez mayor entre 31 y 34 segundos, debido a la película de hidroxipropilquitosano que es más viscosa, ahí la diferencia de fluidez

4.12.3. Modelo de penetración de uña

Cuadro 28. Halos de inhibición en modelo de penetración de uñas del esmalte

HALOS DE INHIBICION EN MODELO DE PENETRACION DE UÑA FRENTE A <i>T. rubrum</i>					
ESMALTE CON HPCH al 5%	Concentración de los aceites esenciales en la formulación	DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICION (mm)			
		I	II	III	PROMEDIO
Esmalte base		8.32	7.64	6.21	7.39
E-1	0.5%	14.85	24.08	22.78	20.57
E-2	1%	21.29	25.89	23.65	23.61
E-3	2%	26.83	26.07	27.21	26.70
Ciclopirox 8%		26.7	31.75	36.05	31.50

Fuente: Datos experimentales del estudio (Ver Anexo 18)

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

En el cuadro se puede observar los resultados de una prueba de un modelo penetración invitó en uñas humanas del principio activo y la potenciación de permeabilidad del hidroxipropilquitosano ya que la concentración de aceite es la

mínima inhibitoria, donde además se puede comprobar un mayor halo de inhibición a diferencia de los aceites esenciales puros.

Podemos ver que a mayor concentración de aceite mejor es el halo de inhibición en las placas con agar Sabouraud frente a *T. rubrum*, es así que podemos afirmar que, si existe penetración a través de las uñas de las tres formulaciones, siendo el esmalte con mejor resultado es el de aceite esencial al 2% en la formulación total (26.70 mm), cercano al esmalte patrón de ciclopirox que hoy en día es el medicamento con mejores resultados, asimismo se puede ver también que a diferencia de los resultados en la prueba de actividad antimicótica como tal, el esmalte base posee actividad antifúngica bien mínima (7.39mm), esto debido a la estructura ungueal que por tanto evidencia halos mayores del esmalte en uña, confirmando la potenciación en la permeabilidad del hidroxipropilquitosano.

Mailland (5), realiza un estudio de permeabilidad en uñas bovinas donde concluye que se obtuvo un crecimiento completo y sostenido de los hongos en las uñas con control negativo y con placebo. La aplicación de las composiciones de un 1 %, un 4 % y un 8 % de terbinafina con hidroxipropil quitosano al 0.3%, en las uñas no infectadas fue capaz de prevenir el crecimiento fúngico halos de inhibición frente a *T. rubrum* superiores a 40mm. Velasque (17), en su esmalte elaborado formo un halo de 11.95 mm.

El esmalte formulado tiene buena capacidad de penetración a través de las uñas por los resultados obtenidos.

Cuadro 29. Estadísticas descriptivas de los diámetros de los halos de inhibición (mm) en el modelo de penetración de uña frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

	N	Media	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
				Límite inferior	Límite superior		
Esmanlte base	3	7.390	1.077	4.715	10.065	6.210	8.320
0.5%	3	20.570	4.996	8.159	32.981	14.850	24.080
1%	3	23.610	2.300	17.896	29.324	21.290	25.890
2%	3	26.703	0.580	25.261	28.145	26.070	27.210
Ciclopirox 8%	3	31.500	4.680	19.874	43.126	26.700	36.050

Fuente: Datos estadísticos del Estudio

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

En el cuadro, se observa que el diámetro promedio de los halos de inhibición (mm) en el modelo de penetración de uña, frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188 es mayor cuando se usa el Ciclopirox 8% con promedio de 31.5 ± 4.680 mm, seguido por la concentración al 2% con diámetro promedio de 26.703 ± 0.580 y menor puntuación promedio se tiene cuando la concentración es del 0.5% con puntuación promedio de 20.570 ± 4.996 mm.

Cuadro 30. Análisis de varianza de los diámetros de los halos de inhibición (mm) en el modelo de penetración de uña frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

Diámetros					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	991.351	4	247.838	23.097	0.000
Dentro de grupos	107.304	10	10.730		
Total	1098.654	14			
a. modelo = modelo de penetración					

Fuente: Datos estadísticos del Estudio

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

Al 95% de confiabilidad considerando el ANOVA donde $\text{sig} = 0.031 < 0.05$, se afirma que los diámetros de los halos de inhibición (mm) en modelo de penetración de uña presenta diferencias estadísticamente significativas frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188.

Dado que existen diferencias en los diámetros de los halos de inhibición (mm) en modelo de penetración de uña, se utilizó la prueba POS HOC de TUKEY para determinar los grupos de similitud.

Cuadro 31. Comparación de los diámetros de los halos de inhibición (mm) en el modelo de penetración de uña frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188

HSD Tukey				
Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Esmalte base	3	7.3900		
0.5%	3		20.5700	
1%	3		23.6100	23.6100
2%	3		26.7033	26.7033
Ciclopirox 8%	3			31.5000
Sig.		1.000	0.224	0.085

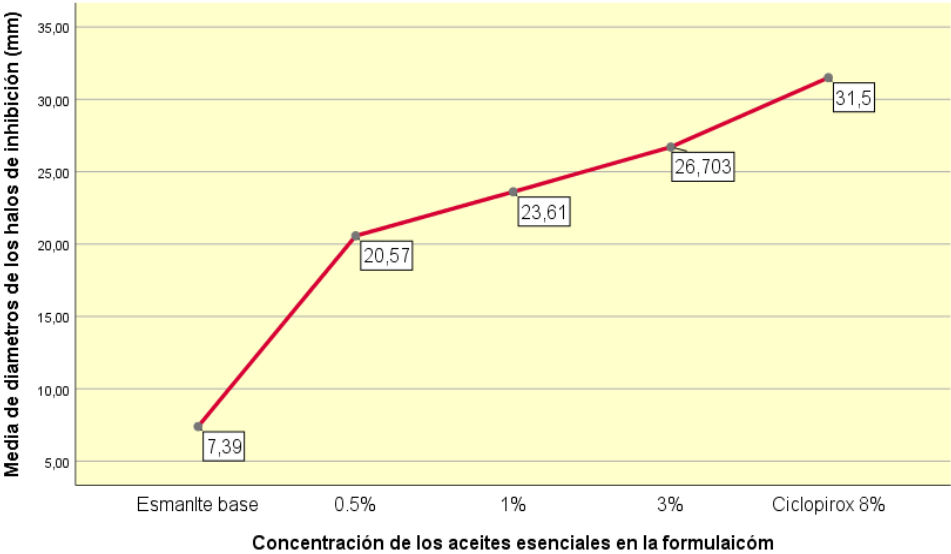
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Fuente: Datos estadísticos del Estudio

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

Según la prueba TUKEY se observa que la medida de los diámetros de los halos de inhibición (mm) en modelo de penetración de uña, presenta similitud respecto a la concentración de aceite al 0.5%, al de 1% y al de 3%, como segundo grupo existe similitud en los diámetros de los halos de inhibición (mm) cuando la concentración es al 1%, al 2% y ciclopirox 8%.

Figura 11. Comparación de los diámetros de los halos de inhibición (mm) en el modelo de penetración de uña frente a *Trichophyton rubrum* ATCC 28188



Fuente: Datos estadísticos del Estudio

4.12.4. Control microbiológico del esmalte de uñas

Cuadro 32. Control microbiológico del esmalte de uñas

Microorganismos	Limite biológico permisible máximo	E-1	E-2	E-3
Recuento Total combinado de hongos filamentosos y levaduras	10 UFC/ml	< 10UFC/ml	<10 UFC/ml	<10 UFC/ml
Recuento Total de microorganismos mesófilos aerobios totales	10UFC /ml	<10UFC/ml	<10UFC/ml	< 10UFC/ml
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausencia en 1ml	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia en 1ml	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>Escherichia coli</i>	Ausencia en 1ml	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Datos experimentales del estudio (Ver Anexo 16)

ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

En el cuadro se puede observar el control microbiológico de los esmaltes que se realizaron por el método de recuento en placa de microorganismos que generalmente contaminan este tipo de formulaciones

De acuerdo a los resultados mostrados, los esmaltes con aceite esencial al 0.5%, 1% y 2% se encuentran dentro de los límites biológicos máximos permisibles según la comunidad andina (65), ya que no se observa ningún tipo de crecimiento, por ende, podemos afirmar que los esmaltes están libres de contaminación microbiológica.

CONCLUSIONES

1. Se formuló el esmalte de uñas con la mezcla de los aceites esenciales de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) y *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (Puna salvia), en base a su Concentración mínima Inhibitoria y se evaluó su actividad antimicótica in vitro frente a *Trichophyton rubrum*, mediante el método de Disco difusión, siendo el esmalte de hidroxipropilquitosano al 5% y una concentración total de aceite esencial al 2%, la que presento mayor actividad antimicótica a diferencia de los demás esmaltes formulados.
2. Se determinó el porcentaje de humedad siendo para el aceite de *Flourensia polycephala* Dillon de 74.16% y *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling de 66.71%, los valores de porcentaje de rendimiento fueron de 1.26% y 1.16% respectivamente, concluyendo que tienen alto porcentaje de rendimiento
3. Se evaluó las características organolépticas y fisicoquímicas de los aceites esenciales. El aceite esencial de *Flourensia polycephala* Dillon (pauca) tiene una apariencia oleosa, un olor característico, un color amarillento intenso y sabor amargo, en cuanto a las propiedades fisicoquímicas estas se encuentran dentro de los valores permitidos y son propios de un aceite esencial, es totalmente soluble en etanol al 96°, metanol, cloroformo y DMSO.
Para el aceite esencial de *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (puna salvia), este tiene una apariencia oleosa, un olor característico, un color amarillento palido y un sabor amargo-afutado, sus propiedades fisicoquímicas con similares a los de pauca con un índice de acidez menor (3.477). *L. meyenii* posee una rotación óptica Levógira (L) -0.032° , el de pauca es Dextrógira (D) 0.086° . Es totalmente soluble en DMSO, cloroformo, etanol 96° y metanol
4. Se determinó la composición química de los aceites esenciales, para *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling en componentes mayoritarios se encontró al β -Pinene (18.4%), guaiol (10.9%), 3-Carene (7.9%) por otra parte para *F. polycephala*, a Santolina triene (24.8%), D-limonene (17.8%), β -Myrcene(12.5%), α - Pinene (11.1), los compuestos mayoritarios son los hidrocarburos monoterpenicos y sesquiterpénicos; determinándose la acción antifúngica de estos dos aceites no solo por los componentes mayoritarios sino también por la acción sinérgica de sus moléculas constituyentes, dado que la suma de todas las interacciones puede conducir a dicho efecto.

5. Se determinó la actividad antimicótica in vitro de cada aceite esencial, por los métodos de Disco difusión y el método de macrodilución para hallar la concentración mínima inhibitoria frente a las cepas ATCC de *Trichophyton rubrum*. El aceite esencial de *Flourensia polycephala* Dillon (Pauca) mostro sensibilidad de 17.33 mm a una CMI de 700ul/ml, y *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (puna salvia) mostro sensibilidad de 24.23 mm a una concentración mucho menor que es de 300ul/ml
6. En base a las Concentraciones mínimas Inhibitorias de los aceites esenciales de *Flourensia polycephala* Dillon (pauca) y *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling (puna salvia), se diseñaron y preformularon los esmaltes de uña, llegando a formular 3 esmaltes de uña que presentaron mejores características organolépticas y fisicoquímicas con buena estabilidad
7. Se evaluó la actividad antimicótica in vitro mediante el método de disco difusión de estas 3 formulaciones de esmalte de uñas, llegando a la conclusión que el esmalte 3 con aceite esencial al 2% e hidroxipropilquitosano al 5% además de presentar estabilidad y buenas características, presentó el mayor halo de inhibición que fue de 21.18 mm superior a los 20 mm y cercano al esmalte patrón (27.82 mm), en comparación con el esmalte al 0.5% de aceite esencial y el esmalte al 1% donde los diámetros de halos de inhibición fueron de 14.51mm y 16.94mm respectivamente.
8. Se evaluó las características organolépticas del esmalte de hidroxipropilquitosano al 5% con aceite esencial al 2%, donde este presenta color amarillo transparente, olor característico y de aspecto homogéneo. El pH (5,161) se encuentra dentro de la especificación del pH de la placa ungueal humana. Las evaluaciones al esmalte terminado cumplen con las especificaciones establecidas, tiempo de secado (3min 46seg), suavidad para fluir (34 segundos), penetración de uñas (26.70 mm). Así mismo con este último parámetro podemos concluir que el hidroxipropil quitosano potencia la permeabilidad en uñas y el principio activo es liberado para una actividad antimicótica efectiva.

