



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

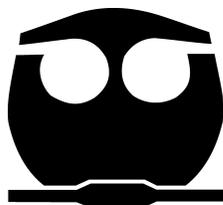
**EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DE LOS ACEITES
ESENCIALES DE LAVANDA (*Lavandula angustifolia*) Y ÁRBOL DEL TÉ
(*Melaleuca alternifolia*)**

(TRABAJO DE TESIS)

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

BEATRIZ DÍAZ GONZÁLEZ



MÉXICO, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Abel Gutiérrez Ramos

VOCAL: Profesor: José Alexandro Bonifaz Trujillo

SECRETARIO: Profesor: Ernestina Hernández García

1er. SUPLENTE: Profesor: Maria Josefa Bernad Bernad

2do. SUPLENTE: Profesor: Raúl Lugo Villegas

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA, TORRE DE INVESTIGACIÓN “DR. JOAQUÍN CRAVIOTO”, TERCER PISO, LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA.

ASESOR DEL TEMA:

M en F Ernestina Hernández García

SUPERVISOR TÉCNICO:

QFB Francisca Trujillo Jiménez

SUSTENTANTE:

Beatriz Díaz González



INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. GENERALIDADES	5
1.- Dermatofitos	6
1.1.- Clasificación de las dermatofitosis ó tiñas	6
1.1.1.- Tiña de la cabeza	6
1.1.2.- Tiña del cuerpo	7
1.1.3.- Tiña de los pies	7
1.1.4.- Tiña de la mano	8
1.1.5.- Tiña de las uñas u onicomicosis	8
1.1.6.- Tiña de la ingle	9
1.2.- Diagnóstico de laboratorio	9
1.2.1.- Toma de muestra	9
1.2.2.- Examen microscópico	10
1.2.3.- Cultivo de la muestra	11
1.3.- Características micológicas de los dermatofitos	11
1.3.1.- Género <i>Trichophyton</i>	12
1.3.1.1.- <i>Trichophyton rubrum</i>	12
1.3.1.2.- <i>Trichophyton tonsurans</i>	13
1.3.1.3.- <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	13
1.3.2.- Género <i>Microsporum</i>	14
1.3.2.1.- <i>Microsporum canis</i>	14
1.3.2.2.- <i>Microsporum gypseum</i>	15
1.3.3.- Género <i>Epidermophyton</i>	15
1.4.- Epidemiología	15
1.5.- Tratamiento	19
1.5.1.- Terapia sistémica	19
1.5.2.- Terapia tópica	20
1.6.- Problemática del tratamiento en dermatofitosis	22
1.7.- Aceites esenciales como alternativa de tratamiento	23
1.7.1.- Aceite esencial del árbol del té (<i>Melaleuca alternifolia</i>) ..	24
1.7.2.- Aceite esencial de lavanda (<i>Lavandula angustifolia</i>) ..	29
1.8.- Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	31
1.8.1.- Métodos para la determinación de CMI	32
1.8.1.1.- Método de difusión en agar	32
1.8.1.2.- Métodos de microdilución en placa	34
1.8.1.2.1.- M27-A2. Método de referencia para	
Levaduras	34
1.8.1.2.2.- M38-A. Método de microdilución para	
hongos miceliales	36



CAPÍTULO II. METODOLOGÍA.	40
2.- Preparación de los antifúngicos.	42
2.1.- Ketoconazol.	42
2.2.- Preparación de diluciones de los aceites esenciales de lavanda y árbol del té, para ser utilizadas contra <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton tonsurans</i> y <i>Microsporum</i> <i>canis</i>	44
2.3.- Preparación de diluciones de los aceites esenciales de lavanda y árbol del té, para ser utilizadas contra <i>Candida albicans</i>	51
2.4.- Preparación de los inóculos.	55
2.4.1.- Dermatofitos (<i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Trichophyton tonsurans</i> y <i>Microsporum canis</i>)	56
2.4.2.- Especies de <i>Candida</i>	57
2.4.2.1.- <i>Candida albicans</i>	57
2.4.2.2.- <i>Candida krusei</i> ATCC 6258.	57
2.5.- Llenado de placas	58
2.6.- Incubación de las placas	58
2.7.- Obtención de resultados.	58
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y ANÁLISIS.	60
3.1.- Ajuste de inóculo para los diferentes microorganismos	62
3.2.- Resultados del antifúngico ketoconazol	63
3.2.1.- Análisis del tratamiento con ketoconazol.	77
3.3.- Resultados del antifúngico aceite esencial de lavanda.	80
3.3.1.- Análisis del tratamiento con el aceite esencial de lavanda	106
3.4.- Resultados del antifúngico aceite esencial del árbol del té (TTO).	108
3.4.1.- Análisis del tratamiento con el aceite esencial árbol del té (TTO)	132
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES.	136
BIBLIOGRAFÍA.	138
APÉNDICES.	143
APÉNDICE 1. Preparación de medios de cultivo y soluciones.	144
APÉNDICE 2. Formas macroscópicas y microscópicas de los dermatofitos y levaduras.	149
APÉNDICE 3. Resultados de la actividad antimicótica en los aceites esenciales y esencias de lavanda y árbol del té hacia <i>Trichophyton rubrum</i>	155
APÉNDICE 4. Cálculos.	158
APÉNDICE 5. Fotos metodología.	161