En términos generales los valores de estos parámetros se encuentran dentro de los rangos en comparación con el esmalte patrón de ciclopirox al 8%. En el

control microbiológico no se evidenció presencia de microorganismos contaminantes en el esmalte.

RECOMENDACIONES

A LAS AUTORIDADES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD”

- Promover e incentivar la profundización del estudio de plantas de nuestra región mediante concursos de proyectos tanto a nivel regional como nacional
- Mejorar en la gestión de documentación como parte de la optimización de los tiempos establecidos en el TUPA
- Gestionar la adquisición de equipos modernos y accesorios para la mejora de las investigaciones futuras.

“A LA ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA”

- Se sugiere estimular la investigación experimental a través de concursos entre estudiantes de la escuela profesional
- Fomentar la colaboración entre las diversas áreas de la escuela profesional para fomentar el estudio de plantas autóctonas de nuestra ciudad
- Impulsar la actualización y renovación de equipos, y reactivos de laboratorio.

“A LOS DOCENTES Y ESTUDIANTES DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA”

- Se recomienda conducir investigaciones profundas de toxicología de los aceites de Pauca y Puna Salvia para evaluar los efectos de los productos cosméticos basados en los mismos.
- Se sugiere estudiar la viabilidad de llevar el producto a escala industrial mediante un ensayo clínico in vivo, para evaluar la aceptación.
- Fomentar la formulación de productos dermatológicos y desarrollar una línea completa para el tratamiento de la onicomycosis a base de productos naturales

DEL ESTUDIO

- Al realizar la evaluación antimicótica, el hecho de trabajar con hongos supone un riesgo de contaminación ya que es influenciada por factores tales como tamaño del inóculo, temperatura, composición del medio, tiempo de incubación, por ello se recomienda a los investigadores trabajar en condiciones de total esterilidad durante el desarrollo de la evaluación de sensibilidad, para evitar contaminaciones de otros microorganismos ambientales que puedan interferir en el ensayo.
- Se recomienda hacer estudio de estabilidad a largo plazo en el esmalte elaborado, así se obtendrá datos más reales con relación a la estabilidad del producto tomando en cuenta el tiempo de conservación.
- Se recomienda evaluar otras características propias del esmalte de uñas, tales como durabilidad, resistencia. Así como conferirle color para obtener un esmalte mas estético e incluso se podría incluir otros excipientes que mejoren sus características.
- Durante el proceso de la formulación y elaboración del esmalte es crucial mantener la inocuidad del producto, trabajando bajo las normas de las Buenas prácticas de Manufactura (BPM) y las Buenas prácticas de higiene (BPH)
- Se recomienda hacer el estudio del efecto fungistático in vitro de los aceites esenciales de Pauca y Puna salvia, ya que supone un potencial en la búsqueda de alternativas naturales para el control de hongos.

BIBLIOGRAFIA

1. Vipin k, Chandran S, Augusty A, Premaletha K, Kuriakose M. Formulación y evaluación de una laca de uñas antifúngica para la onicomicosis. Boletín biomédico británico. 2014 Marzo; 2(1).
2. Organización Panamericana de la Salud. Situación de las plantas medicinales en Perú. Informe de reunión del grupo de expertos en plantas medicinales. Lima: OPS; 2018. Report No.: OPS/PER/19-001.
3. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Guía sobre aceites esenciales en productos cosméticos Madrid: Dirección Europea para la Calidad del Medicamento y la Asistencia Sanitaria del Consejo de Europa; 2018.
4. García Carmona F, Pascual Huerta , Fernández Morato D, Trincado Villa , Arcas Lorente C. Anatomía quirúrgica ungueal. Revista Española de Podología. 2015; 26(2).
5. Mailland F, inventor; Carvajal I, assignee. Uso de quitosanos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias de las uñas. España patent ES2394169T3. 2013 Enero 23.
6. Bodman , Krishnamurthy. National Library of Medicine. [Online].; 2023 [cited 2023 Julio 25. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441853/>.
7. Ameen M, Lear J, Mádan V, Mohd Mustapa MF, Richardson M, Hughes JR. Directrices de la Asociación Británica de Dermatólogos para el tratamiento de la onicomicosis. Revista Británica de Dermatología. 2014 Noviembre; 171(5).
8. Davila Calderon GR. Factores de riesgo y perfil clínico-epidemiológico de onicomicosis. Tesis. Trujillo: Universidad César Vallejo, Facultad de ciencias de la salud; 2023.
9. Shari , Scher. Onicomicosis: descripción clínica y diagnóstico. PubMed. 2018 Junio; 80(4).
10. Montero Recalde M, Morocho Núñez , Avilés Esquivel D, Carrasco Cando , Erazo Gutierrez. Eficacia antimicrobiana del aceite esencial de eucalipto (*Eucalyptus* spp) sobre cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* subsp. aureus. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2019 Junio; 30(2).
11. Achahuanco Casa N, Aragón Portugal PS. Actividad antibacteriana In Vitro de los extractos Etanólico y Glicólico de las hojas de la especie vegetal *Flourensia Polycephala* M. O. Dillon (Phauca) sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Propionibacterium acnés*. Tesis para Optar al Título Profesional.

Cusco: Universidad nacional de San Antonio Abad del Cusco, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2015.

12. Tenorio Roca E, Quispe Silva M. Determinación fitoquímica y actividad antimicrobiana del aceite esencial de los órganos aéreos de *Lepechinia meyenii* (Walp.) Epling "pacha salvia". Tesis para optar al título profesional. Lima: Universidad Norbert Wiener, Escuela académica profesional de farmacia y bioquímica; 2018.
13. Ramirez J, Gilardoni G, Jacomé M, Montesinos J, Rodolfi M, Guglielminetti,. Composición química, análisis enantiomérico, evaluación sensorial AEDA y actividad antifúngica del aceite esencial de la planta Ecuatoriana *Lepechinia mutica* Benth (Lamiaceae). *Chemistry & Biodiversity*. 2017 Diciembre; 14(12).
14. Levario Alvidrez MP, Valero Galván J. Efecto inhibitorio de las hojas de *Flourensia cernua* con el extracto acuoso, etanólico y metónico sobre *Cándida albicans*, *Cándida glabrata* y *Cándida tropicalis*. Tesis de Licenciatura. Juárez: Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, Departamento de Ciencias Químicas y Biológicas; 2022.
15. Sayago J, Luján C, Carrizo L, Isla M. Actividad antidermatofítica de una planta nativa del NOA. República Argentina: Universidad Nacional de Tucumán, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia; 2022.
16. Urcuhuaranga Balbin L. Actividad anti *Candida* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lepechinia meyenii*. Tesis para optar al título profesional. Ayacucho: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Escuela de Formación Profesional de Farmacia; 2011.
17. Velazque JC. Evaluación de la actividad antimicótica del esmalte de uñas elaborado usando el aceite esencial del *Origanum vulgare* L. (Orégano) frente *Trichophyton rubrum* ATCC 28188. Tesis para optar al título profesional. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2019. Report No.: 253T20190613.
18. Merma Ccana C. Evaluación de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Clinopodium brevicalyx* (Cjuñuca), formulación de una emulsión tópica y evaluación *in vitro* de su actividad antimicótica sobre cepas ATCC de *Trichophyton rubrum*. Tesis para optar al título profesional. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2017.
19. Castro V. Actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólico y cloroformico de *Flourensia polycephala* Dillon (Phauka) Y elaboración de una forma farmacéutica tópica para su evaluación *in vivo* en infecciones dérmicas por *Staphylococcus aureus* en ratones. Tesis para optar al título profesional. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2011.

20. Recurso Taxonómico cooperativo para las Myrtaceae americanas. [Online]. [cited 2024 enero 24. Available from: <https://cotram.org/taxa/index.php?tid=48803&taxauthid=1&clid=0>.
21. MANTILLA HOLGUÍN. Cultivo ecológico de plantas medicinales y aromáticas: ampliando las perspectivas económicas en los Andes. LEISA - revista de agroecología. 2005 SETIEMBRE; 21(2).
22. Delbón, N; Bernadello, G ; Cosa, M; Stiefk, L. Estudios Cariotipicos en *Flourensia* (Asteraceae). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. 2014 Julio: p. 247-255.
23. Alvarado Chávez. Actividad antioxidante y citotóxica de 35 plantas medicinales de la Cordillera Negra. Tesis para optar al grado académico de magister. Lima: Universidad nacional mayor de San Marcos, Facultad de farmacia y bioquímica; 2017.
24. Mila R. *Flourensia blakeana*, Asteraceae. Estudio fitoquímico, Compuestos bioactivos, consideraciones quimiotaxonómicas. Tesis doctoral. Catamarca: Universidad nacional de Catamarca, Facultad de Ciencias exactas y naturales; 2014. Report No.: 978-987-661-393-4.
25. Olazábal Castillo , Mantilla Holguín. Las plantas medicinales de nuestra madre tierra: pachamama hampi qhoranchiskuna [IEPLAM] IdEyPM, editor. Cusco; 2008.
26. Zavala C. , Carrillo I. L, Alvarado S. B, Sánchez Ch. O. Evaluación de la toxicidad aguda de un extracto alcohólico de hojas de *hojasén* (*Flourensia cernua*). Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. 2010 septiembre; 41(3).
27. Calderón P. Actividad repelente de los aceites esenciales de "pacha salvia" y "muña" frente a *Anopheles albimanus* colectados en la región Tumbes. Tesis para optar por el Título Profesional de Químico Farmacéutico. Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Ciencias y Filosofía; 2018.
28. Tapia Y, Zacarias J. Efecto antiulceroso del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lepechinia meyenii* en úlceras gástricas inducidas con ácido acetil salicílico en *Rattus norvegicus*. Trabajo de investigación. Lima: Universidad María Auxiliadora, Escuela profesional de Farmacia y Bioquímica; 2019.
29. Fajardo S, Lechuga A, Luizar C, Serrano C, Cjuno M, Choquenaira J, et al. Obtención cromatográfica de ácido rosmarínico a partir de una planta peruana: *lepechinia meyenii* Walp. Epling (Lamiaceae) "Puna salvia". Revista Universitaria. 2021 Enero; 141.
30. *Natusfera*. [Online]. [cited 2024 Enero 24. Available from: Figura 2. *Lepechinia meyenii* (Walp). Epling. Fue extraído de "Museo Nacional de Historia Natural – Instituto Smithsonian" (11).

31. Bussmann , Douglas S. Plantas medicinales de los Andes y la Amazonia - La Flora mágica y medicinal del norte del Perú. Primera ed. Brown WL, editor. Trujillo: Jardín Botánico de Missouri; 2015.
32. Herbolarios andinos y amazónicos S.A.C. Aceite esencial natural y puro de hojas y flores de puna salvia (*Lepechinia meyenii*). Usos. 2022 Agosto: p. 7-8.
33. Huaraca R, Delgado MDC, Tapia F, Nolasco G. Perfil químico y actividad antioxidante de aceites esenciales de hierbas aromáticas altoandinas del Perú. Revista de Investigación en Ciencias Agronómicas y Veterinarias, ALFA. 2021 mayo; 5(14).
34. Ramírez J, Gilardoni M, Morocho V. Bioactivity, and Ethnopharmacology of the Genus *Lepechinia* Willd. (Lamiaceae): A Review. plants. 2024 Febrero; 2(13).
35. Dragomanova , Tancheva , Georgieva. Una revisión: actividad biológica del mirtenal y algunos aceites esenciales de plantas medicinales que contienen mirtenal. Revista Científica Farmaceutica. 2019 marzo; 25(1).
36. Llorens JA. Los aceites esenciales y su actividad biológica. Anales de Quimica de la RSEQ. 2021 Marzo; 117(2).
37. Martínez A. Capítulo 5: Aceites esenciales. In Martínez A. Química de Productos Naturales. Medellín: Universidad de Antioquia; 2020. p. 274-308.
38. Bruneton J. Farmacognosia, fitoquímica y plantas medicinales. Segunda ed. España: ACRIBIA; 2017.
39. Cuéllar A, Miranda M. Manual de prácticas de laboratorio. Farmacognosia y productos naturales. Primera ed. Plaza: Empresa Editorial Poligráfica Félix Varela; 2014.
40. Cordova M. Plantas Medicinales. [Online].; 2020 [cited 2023 Abril 15. Available from: <http://www.cinavarra.com/>.
41. Lipner S, Scher R. Onicomycosis, Panorama clínico y diagnóstico. Revista de la Academia Americana de Dermatología. 2018 Junio; 80(4).
42. M. Lam J, Leong K, L. Hon K, KC Leung A. Onicomycosis: una revisión actualizada. Patentes recientes sobre el descubrimiento de fármacos para la inflamación y las alergias. 2020 Mayo; 14(1).
43. Singal , Khanna. Onicomycosis: diagnóstico y tratamiento. In Simposio-Uñas Parte I; 2011; India. p. 659-672.
44. Goldstein A, Bhatia N. Onicomycosis - Epidemiología, Características Clínicas y Diagnóstico. UpToDate. 2022 Marzo.
45. Estrada G, Ramírez M. Micología General Castaño Trujillo C, editor. Caldas: Universidad Católica de Manizales; 2019.

46. Rodríguez C, Zhurbenko R. Manual de medios de cultivo. Cuarta ed. Varela LLanes AE, editor. Cuba: Centro nacional de biopreparados- BIOCEN; 2018.
47. Hernández A, Carbajal P, Fernández R, Arenas R. Dermatofitosis por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México. Revista Iberoamericana de Micología. 2007 Febrero; 24.
48. Caballero E. Manual de control de calidad en Microbiología clínica. 2022.
49. Comité Nacional de Normas de Laboratorio Clínico. Método para la prueba de susceptibilidad a la difusión en disco antifúngico de levaduras y hongos filamentosos. Tercera ed. Wayne P, editor. Pensilvania: CLSI Directriz M44; 2018.
50. Comité Nacional de normas de laboratorio Clínico. Estandares de desempeño para pruebas de susceptibilidad a antifúngicos de hongos filamentosos. Estandar M61. Pensilvania: Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio.; 2020.
51. Pupiales J, López S, Guerrero MdC, Guamán C. Onicomycosis por *Trichophyton rubrum*: presentación de un caso clínico. RECIMUNDO. 2020 Abril; 4(2).
52. Revankar S. Manuales MSD - Fármacos antimicóticos. [Online].; 2021 [cited 2023 Mayo 26. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es-pe/professional/enfermedades-infecciosas/hongos/f%C3%A1rmacos-antimic%C3%B3ticos>.
53. Malgor L, Valsecia M. Farmacología Médica. In Agentes antimicóticos sistémicos. Argentina: DONATO/FARM; 2023. p. 61-70.
54. Martín S, Benedí J. Antimicóticos dermatológicos. Farmacia Profesional. 2024 Julio; 18(7).
55. Wilkinson J, R. M. Las uñas y productos para las uñas. In Cosmetología de Harry. Madrid: Díaz de Santos, S. A.; 1990. p. 401-435.
56. Sharma G, Gadhiya J. Formulación, fabricación y control de calidad de cosméticos. In. Delhi: Vandana publicaciones; 2005. p. 467-479.
57. Programa de Calidad para el Sector Cosmético – Safe+. Recomendaciones para el desarrollo de estudios de estabilidad de productos cosméticos Mier Giraldo HJ, editor. Colombia: Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial - ONUDI; 2018.
58. Sparavigna , Caserini , Tenconi , De Ponti. Efectos de una nueva laca de uñas a base de hidroxipropil-quitosano (HPCH) en sujetos con onicochizia en las uñas de las manos. Revista de Dermatología e Investigación Clínica. 2014 Febrero; 2(2).

59. Peralta A, Vázquez D. CAPÍTULO 38: Antimicóticos. In De Leon Fraga J, editor. Micología médica básica. Mexico: INTERAMERICANA EDITORES, S.A.; 2015. p. 509-541.
60. Lloret A, Segarra C, Bosque Vall M. Control de Calidad SEIMC. [Online].; 2020 [cited 2023 Julio 16. Available from: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/dermatof.pdf>.
61. García F, Fernando D, Sanz M. Anatomia quirurgica ungueal. Revista Española de Podología. 2015 Marzo; 24(2).
62. Balleste R, Mousques N. Onicomycosis. Revisión del tema. Revista Médica del Uruguay. 2003 Agosto; 19(2).
63. Mitola G, Escalona F. Queratinolisis causada por hongos no dermatofitos aislados de una tenería y un matadero. Kasme. 2001; 29(2).
64. Ahmadi A, Mohammadnejadi K. Estado actual y relación estructura-actividad de los azoles privilegiados como agentes antimicóticos (2016-2020). Revista internacional de agentes antimicrobianos. 2022 Marzo; 59(3).
65. Comunidad Andina. Reglamento Técnico Andino sobre Especificaciones Técnicas Microbiológicas de Productos Cosméticos. In RESOLUCIÓN N° 2120; 2019; Lima. p. 7.
66. Espinoza J. Evaluacion Sensorial de los alimentos. In. Cuba: Editorial Universitaria; 2020. p. 126.
67. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Guía de estabilidad de productos cosmeticos. In Cosmeticos. Brasilia: Editora Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria; 2005. p. 52.
68. Agüero A, Chipoco P. Seguridad de los productos cosmeticos. Control de calidad de los productos cosmeticos. Informe de práctica. Lima: Universidad nacional mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2019.
69. Instituto valenciano de microbiologia. IVAMI. [Online]. [cited 2023 Agosto 5. Available from: <https://www.ivami.com/es/>.
70. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Farmacopea Brasileira. Sexta ed. Brasilia; 2019.
71. Murdan S, Milcovich G, Goriparthi G. El pH de la placa ungueal humana. Skin Pharmacol Physiol. 2011;(24).
72. Oficina de estandares Indios PCD 19: Cosmeticos. Esmalte de uñas. In comité seccional de cosmética; 1994; INDIA.

73. Sabater Galindo I, Mosqueira M. Permeabilidad cutánea. In *Cosmetica aplicada a estetica y bienestar*. España: Estética & Wellness; 2019. p. 63-78.
74. National Institute of Standards and Technology. Manual de Cosméticos de la FDA. In *Handbook on Cosmetics*. Estados Unidos: U.S. Department of Commerce; 2017. p. 49.
75. Abdala S, Ayuso J, Bermejo P, Blazquez A, Bravo L. *Farmacognosia General*. Primera ed. Villar del Fresno AM, editor. Madrid: Editorial Sintesis; 1999.
76. Casado I. Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor. Trabajo fin de grado. Madrid: Universidad Politécnica de Madrid, Escuela técnica superior de Ingenieros Industriales; 2018.
77. Núñez Durán C. Guía de Laboratorio de Química Orgánica. Manual de Prácticas de Laboratorio de Química Orgánica. Concepción: Universidad del Bio-Bio, Departamento de Química; 2018.
78. ISO/TR 21092. Aceites esenciales — Caracterización. Primera ed. Europa; 2004.
79. ISO 279. Aceites esenciales. Determinación de la densidad relativa a 20 grados C. Método de referencia. Europa; 1998.
80. ISO 280. Aceites esenciales. Determinación del índice de refracción. Europa; 1998.
81. ISO 592. Aceites esenciales. Determinación de la rotación óptica. Segunda ed. Europa: Comité Técnico ISO/TC 54; 1998.
82. ISO 1242. Aceites esenciales. Determinación del índice de acidez mediante dos métodos de valoración, manual y automático. Tercera ed. Europa: Directivas ISO/IEC; 2023.
83. Bagué Serrano AJ, Álvarez Cruz S. *Tecnología farmacéutica*. Primera ed. Alicante: Editorial Club Universitario; 2013.
84. Microbiologics. microbiologics.com. [Online]. [cited 2023 Junio 30. Available from:
https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=563&c=915960&h=7973622f91a75e047f37&_xt=.pdf.
85. Mailland F, Legora M, Ceriani D, Iob G, inventors; Composición antifúngica tópica para tratar onicomicosis. España patent EP 2953621. 2019 Mayo 1.
86. Bandoni A. Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica: su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Segunda ed. Buenos Aires: Ciencia y tecnología para el desarrollo CYTEC; 2003.

87. Knaak N, Da Silva L, T. A, Fiuza L. Caracterización química y actividad antifúngica de los extractos y aceites esenciales de *Bipolaris oryzae*. Revista de la sociedad de patología vegetal de Australasia. 2013 mayo; 42(3).
88. Pravin A. Antifungal Nail Lacquer Loaded with Extract of *Cissus*. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research. 2020 Marzo; 54(2).

ANEXOS

Anexo N°1

IDENTIFICACION BOTANICA DE LAS ESPECIES VEGETALES

CERTIFICACION

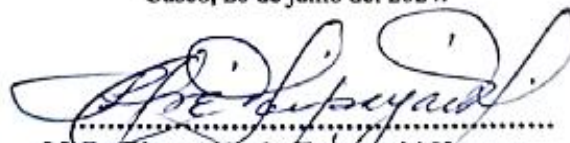
El que suscribe, Profesor Investigador Asociado al Herbario Vargas (CUZ), **CERTIFICA:** Que las Señoritas , **BEATRIZ CONDORI GAMARRA Y CARLA ANYHELA BERMUDEZ ARAGÓN**, Bachilleres de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco ; me han presentado dos muestras botánicas herborizadas, para su determinación taxonómica; las mismas que al ser debidamente observadas, diagnosticadas utilizando bibliografía especializada y mi larga experiencia de campo que me acredita , corresponden a las especies: *Flourensia polycephala* y *Lepechinia meyenii*; Las mismas que en concordancia con el Grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (The Angiosperm Phylogeny Group :APG IV 2016), presentan la siguiente posición taxonómica:

Clase : Magnoliopsida (=Dicotiledoneas)
Sub clase : Asteridae
Orden : Asterales
Familia : Asteraceae
Género : *Flourensia*
Especie : *Flourensia polycephala* Dillon
Nombres locales: "Pauca", "Yana chillca".

Clase : Magnoliopsida (=Dicotiledoneas)
Sub clase : Asteridae
Orden : Lamiales
Familia : Lamiaceae
Género : *Lepechinia*
Especie : *Lepechinia meyenii* (Walpers) Epling
Nombres locales : "Salvia", "Paccha salvia", "Puna salvia", "Salvina".

Se otorga la presente certificación a petición de las Bachilleres para los fines de investigación.

Cusco, 20 de junio del 2024.


M.C. Blgo. Alfredo Tupayachi Herrera
Prof. Invg. Asociado al Herbario Vargas CUZ.

Anexo N°2

ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Lepechinia meyenni* (Walpers) Epling



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS
LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA Y ESPECTROMETRÍA – Pabellón de Control de Calidad
AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 97386855

RESULTADOS

Cusco, 11 de Septiembre del 2024 ⁻³²

Solicitante : Beatriz Condori Gamarra, Carla Bermudez Aragon
Tipo de Análisis : Perfil de Compuestos orgánicos en aceite esencial
Método : Cromatografía de Gases GC-MSD.
Tipo de Muestra : 2 frascos de plástico con aceite esencial de Pauka y Puna Salvia
Almacenamiento : 4 °C.