INTRODUCCIÓN



Las dermatofitosis o tiñas, son un grupo de padecimientos causados por hongos parásitos de la queratina denominados dermatofitos, que afectan la piel y sus anexos (uñas y pelo), los agentes causales pertenecen principalmente a los géneros *Trichopyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*.

Este tipo de padecimientos son muy frecuentes en México, ya que ocupan un lugar importante dentro de las consultas dermatológicas; pueden presentarse en todas las edades y en ambos sexos, pero existen factores predisponentes como son el clima, malos hábitos higiénicos, uso de zapatos cerrados, ropa sintética, susceptibilidad inmunológica o genética, la diabetes, etc.

En los últimos años en el Instituto Nacional de Pediatría (INP) se han reportados casos de tiñas, cuyo tratamiento implica la administración de medicamentos por la vía oral ó tópica, dependiendo del caso y diseminación en el padecimiento, pero los fármacos disponibles actualmente por vía oral presentan desventajas sustanciales debido a que algunos de ellos son hepatotóxicos, causan efectos secundarios, requieren una administración por largos períodos; lo que causa que el paciente no cumpla con el tratamiento y no se llegue al éxito terapéutico. Otro problema que se presenta actualmente es el desarrollo de resistencia a estos fármacos, por parte de diferentes especies de hongos, por esta razón se ha incrementado el interés de buscar alternativas para tratar las dermatofitosis.

Para lo cual, se sabe que los aceites esenciales han sido utilizados en la medicina tradicional debido a que presentan diferentes propiedades terapéuticas tales como: antisépticos, analgésicos, relajantes en la aromaterapia, repelentes de insectos, etc. Estudios recientes han mostrado que los aceites esenciales de lavanda y árbol del té presentan actividad antimicótica; de manera que el desarrollo de una forma farmacéutica que contenga a los aceites esenciales como principio activo podría ser utilizado como una alternativa en el tratamiento de las dermatofitosis, pues presentaría como ventajas un bajo costo, buena aceptabilidad debido a su olor agradable, posibilidad de ser aplicado a cualquier edad; principalmente a los pacientes pediátricos, en los cuales se dificulta asignar un tratamiento.



Otra ventaja, es que hasta el momento no existen reportes de resistencia desarrollada por los hongos hacia los aceites esenciales, pues debido a su composición tan compleja, es difícil que los microorganismos presenten una resistencia a cada uno de los componentes.

Derivado de lo anterior, en el este trabajo se presenta la evaluación *in vitro* de la actividad antimicótica de dos proveedores comerciales de los aceites esenciales de lavanda y árbol del té, contra los principales agentes etiológicos causantes de dermatofitosis en pacientes que asisten al INP, al tomar como referencia las normas elaboradas por *The National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS): M38-P para hongos filamentosos con algunas modificaciones para ser adaptada a dermatofitos, y la M27-A para levaduras; con las cuales se determinaron las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) de los aceites y por medio de un análisis estadístico se seleccionó la marca de aceite esencial que presenta la mayor actividad antimicótica.

Al comprobarse la actividad antimicótica de estos aceites esenciales y determinar su CMI se desarrollará una forma farmacéutica de administración tópica que pueda ser utilizada como una alternativa para el tratamiento de las dermatofitosis.



OBJETIVOS:

- ✚ Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de dos tipos de aceites esenciales de lavanda (*Lavándula angustifolia*) y árbol del té (*Melaleuca alternifolia*), por medio de una técnica de microdilución en placa, con la finalidad de demostrar su actividad antimicótica contra los principales agentes etiológicos causantes de dermatofitosis.
- ✚ Elegir el aceite esencial con mayor actividad antimicótica y establecer una concentración final que pueda ser utilizada para el desarrollo de una forma farmacéutica de uso tópico la cual represente una alternativa en el tratamiento de las dermatofitosis.