Aceite esencial de Puna Salvia

Pico	TR	Compuestos orgánicos volátiles (VOC) Librería Nist 11	CAS	Qual	Area	Contenido Relativo %
1	8.10	.alpha.-Pinene	000080-56-8	97	4347093	4.7
2	9.55	(-)-β-Pinene	018172-87-3	97	16948485	18.4
3	9.86	3-Carene	013466-78-9	96	7302521	7.9
4	10.71	α-Terpinene	000099-86-5	97	955485	1.0
5	10.84	D-Limonene	005989-27-5	99	3312192	3.6
6	11.54	beta-Thujene	028634-89-1	91	2544207	2.8
7	11.86	.gamma.-Terpinene	000099-85-4	95	3880758	4.2
8	12.43	Eucalyptol	000470-82-6	99	3014161	3.3
9	12.58	Terpinolene	000586-62-9	96	705892	0.8
10	12.90	o-Cymene	000527-84-4	97	1656531	1.8
11	16.16	1-Octen-3-yl-acetate	002442-10-6	90	824524	0.9
12	19.71	.alfa.-Copaene	1000360-33-0	99	731333	0.8
13	20.80	(-)-alpha-Gurjunene	000489-40-7	99	1160935	1.3
14	21.24	Guaiol	000489-86-1	97	4253703	4.6
15	22.45	Terpinen-4-ol	000562-74-3	97	556373	0.6
16	23.00	(-)-trans-Pinocarveol	000547-61-5	72	1474430	1.6
17	24.00	cis-isopinocampone	015358-88-0	96	1349404	1.5
18	24.53	(+)-epi-Bicyclosesquiphellandrene	054274-73-6	92	451586	0.5
19	26.64	(+)-delta-Cadinene	000483-76-1	95	3591424	3.9
20	26.95	alpha-amorphene	000483-75-0	98	1402565	1.5
21	29.49	(+)-Bulnesol	022451-73-6	93	849299	0.9
22	36.70	Guaiol	000489-86-1	99	5825803	6.3
23	38.28	Bicyclo[4.4.0]dec-1-ene, 2-isopropyl-5-methyl-9-methylene-	150320-52-8	93	570168	0.6
24	39.23	.alpha.-Bisabolol	000515-69-5	90	482693	0.5
25	39.62	(+)-Bulnesol	022451-73-6	95	1379783	1.5
26	39.83	Epiglobulol	1000150-05-1	80	453734	0.5
27	40.34	gamma-Eudesmol	001209-71-8	95	504135	0.5

Qual = Porcentaje de coincidencia con la base de datos Nist 11

CAS = Numero para identificar la molécula

TR = Tiempo de Retención, tiempo al cual son detectados (ver cromatograma)

Nota: Los resultados expresa en contenido relativo de compuestos orgánicos volátiles en % presentes en la muestra, se reporta solo la coincidencia mas del 70% (Qual) con la base de datos espectrales de National Institute of Standards and Technology versión 11 (NIST v11)

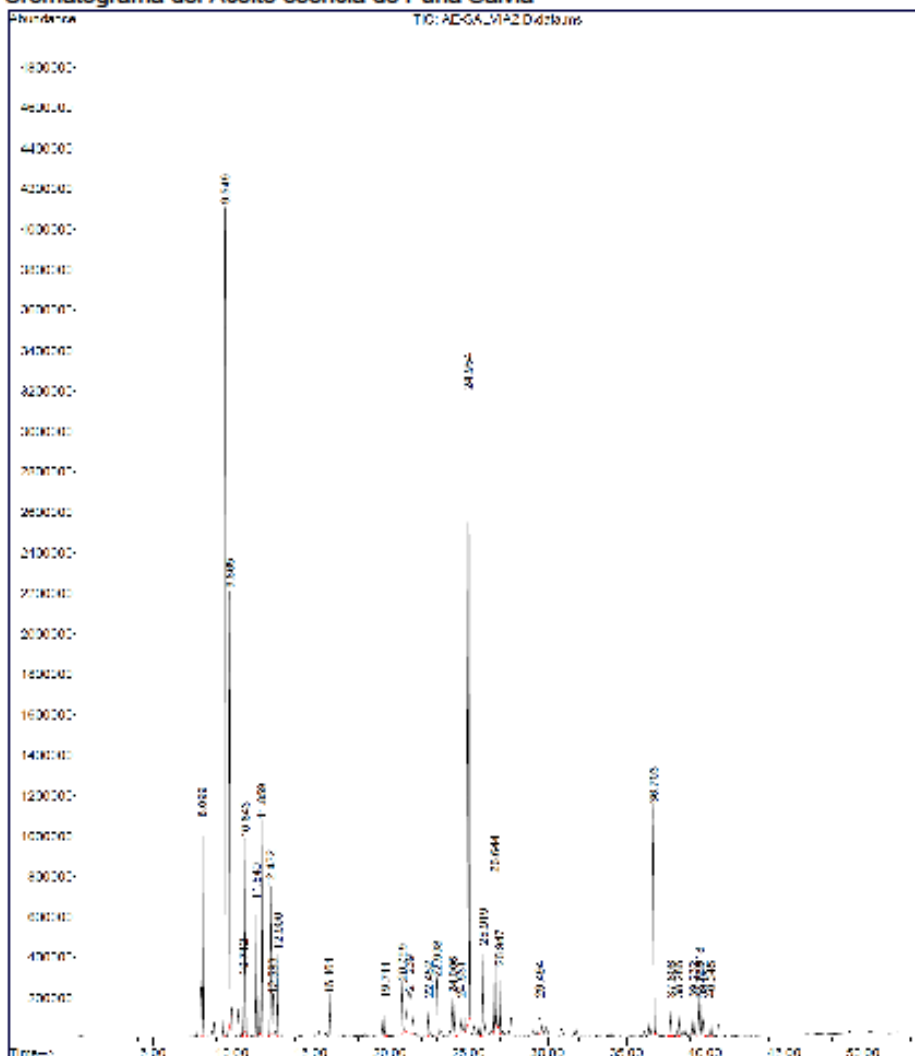


Químico, Jorge Chequensira P'ari
Analista del Laboratorio de Cromatografía y
Espectrometría - UNSAAC.
CQP - 514



RESULTADOS

Cromatograma del Aceite esencia de Puna Salvia



Quirico Jorge Choqueñaira P'ari
Analista del Laboratorio de Cromatografía y
Espectrometría - UNSAAC.
CQP - 514

Anexo N°3

ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Flourensia polycephala* Dillon



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS
LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA Y ESPECTROMETRÍA – Pabellón de Control de Calidad
AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855

RESULTADOS

Aceite esencial de Pauka

Pico	TR	Compuestos orgánicos volátiles (VOC) Librería Nist 11	CAS	Qual	Area	Contenido Relativo %
1	7.95	Santolina triene	002153-86-4	98	18929431	24.8
2	8.12	.alpha.-Pinene	000080-56-8	97	8498856	11.1
3	9.53	.beta.-Pinene	000127-91-3	97	1121305	1.5
4	9.73	Sabinene	003387-41-5	91	1822597	2.1
5	9.97	.beta.-Myrcene	000123-35-3	94	9536740	12.5
6	10.35	.alpha.-Phellandrene	000099-83-2	91	454351	0.6
7	10.86	D-Limonene	005989-27-5	99	13555046	17.8
8	11.54	beta-Thujene	028634-89-1	91	3036698	4.0
9	18.70	delta-Elementene	020307-84-0	96	2065796	2.7
10	23.96	Caryophyllene	000087-44-5	99	1253067	1.6
11	24.74	2-Isopropenyl-4a,8-dimethyl-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydronaphthalene	1000192-43-5	94	542275	0.7
12	25.04	.beta.-curcumene	1000374-17-4	93	5087074	6.7
13	26.77	alpha-Selinene	000473-13-2	99	2064387	2.7
14	27.06	.beta.-copaene	1000374-18-9	95	1097440	1.4
15	27.39	alpha-Curcumene	000644-30-4	97	499233	0.7
16	27.92	1,5,5-Trimethyl-6-methylene-cyclohexene	000514-95-4	89	577592	0.8
17	30.31	.gamma.-Elementene	029873-99-2	91	517376	0.7
18	38.52	.gamma.-eudesmol	1000374-18-5	99	3193043	4.2
19	40.82	beta-Eudesmol	000473-15-4	99	1585286	2.1

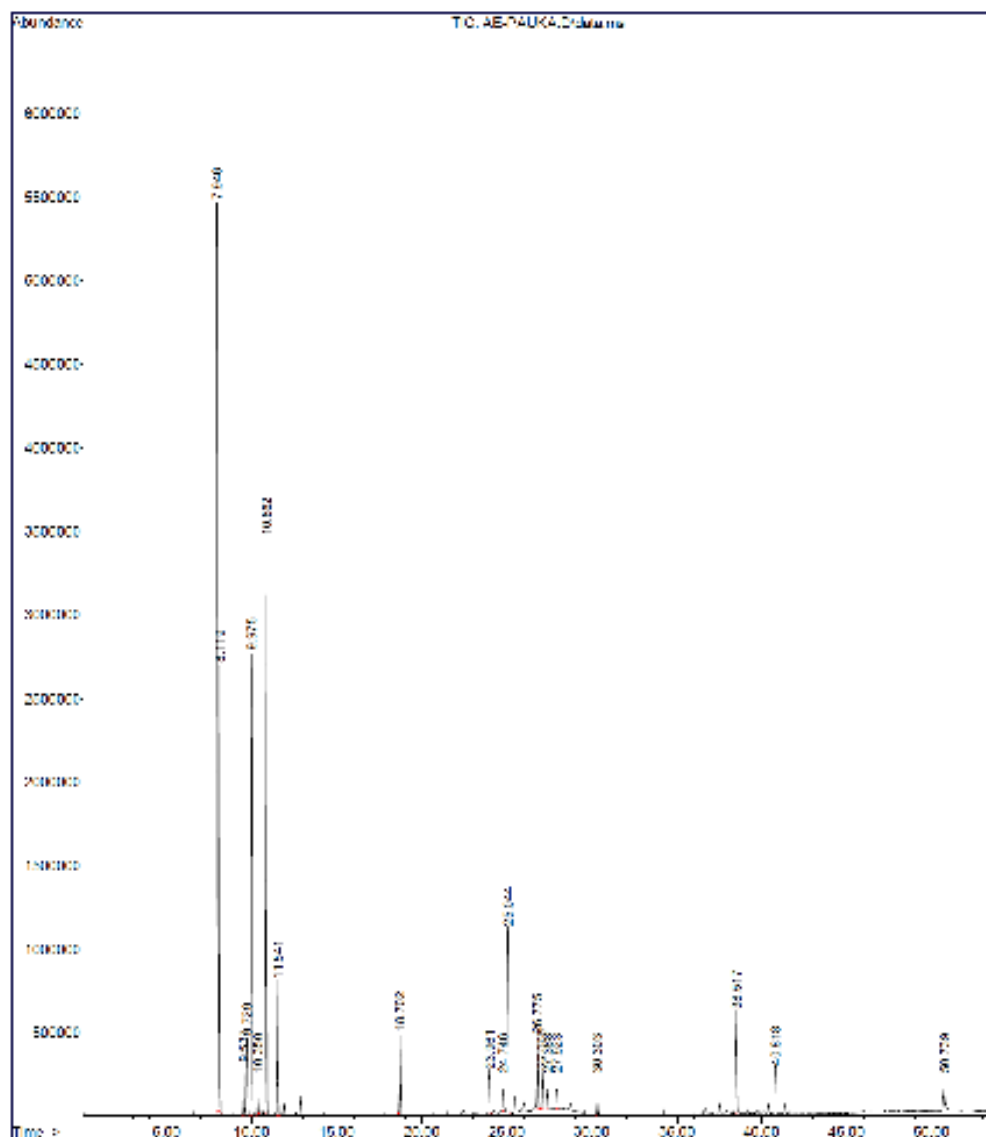


Químico. Jorge Chequensira Parí
Analista del Laboratorio de Cromatografía y
Espectrometría - UNSAAC.
CQP - 814



RESULTADOS

Cromatograma del Aceite esencial de Pauka



[Handwritten Signature]
Químico, Jorge Chequensira Pari
Analista del Laboratorio de Cromatografía y
Espectrometría - UNSAAC.
CQP - 514

Anexo N°4

CONDICIONES DE ANALISIS CROMATOGRAFICO DE LOS ACEITES ESENCIALES



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO
FACULTAD DE CIENCIAS
LABORATORIO DE CROMATOGRAFIA Y ESPECTROMETRIA – Pabellón de Control de Calidad
AV. De la Cultura 733 CUSCO-PERÚ Contacto 973868855

RESULTADOS

Condiciones de Análisis para Aceite esencial

Cromatógrafo: Agilent 6890N
Software de Control: Chemstation B.030
Detector de Masas: Agilent 5975B
Energía de Ionización: 70eV
Modo de Ionización: Impacto Electrónico (IE)
Modo de escaneo de masas: 40 a 400 uma
Retraso del disolvente: 0.0 minutos
Inyector Automático: Agilent 7683B

Columna: Agilent HP-5MS 5% Fenil Metil Siloxano 30m x 0.25id x 0.5um film

Temperatura del Horno inicial 60 °C, incremento de 3.5 °C/minuto hasta 230 °C, 5 min 230 °C


Puerto de Inyección

Modo : Split (con división)
Relación de Split : 70:1
Temp. Inicial : 200 °C
Tipo de Gas : Helio
Flujo : 1 mL/min
Tiempo de Análisis : 35.57 min
Volumen de Inyección : 0.1 uL
Muestra inyecta : Puro

Referencia

- Pino Alea. J. A. I Curso Internacional Análisis de Aceites Esenciales Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco 2014.
- Lynam, K. 2014 Potential Allergens in Aromatherapy Oils by GC/MS Using an Agilent J&W DB-XLB Capillary Column Agilent Technologies, Inc. 2850 Centerville Road Wilmington, DE 19808 USA 5990-5293EN




Quipico, Jorge Chequeneira Pari
Analista del Laboratorio de Cromatografía y
Espectrometría – UNSAAC.
CQP - 114

Anexo N°5

CERTIFICADO DE ANÁLISIS DE *Trichophyton rubrum* ATCC 28188



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p>SPECIFICATIONS: Product Name: Trichophyton rubrum Catalog Number: 0444 Lot Number: 444-81** Reference Number: ATCC® 28188™* Passage from Reference: 2 Expiration Date: 2020/01/31</p>	<p>RELEASE INFORMATION: Quality Control Technologist: Tracy A Blenker Release Date: 2018/03/29</p>
---	---


Performance	
<p>Macroscopic Features: Large, white colonies with "fuzzy" appearance and smaller, dark wine-red colonies which turn white with dark wine-red reverse as culture ages. At 14 days, colonies and reverse may not be completely white.</p> <p>Microscopic Features: Microconidia are abundant; macroconidia are rare. Microconidia are thin, clavate, borne laterally on undifferentiated hyphae or on short stalks. Macroconidia are typically long, narrow, cylindrical with rounded apices, 3-8 celled with thin smooth walls.</p>	<p>Medium: Malt Extract Agar</p> <p>Method: Lactophenol Blue (1)</p>
<p>ID System: MALDI-TOF (1)</p> <p>See attached ID System results document.</p>	
<p>Other Features/ Challenges: Results</p> <p>Dermatophyte Test Medium: positive (good growth at 7 days with agar turning deep pink)</p> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE </div>	
<p><small>**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <p>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start;"> <div style="text-align: center;"> TFSTING CFRT #2635.01 </div> <div style="font-size: small;"> (*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures. </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;"> ATCC Licensed Derivative </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: flex-start; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;"> K12-K12C-HA-D12A - PRODUCT DMI 2765.02 </div> </div>	


Anexo N°6


INSTRUCCIÓN DE ACTIVACION DE LA CEPA ATCC 28288





INSTRUCCIONES ILUSTRADAS


- 


Permita que la bolsa del KWIK-STIK sin abrir alcance la temperatura ambiente. Abra la bolsa por la muesca y retire la unidad KWIK-STIK.
- 


Desprenda la parte despegable de la etiqueta y sujétela a la placa de cultivo primario o al registro de control de calidad. No desmonte el dispositivo durante la hidratación.
- 


Con el borde del banco o mesa de trabajo, rompa la ampolla en la parte superior del KWIK-STIK (justo debajo del menisco de líquido) para liberar el líquido de hidratación. Rompa la ampolla solo una vez. Si la rompe varias veces puede hacer que fragmentos de vidrio perforen la carcasa de plástico, y crear así un riesgo de lesiones.
- 


Sostenga verticalmente y golpee sobre una superficie dura para facilitar el flujo del líquido a través del eje hacia la parte inferior de la unidad donde está contenida la microesfera. No agite el KWIK-STIK y no cubra el pequeño orificio de ventilación en la parte superior del KWIK-STIK.
- 

Pelizque la parte inferior de la unidad y triture la microesfera en el líquido hasta que este se haya disuelto.
- 


A continuación, sature de forma abundante el hisopo con el material hidratado y transfiera al medio de agar apropiado o utilícelo de acuerdo con el POE del laboratorio. Una vez hidratado, utilícelo de inmediato.
- 

Inocule la(s) placa(s) de cultivo primario haciendo rodar suavemente el hisopo sobre un tercio de la placa.
- 

Mediante un bucle estéril, estrie para facilitar el aislamiento de colonias.
- 

Deseche el KWIK-STIK mediante la eliminación adecuada de riesgos biológicos. 

Inmediatamente incube la(s) placa(s) invertida(s) de cultivo primario inoculado a temperatura y condiciones apropiadas para el microorganismo.

El método de cultivo se puede encontrar en la página del producto en microbiologia.com
- 

Anexo N°7

AGAR SABOURAUD DEXTROSA

britania[▲]

REP B0415084

Sabouraud Glucosado Agar

MS

USO

Medio utilizado para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos y saprófitos. También es útil para el cultivo de levaduras.

FUNDAMENTO

Medio de cultivo recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos, particularmente los asociados con infecciones cutáneas (piel, pelo).

En el medio de cultivo, la peptona, la triptefina y la glucosa son los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El alto contenido de glucosa, la presencia de cloranfenicol y el pH ácido, inhiben el desarrollo bacteriano y favorecen el crecimiento de hongos y levaduras. El agar es el agente solidificante.

Puede ser suplementado con otros agentes selectivos de crecimiento.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Código B0415084: 6 frascos x 50 ml.

FÓRMULA

PEPTONA.....	5 g
TRIPTEINA.....	5 g
GLUCOSA.....	40.0 g
CLORANFENICOL.....	0.05 g
AGAR.....	15.0 g
AGUA PURIFICADA.....	1000 ml
pH FINAL: 5.6 ± 0.2	

INSTRUCCIONES

Colocar los frascos cerrados en baño maría y llevar a ebullición para fundir el medio de cultivo sólido contenido en los mismos.

Una vez que se ha fundido el medio de cultivo, retirar cuidadosamente los frascos del baño maría y dejar enfriar.

Cuando alcanzan temperatura 45-50 °C, abrirlos y distribuir aproximadamente 15 ml en placas de Petri estériles.

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Medio de cultivo color ámbar claro, ligeramente opalescente sin precipitado.

ALMACENAMIENTO

Medio de cultivo listo para usar en frascos a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

PROCEDIMIENTO

Siembra

Estriar directamente la superficie del medio de cultivo.

Incubación

En aerobiosis a 20-25 °C.

El tiempo dependerá del hongo y levadura que se quiera recuperar. Como regla general, incubar en las condiciones descritas durante 2 a 7 días. En el caso de investigar dermatofitos, incubar durante 5 a 20 días y examinar el cultivo cada 4 a 6 días.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Describir las características típicas de las colonias y subcultivar en medios apropiados para identificación.

Anexo N°8

CALDO SABOURAUD DEXTROSA



britaniainfo.com

REF B0217805 REF B0217806

Sabouraud Glucosado Caldo

USO

Medio utilizado para el enriquecimiento y cultivo de hongos y levaduras. También es conocido como Caldo Sabouraud Dextrosa y como Medio de Antibióticos N° 13.

Su fórmula cumple con los requerimientos de la Armonización de Farmacopeas Europea, Japonesa y de los Estados Unidos de Norteamérica (EP, JP y USP respectivamente).

FUNDAMENTO

La tripteína (peptona de caseína) y la peptona de carne constituyen las fuentes de nitrógeno, vitaminas y carbono necesarios para el crecimiento de hongos y levaduras y la glucosa es la fuente de energía.

CONTENIDO Y COMPOSICIÓN

Código B0217805: envase x 100 g.

Código B0217806: envase x 500 g.

FÓRMULA (en gramos por litro)

TRIPTEÍNA.....	5.0
PEPTONA DE CARNE.....	5.0
GLUCOSA.....	20.0
pH FINAL: 5.6 ± 0.2	

INSTRUCCIONES

Suspender 30 g del polvo en 1 litro de agua purificada. Reposar 5 minutos. Calentar con agitación frecuente y llevar a ebullición para disolución total. Distribuir en recipientes apropiados y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

CARACTERÍSTICAS DEL PRODUCTO

Medio de cultivo deshidratado: color beige claro, homogéneo, libre de aglutinamiento.

Medio de cultivo preparado: color ámbar claro.

ALMACENAMIENTO

Medio de cultivo deshidratado a 10-35 °C.

Medio de cultivo preparado a 2-8 °C.

PROCEDIMIENTO

Siembra

Inoculación directa del material en estudio.

Incubación

En aerobiosis a 20-26 °C.

El tiempo dependerá del hongo y levadura que se quiera recuperar.

Como regla general, incubar en las condiciones descriptas durante 2 a 7 días. En el caso de investigar dermatofitos, incubar durante 5 a 20 días y examinar el cultivo cada 4 a 6 días.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El crecimiento se evidencia por la aparición de turbidez.

CONTROL DE CALIDAD

MICROORGANISMOS	CRECIMIENTO
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	Satisfactorio
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Satisfactorio
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> ATCC 9533	Satisfactorio
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	Satisfactorio

CONTROL DE ESTERILIDAD	RESULTADO
Medio sin inocular	Sin cambios

MATERIALES NECESARIOS NO PROVISTOS

Equipos y material de laboratorio, microorganismos para control de calidad, reactivos y medios de cultivo adicionales según requerimiento.

PRECAUCIONES

- Solamente para uso diagnóstico in vitro. Uso profesional exclusivo.

Anexo N°9

CERTIFICADO DE ANALISIS DEL HIDROXIPROPILQUITOSANO



CERTIFICATE OF ANALYSIS

Product Name: Hydroxypropyl Chitosan (HPCS)
Lot No.: 20230506
Manufacture Date: May. 06, 2023
Expiry Date: May. 05, 2025
Standard: Enterprise

No.	Specifications	Standard Value	Results
1.	Appearance:	White to off-white powder	Conforms
2.	Degree of substitution:	80% Min.	85.2%
3.	Insoluble substance:	1.0% Max.	0.4%
4.	Loss on drying:	12% Max.	6.8%
5.	PH:	5~8	6.1
6.	Residue on ignition:	2.0% Max.	1.3%
7.	Iron [Fe]:	10ppm Max.	Conforms
8.	Heavy metals [Pb]:	10ppm Max.	Conforms
9.	Arsenic [As ₂ O ₃]:	2ppm Max.	<1ppm
10.	Particle Size:	NLT95% pass 80mesh sieve	100%
Conclusion: The product conforms to the Enterprise standard			



Anexo N°10

FICHA DE RECOLECCION DE LAS ESPECIES VEGETALES

ESPECIE VEGETAL:	
FECHA: /..... /..... HORA::	
CARACTERÍSTICAS	DETALLES
NOMBRE CIENTÍFICO:	
NOMBRE COMÚN:	
FAMILIA:	
GENERO:	
ESPECIE:	
CARACTERÍSTICA PRINCIPAL:	
DESCRIPCIÓN GENERAL:	
LUGAR DE RECOLECCIÓN <ul style="list-style-type: none"> • REGIÓN • PROVINCIA • DISTRITO • COMUNIDAD 	
ALTITUD	
LATITUD	
TEMPERATURA	
PARTES USADAS	
<ul style="list-style-type: none"> • Raíz () • Tallo () • Hojas () 	<ul style="list-style-type: none"> • Flores () • Frutos () • Corteza ()
RECOLECTORES:	
OBSERVACIONES:	
.....	
.....	
.....	
.....	

Fuente: Elaborado en base a Generalidades de farmacobotánica 1989.

Anexo N° 11

FICHA DE RECOLECCION DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD

ESPECIE	PESO DE MUESTRA FRESCA	PESO DE MUESTRA SECA	% DE HUMEDAD	PROMEDIO % DE HUMEDAD

Fuente: Elaboración propia en base a Bruneton, J. Farmacognosia general. Plantas medicinales, Paris 1993.

Anexo N°12

FICHA DE RECOLECCION DE LAS CARACTERISTICAS ORGANOLEPTICAS DE LOS ACEITES ESENCIALES

ESPECIE	CARACTERÍSTICAS	RESULTADOS
	OLOR	
	COLOR	
	SABOR	
	OLOR	
	COLOR	
	SABOR	

Fuente: Elaboración propia en base a Farmacognosia General. Villar del Fresno (1999)

Anexo N°13

**FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICOTICA DE
LOS ACEITES ESENCIALES POR EL METODO DE DISCO DIFUSION**

FECHA:...../...../.....								
HORA:...../...../.....								
HALOS DE INHIBICION (mm) DEL ACEITE ESENCIAL FRENTE A <i>Trichophyton rubrum</i> ATCC								
CONCENTRACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL (%)	DIAMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm) DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>F.</i> <i>Polycephala</i>				DIAMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm) DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>L.</i> <i>meyenii</i>			
	I	II	III	PROMEDIO	I	II	III	PROMEDIO
100								
95								
90								
85								
80								
75								
70								
50								
25								
12.5								
TERBINAFINA								
DMSO								

Leyenda: I, II, III = número de pruebas

Fuente: Elaboración propia en base a Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana.INS.2017.