GENERALIDADES



1.- DERMATOFITOSIS

Las micosis superficiales son un grupo de enfermedades producidas por hongos que afectan la queratina de la piel y/o mucosas. Dentro de las micosis más frecuentes se encuentran las dermatofitosis que son un grupo de padecimientos de la piel y sus anexos, ocasionados por hongos queratinofílicos denominados dermatofitos que pertenecen principalmente a tres géneros: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*.⁽¹⁾

1.1.- CLASIFICACIÓN DE LAS DERMATOFITOSIS O TIÑAS

Las tiñas se clasifican de acuerdo a la región del cuerpo humano que es parasitada y recibe las siguientes denominaciones: tiña de la cabeza (*Tinea capitis*), del cuerpo o de la piel lampiña (*Tinea corporis*), de la mano (*Tinea manum*), de la ingle (*Tinea cruris*), de los pies (*Tinea pedis*) y tiña de las uñas (*Tinea unguium*) u onicomicosis.⁽²⁾

1.1.1. TIÑA DE LA CABEZA

En México los agentes etiológicos más comunes en este tipo de tiña son: *Microsporum canis* (80%) y *Trichophyton tonsurans* (15%), los dermatofitos restantes presentan sólo el 5%.⁽²⁾

La tiña de cabeza es exclusiva de la infancia (97%) debido a una serie de factores como son el pH, depósitos de ácidos grasos que cambian después de la pubertad; ya que las glándulas sebáceas están estimuladas hormonalmente. En los adultos la enfermedad se presenta en una baja población y los que la presentan suelen tener desordenes hormonales o de inmunodepresión.⁽²⁾

No existe preferencia hacia raza ni ocupación, la mayoría de los pacientes son niños de edad preescolar, y por lo regular la fuente de infección proviene de un animal doméstico (gatos, perros), u otros niños.⁽²⁾

Existen dos tipos de tiñas de la cabeza: tiña seca e inflamatoria, los principales agentes etiológicos involucrados en la tiña seca son *Microsporum canis* y *Trichophyton tonsurans*,
Beatriz Díaz González



mientras que en la tiña inflamatoria *Microsporum canis* y *Trichophyton mentagrophytes* son los agentes causales. ⁽²⁾

1.1.2. TIÑA DEL CUERPO

Es una dermatofitosis ocasionada por algunas especies de *Trichophyton* y *Microsporum* que se caracteriza por presentar placas eritematoescamosas y pruriginosas. Las especies más frecuentes son *Trichophyton rubrum* (70%) y *Microsporum canis* (20%), el resto son causadas por *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans*, *Microsporum gypseum* y *Epidermophyton floccosum*.⁽²⁾

La infección inicia por el contacto directo con las esporas provenientes de una persona infectada o un animal e incluso a través de fómites. Afecta a los dos géneros por igual, se puede presentar en todas las edades, razas y no hay un factor predisponente. ⁽²⁾

En la tiña tricofítica el agente causal más frecuente en adultos es *T. rubrum* y en niños *T. tonsurans*. En la microspórica, *M. canis* predomina en niños y ocasionalmente es causada por *M. gypseum*. ⁽¹⁾

1.1.3 TIÑA DE LOS PIES

Es una dermatofitosis que afecta los pliegues interdigitales, plantas y esporádicamente el dorso del pie. Los agentes causales más frecuentes son *T. rubrum* (85%), *T. mentagrophytes* (10%) y *E. floccosum* (5%). ⁽³⁾

Es una dermatofitosis cosmopolita y muy frecuente, se presenta en climas cálidos y húmedos. La fuente de infección puede provenir de una persona enferma o por el contacto con esporas en piscinas, baños públicos, clubs deportivos o por fómites como toallas, calcetines y calzado.⁽²⁾



Es más frecuente en varones, predomina en adultos y esporádicamente se presenta en niños. No existe predisposición de raza, ni ocupación, sin embargo se observa más a menudo en deportistas, soldados, obreros, etc. ⁽²⁾

1.1.4. TIÑA DE LA MANO

Es una dermatofitosis que afecta los espacios interdigitales, la palma y dorso de las manos causada principalmente por *T. rubrum* (80%) y *T. mentagrophytes* (15%). ⁽³⁾

Es un padecimiento cosmopolita, que se da en climas cálidos y húmedos. La ocupación manual y la hiperhidrosis son factores predisponentes. La infección por lo regular es a partir de una tiña de pies, generalmente es unilateral, pero llegan a presentarse casos en donde es bilateral. Es una enfermedad propia de varones adultos. ⁽²⁾