Anexo N° 14

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS DEL METODO DE MACRODILUCION PARA DETERMINAR LA CMI DE LOS ACEITES ESENCIALES

CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA DEL ACEITE ESENCIAL DE:					
CONCENTRACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL (uL/ml)	GRADOS DE TURBIDEZ				
	Inhibición al 100 % (0)	Inhibición de 75% (1)	Inhibición del 50% (2)	Inhibición del 25% (3)	No hay inhibición (4)
950					
475					
237.5					
118.75					
59.38					
29.69					
14.84					
Terbinafina					
DMSO					

Fuente: Elaboración propia en base al Comité de Normas Clínicas y de Laboratorio (2020)

Anexo N°15

**FICHA DE RECOLECCION DE LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD
ANTIMICÓTICA DEL ESMALTE DE UÑAS**

CONCENTRACIÓN DEL QUITOSANO	CONCENTRACIÓN DEL ACEITE ESENCIAL	HALOS DE INHIBICIÓN			
		I	II	III	PROMEDIO
ESMALTE PATRON					

Fuente: Elaboración propia en base a Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana.INS.2017.

Anexo N°16

**FICHA DE RECOLECCION DEL CONTROL DE CALIDAD DEL ESMALTE DE
UÑAS**

CARACTERÍSTICAS		ESMALTE DE UÑAS
ORGANOLEPTICAS	OLOR	
	COLOR	
	ASPECTO	
FISICOQUIMICO	pH	
MICROBIOLOGICO	Microorganismos Aeróbicos	
	Hongos Filamentosos Y Levaduras	
	Microorganismos Específicos	

Fuente: Elaboración propia

Anexo N°17

FICHA DE RECOLECCION DEL TIEMPO DE SECADO DEL ESMALTE DE UÑAS

CONCENTRACIÓN DEL ESMALTE	TIEMPO DE SECADO			
	I	II	III	PROMEDIO
ESMALTE PATRON				

Fuente: Elaboración propia en base a Vipin K. Formulación y evaluación de una laca de uñas antifúngica para la onicomicosis. Boletín biomédico británico. (2014)

Anexo N°18

FICHA DE RECOLECCION DEL MODELO DE PENETRACIÓN DE UÑA

CONCENTRACION DEL QUITOSANO Y ACEITE ESENCIAL	CANTIDAD DEL ESMALTE	HALOS DE INHIBION			
		I	II	III	PROMEDIO
ESMALTE PATRON					

Fuente: Elaboración propia en base a Vipin K. Formulación y evaluación de una laca de uñas antifúngica para la onicomicosis. Boletín biomédico británico(2014)

Anexo N°19

ARCHIVO FOTOGRAFICO

Fotografía N°1

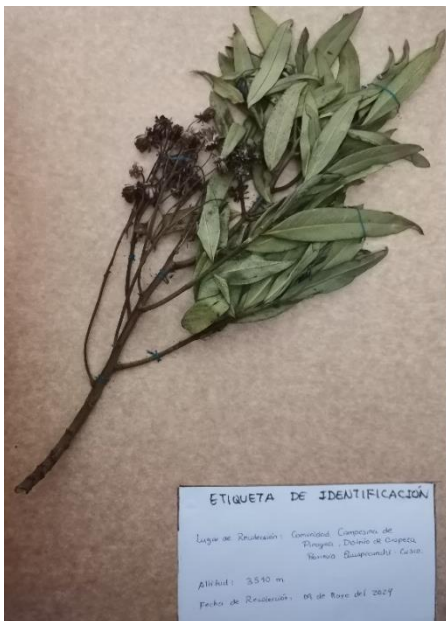


Fotografía N°2



Fotografía N°1 y 2: Reconocimiento de la zona y recolección de las especies de *Flourenzia polycephala* Dillion (Comunidad de Pinigua, Oropeza, Cusco) y *Lepechinia meyenii* (Distrito de Amparaes, Calca)

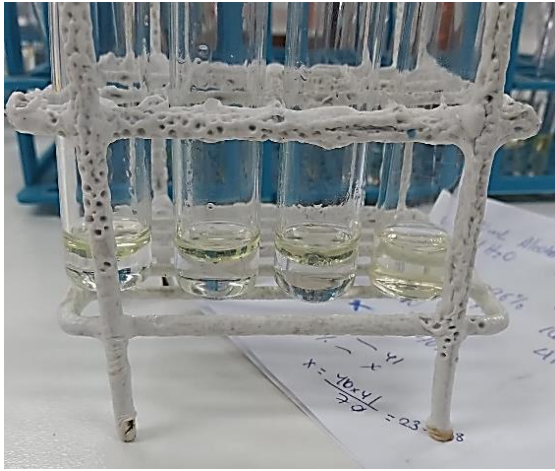
Fotografía N°3



Fotografía N°4



Proceso de secado de hojas y flores de ambas especies vegetales, para la identificación botánica y para la destilación



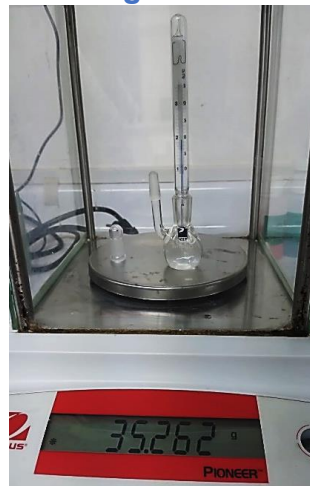
Fotografía N°5



Fotografía N°6

Determinación de las pruebas de solubilidad de los aceites esenciales con solventes polares y apolares

Fotografía N°7



Fotografía N°8



Fotografía N°7 y N°8:
Procedimiento de peso de las muestras para la determinación de la densidad de los aceites esenciales

Fotografía N°9

Fotografía N°9: Determinación del índice de refracción de los aceites esenciales por el refractómetro

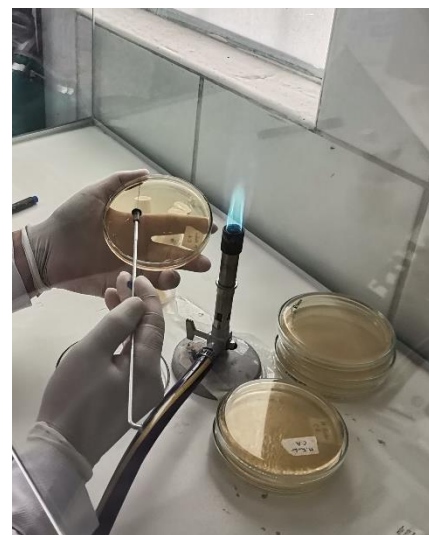


Fotografía N°10



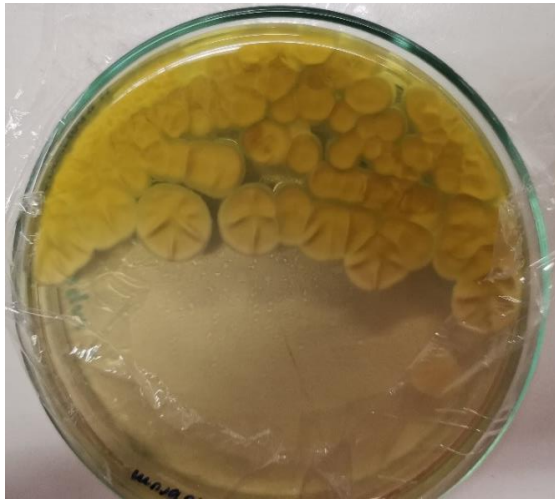
Cepa ATCC 28188 *Trichopyton rubrum*

Fotografía N°11



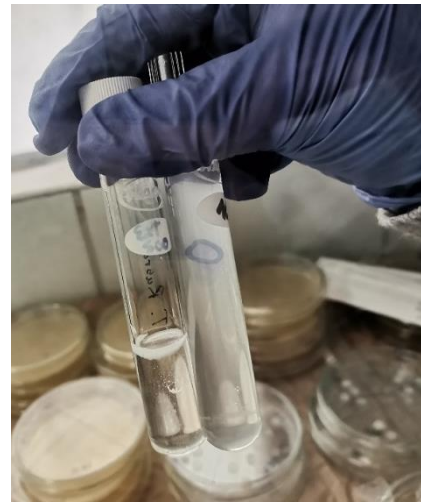
Activación de la cepa en agar Sabouraud

Fotografía N°12



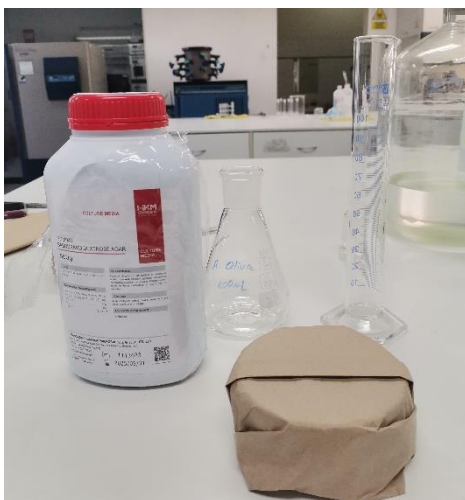
Fotografía N°12: Crecimiento de *T. rubrum* aislado y activado

Fotografía N°13



Fotografía N°13: Preparación del inoculo de acuerdo a la escala McFarland

Fotografía N°14

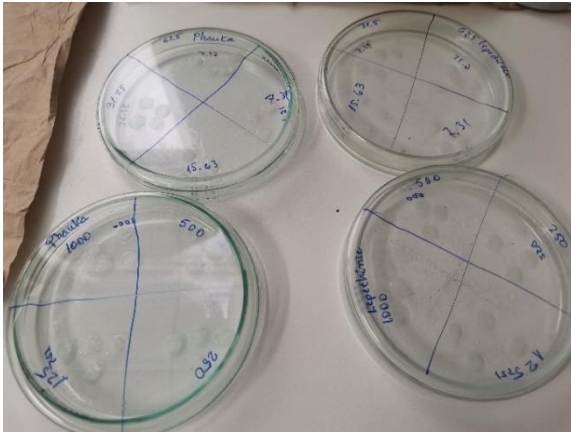


Fotografía N°15



Fotografía N°14 y 15°: Preparación del medio de cultivo agar Sabouraud para la determinación de la actividad antifúngica por el método de Disco difusión y plaqueo con Sabouraud

Fotografía N°16



Fotografía N°16: Preparación de los discos con los aceites esenciales a diferentes concentraciones

Fotografía N°17



Fotografía N°17: Colocación de los discos a las placas con agar Sabouraud con el inóculo sembrado

Fotografía N°18



Fotografía N°18: Incubación en la estufa a 25- 30°C por 4 a 7 días

Fotografía N°19



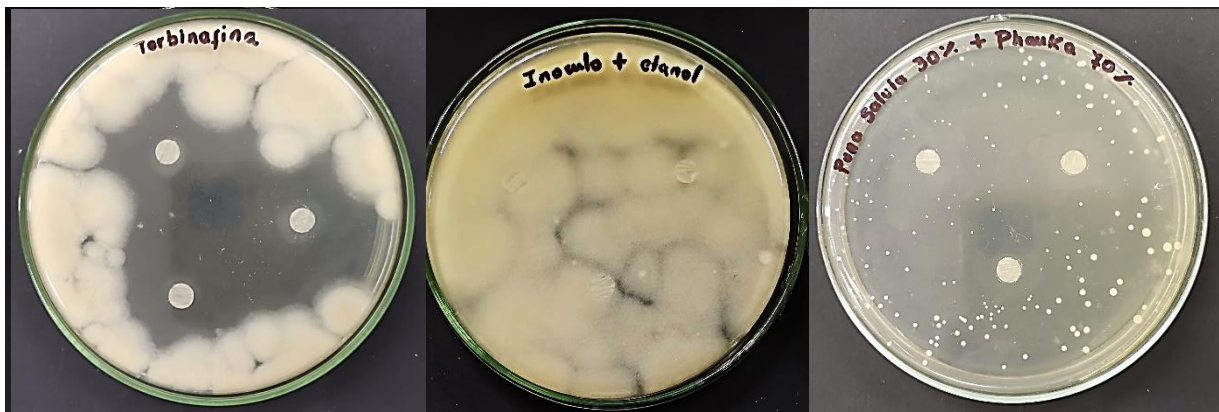
Fotografía N°19: Observación de las placas a los 7 días, para su posterior lectura de halos de inhibición

Fotografía N°20

Fotografía N°20: Lectura de los halos de medición formado por el aceite de pauca (mm) con el vernier digital

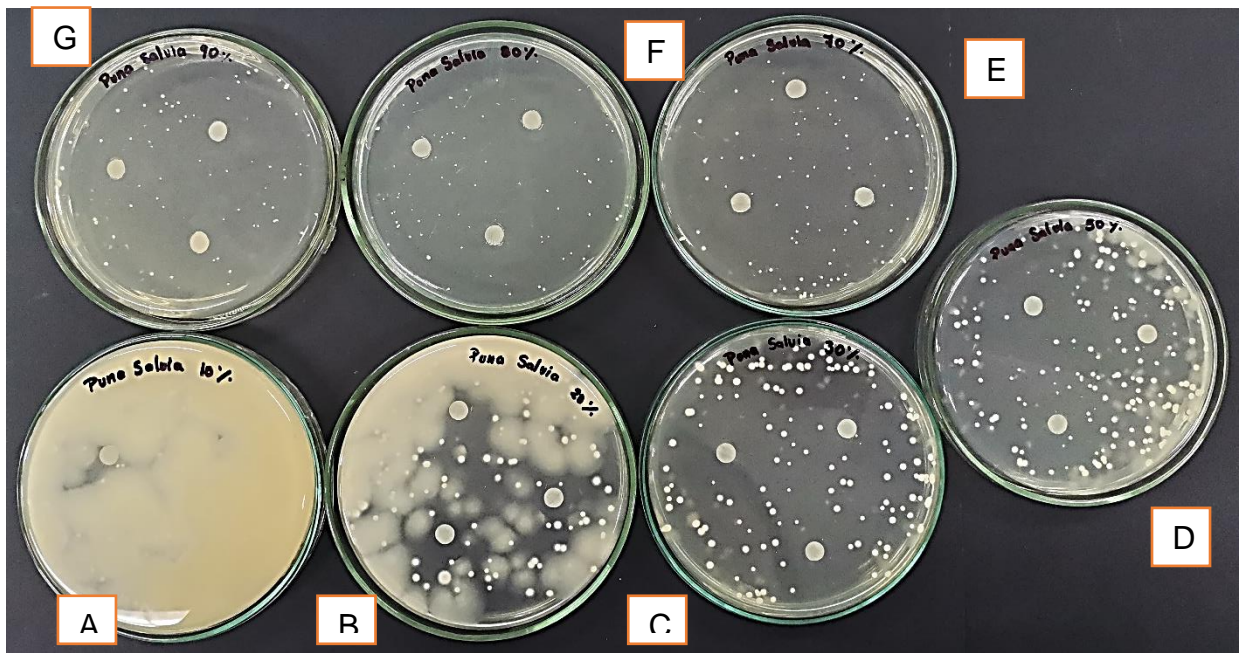


Fotografía N°21



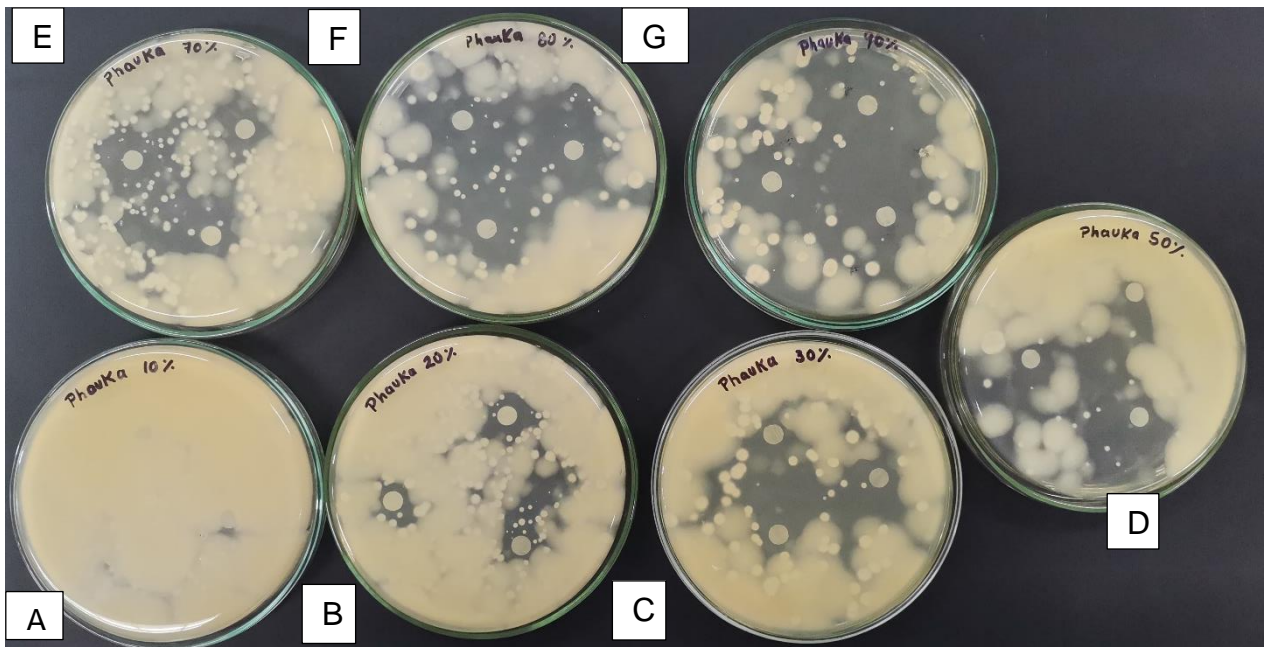
Halos de inhibición formados por la Terbinafina 0.624ug/ml (patrón positivo), etanol 96° (patrón negativo) y se observa la inhibición de la mezcla de los aceites (30% y 70%)

Fotografía N°22



Fotografía N° 22: Halos de inhibición formados por las diferentes concentraciones de aceite esencial de Pauca; A Pauca 10%, B Pauca 20%, C Pauca 30%, D Pauca 50%, G Pauca 70%, F Pauca 80% E Pauca 90%

Fotografía N°23



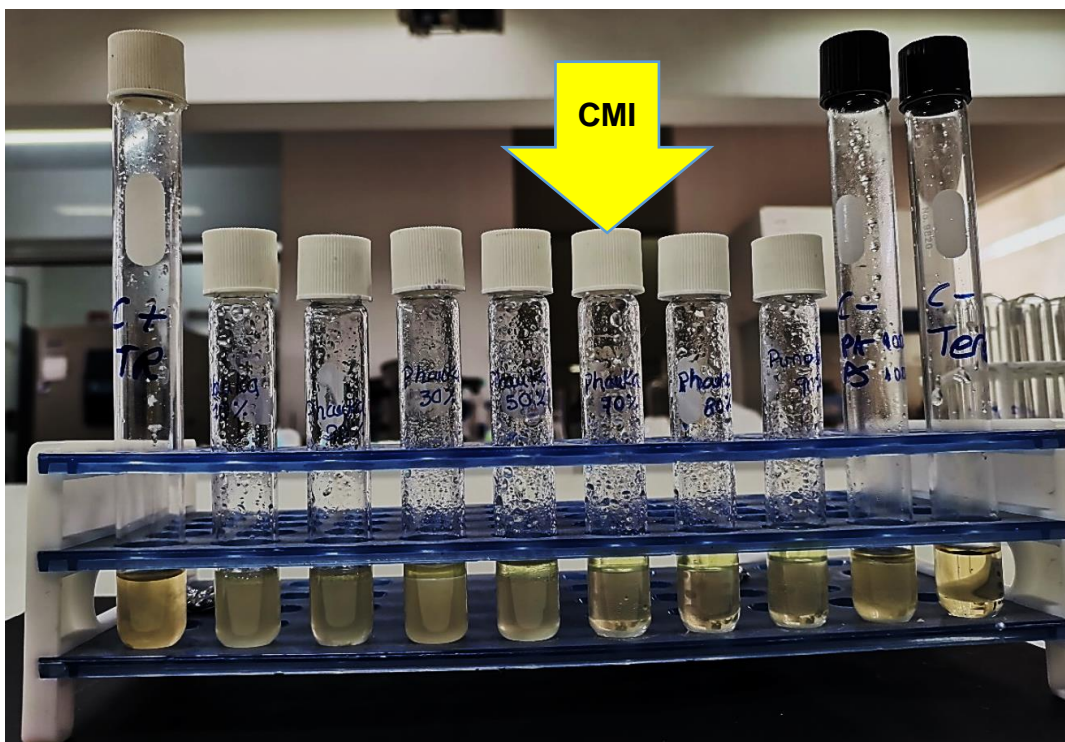
Fotografía N° 23: Halos de inhibición formados por las diferentes concentraciones de aceite esencial de Puna salvia; A: puna salvia 10%, B: puna salvia 20%, C: puna salvia 30%, D: puna salvia 50%, G: puna salvia 70%, F: puna salvia 80%, E: puna salvia: 90%

Fotografía N°24



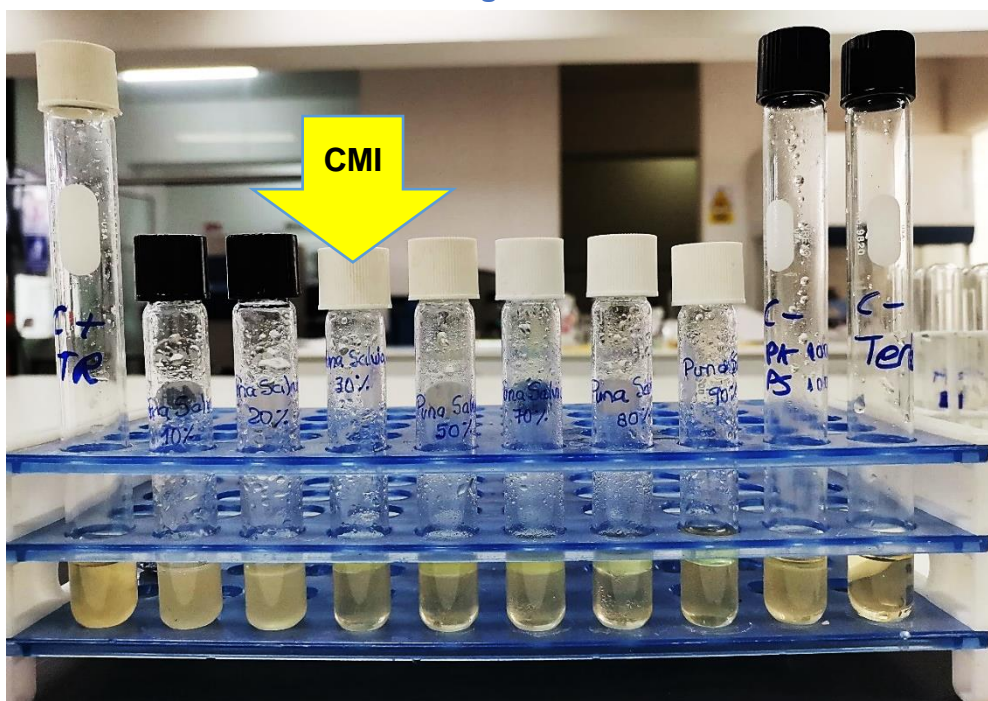
Fotografía N° 24: Preparación de los tubos y Caldo Sabouraud para la determinación de la CMI de los aceites esenciales por el método de macrodilución

Fotografía N°25



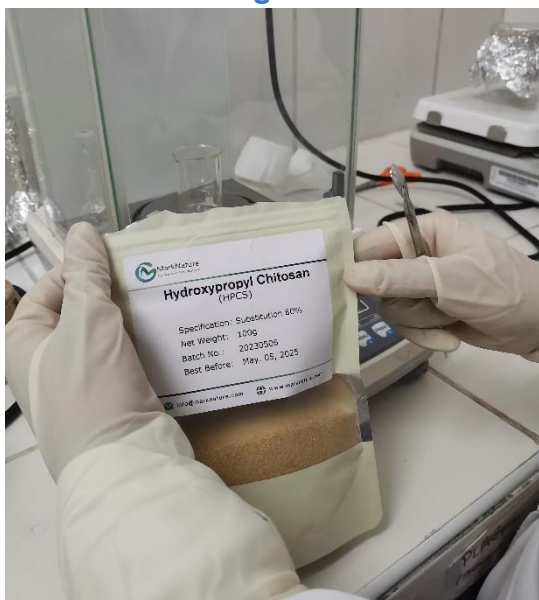
Resultados de la turbidez presentada en los tubos por el aceite esencial de pauca. La concentración mínima Inhibitoria fue de 70% (No se observa turbidez a partir de este tubo)

Fotografía N°26



Fotografía N°26: Resultados de la turbidez presentada por el aceite esencial de Puna salvia. La concentración mínima Inhibitoria fue de 30% (No se observa turbidez a partir de este tubo)

Fotografía N°27



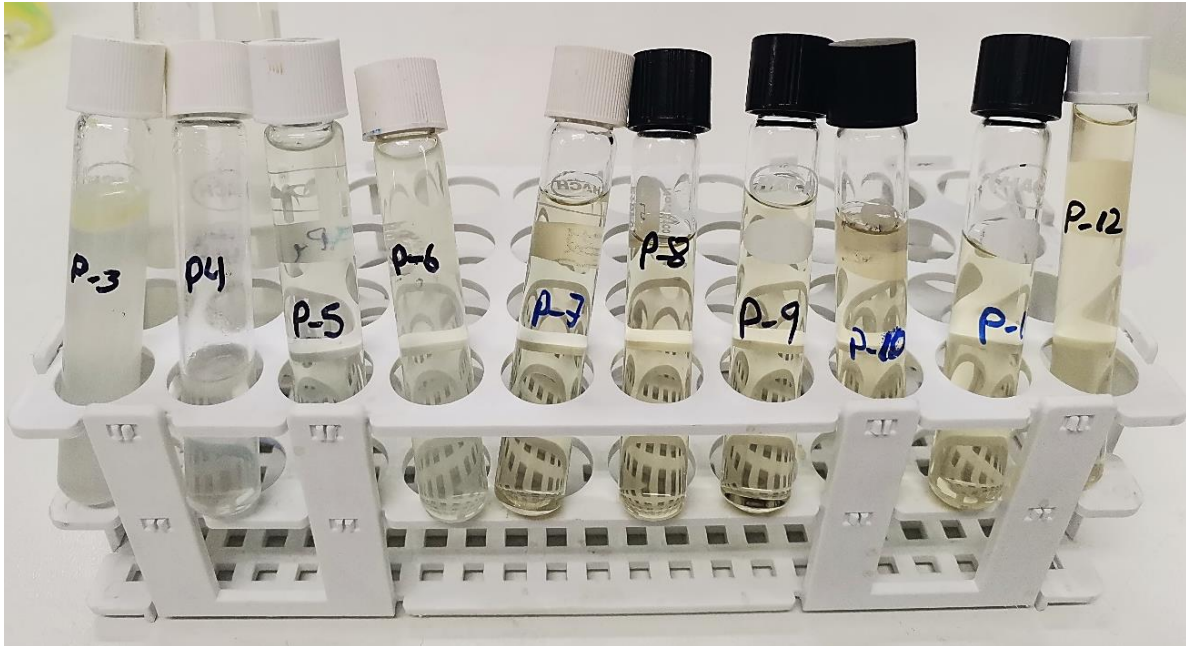
Insumos para la elaboración del esmalte de uñas. Preformulación, pesado de HPCH para la formación de película

Fotografía N°28



Agitación en el agitador magnético, incorporación de aceites esenciales en base al CMI de cada uno

Fotografía N°29



Preformulaciones del esmalte de uñas, donde se observa por análisis organoléptico y fisicoquímico la separación de fases, consistencia muy líquida, pH <5, entre otros

Fotografía N°30



Fotografía N°30: Se comienza a formular el esmalte de uñas, primero se forma la película de HPCH al 5%, ácido láctico y agua estéril

Fotografía N°31

Fotografía N°31: A la mezcla anterior se le adiciona acetato de etilo, etanol al 96° mezclado por separado y finalmente los aceites esenciales en concentraciones mínimas inhibitorias respectivas

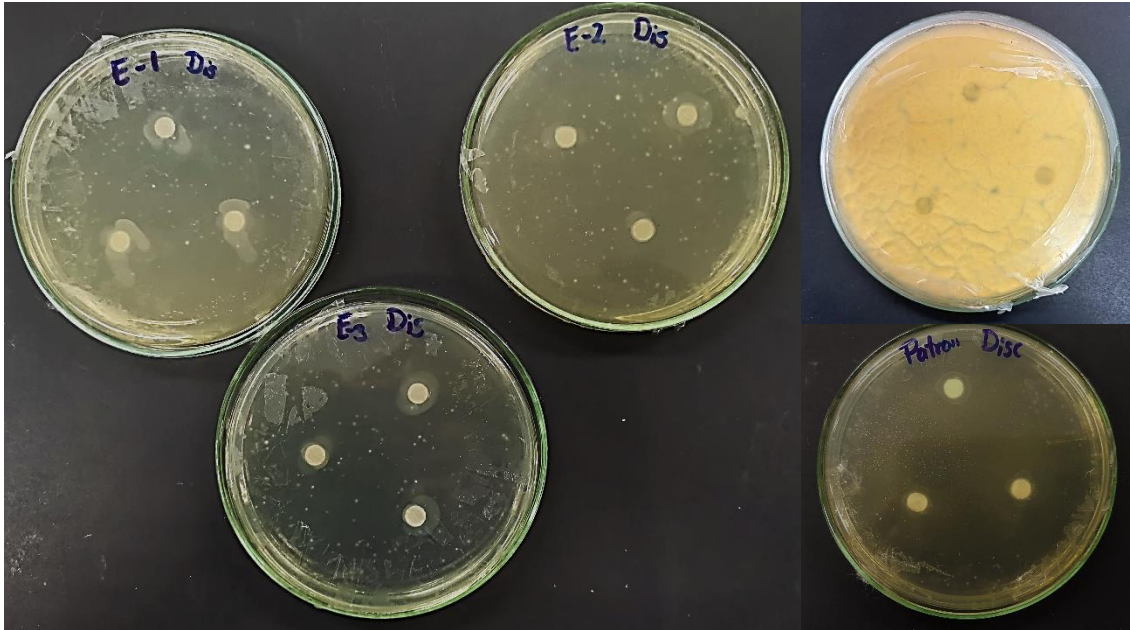


Fotografía N°32



Fotografía N°32: Formulación y elaboración del esmalte de uñas ideal. Esmalte al 5% de hidroxipropilquitosano y aceite esencial al 0.5%, 1% y 2%, que cumplen con las características organolépticas, pH y

Fotografía N°33

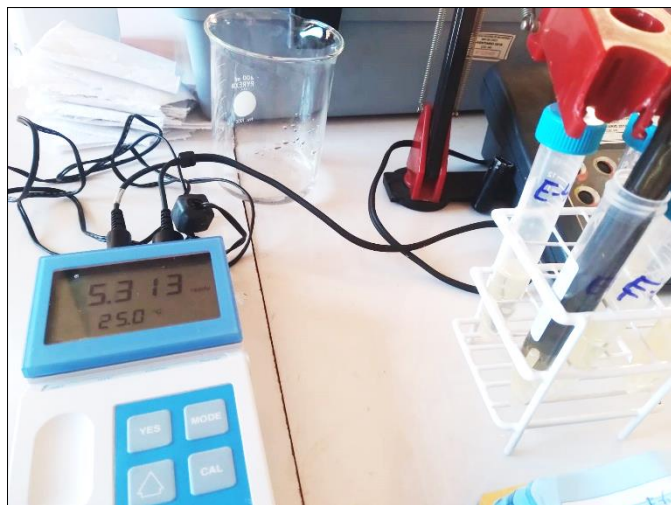


Evaluación In vitro de los esmaltes de uñas formulado frente a *T. rubrum*, por el método de Disco difusión. Se observa que el esmalte 3, con hidroxipropilquitosano al 5% y aceite esencial al 2% en la formulación total, posee mejor halo de inhibición, sin embargo, en los otros también se observan halos que serán medidos con el vernier y se compara con el esmalte patrón

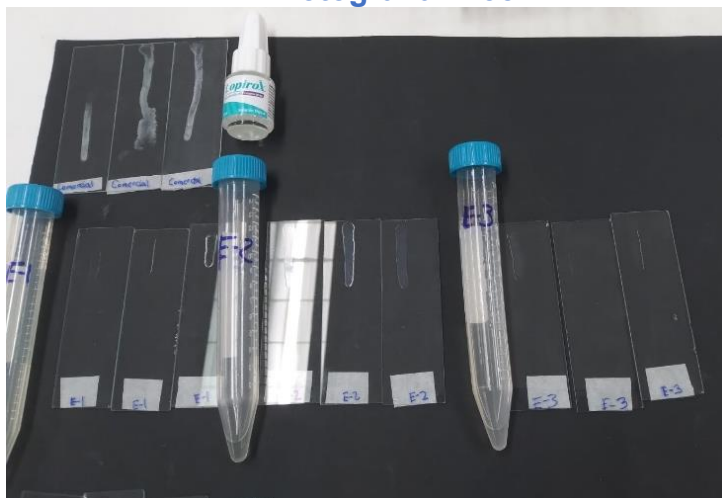
Caracterización del esmalte de uñas

Fotografía N°34

Fotografía N°34:
Determinación de pH del
esmalte de uñas
formulado, este es
superior a 5.



Fotografía N°35



Fotografía N° 35:
Suavidad para fluir
de los esmaltes de
uñas comparado con
el esmalte patrón

Fotografía N°36



Fotografía N°36: Tiempo
de secado del esmalte
de uñas comparado con
el esmalte patrón,
alrededor de 3 minutos
40 segundos

Fotografía N°37



Fotografía N°7: Modelo de penetración en uñas, este parámetro se realizó en agar Sabouraud inoculado, el esmalte de uñas a diferentes concentraciones fueron impregnados en uñas humanas para medir su penetración y liberación del principio activo. Se observan los halos de inhibición formados por el esmalte.

Fotografía N°38

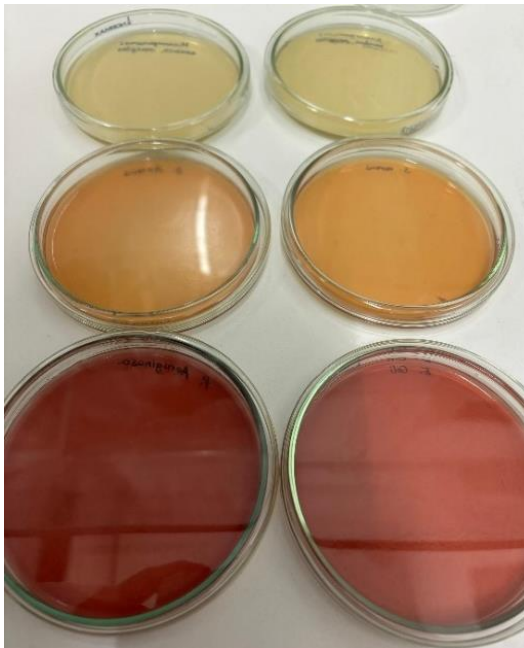


Fotografía N°39

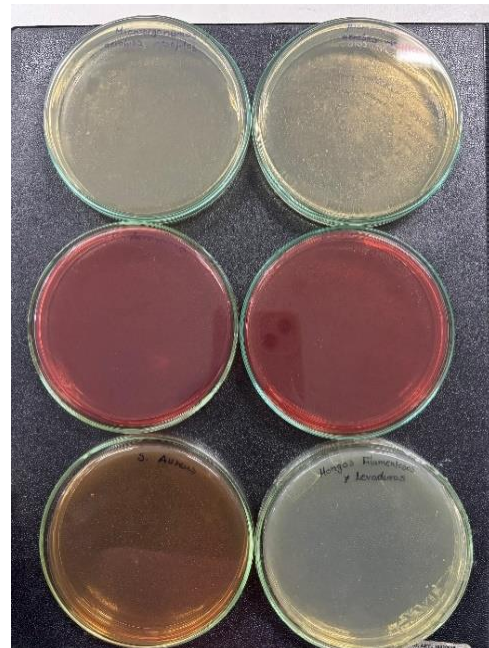


Fotografía N°38 y 39: Análisis microbiológico del esmalte de uñas, Se prepararon Agar Nutritivo para la determinación de Aerobios, agar Mac Conkey para *P. Aeruginosa* y *E. Coli*, Agar Manitol para *S. Aureus* y Agar Sabouraud para hongos y levaduras. Se cultiva el esmalte de uñas formulado

Fotografía N°40



Fotografía N°41:



Fotografía N°40 y 41: Se observan las placas tanto a las 12, 24, 48, 72 horas y para hongos hasta los 7 días, donde no se observa crecimiento alguno de ningún tipo de microorganismo