La variedad más común es la hiperqueratósica, seguida de la vesiculosa y por último la intertriginosa. ⁽²⁾

1.1.5. TIÑA DE LAS UÑAS U ONICOMICOSIS

Es una infección crónica cosmopolita en donde los agentes causales más frecuentes son: *T. rubrum* (87%), *T. mentagrophytes* (9%), y otros dermatofitos en un 4%, también puede ser causada por *Candida* (3%) y otros mohos (2%). ⁽³⁾

Es un padecimiento propio de adultos pero puede presentarse en un pequeño porcentaje en niños, debido al uso exagerado de zapato tipo tenis y por antecedentes de que los padres la presentan. ⁽¹⁾ Afecta a cualquier sexo, es ligeramente predominante en varones. Otros factores predisponentes son una tiña previa, uso de zapato cerrado, uso de baños comunitarios, es muy frecuente en soldados, deportistas y obreros. ⁽²⁾

La tiña de las uñas es más frecuente en pies (90%) que en manos (10%) ⁽³⁾. El polvo de la uña es un gran foco de infección, ya que se puede diseminar fácilmente y depositarse en



calcetines, suelo de piscinas, baños, en donde las esporas se mantiene viables por mucho tiempo. ⁽²⁾

1.1.6. TIÑA DE LA INGLE

Es una dermatofitosis superficial que afecta la región inguino-crural, periné y en raras ocasiones los genitales, predomina en varones adultos, y en niños es extremadamente raro. El agente causal más frecuente es *T. rubrum* (85%), seguido de *T. mentagrophytes* (10%), *E. floccosum* (5%). ⁽³⁾

La fuente de infección comienza por el contacto directo con otras personas o por medio de fómites como toallas, ropa interior, etc. También la enfermedad se puede generar por autoinoculación a partir de una tiña de pies, ya sea por el rascado o secado posterior al baño.⁽²⁾

1.2. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

1.2.1. TOMA DE MUESTRA

En las lesiones con descamación se realiza un raspado del borde activo de la lesión (el límite de la placa) por medio de dos porta objetos. ⁽²⁾

Para la tiña de piel cabelluda se deben recolectar los pelos cortos con ayuda de unas pinzas para depilar, se colocan entre dos portaobjetos y se dividen en dos partes para su observación al microscopio. En caso de que no existan pelos cortos como es el caso de la tiña inflamatoria, se pueden tomar escamas y/o pus. ⁽²⁾

En la tiña de la cabeza, los pelos pueden ser examinarse bajo la lámpara de luz de Wood a 365 nm, debido a que algunos agentes causales producen fluorescencia; tal es el caso de *M. canis*, *M. gypseum*, que producen un verde brillante y verde claro respectivamente. ⁽²⁾



Existe una técnica de gran utilidad para el diagnóstico de tiña de cuerpo y cabeza, el cual consiste en utilizar un pedazo de alfombra de 4 x 4 cm, que se esteriliza previamente por autoclave, y posteriormente se frota en la parte infectada, una vez obtenida la muestra, se pone en contacto con el medio de cultivo en placa para favorecer el crecimiento y caracterizar el agente causal. (2)

En el caso de la tiña de uñas, es necesario tomar polvo o fragmentos (dependiendo del área infectada) que se obtienen con un bisturí o con un escalpelo, los cuales se depositan entre dos portaobjetos. (2)

1.2.2 EXAMEN MICROSCÓPICO

Los pelos y escamas se colocan en el portaobjetos y cubreobjetos; se le adiciona una gota de hidróxido de potasio (KOH) al 20%, el cual favorece la degradación de la queratina y aclara la preparación; este puede mezclarse con Dimetil Sulfoxido (DMSO), glicerina, o un colorante fluorescente. La preparación se calienta ligeramente o se deja reposar de 15 a 20 min. (4)

Cuando se observan pelos tiñosos, la forma de parasitación se puede dar de dos formas: ENDÓTRIX o TRICOFÍTICA y ECTO-ENDÓTRIX o MICROSPÓRICA.

- a) **ENDÓTRIX o TRICOFÍTICA:** Es cuando las esporas se encuentran dentro del pelo y por lo general corresponden a una parasitación por *T. tonsurans*.
- b) **ECTO-ENDÓTRIX o MICROSPÓRICA:** Es cuando las esporas se observan dentro y fuera del pelo, esta corresponde por lo general a *M. canis*.(2)

Cuando se observan al microscopio las escamas de uñas, se aprecian células de descamación que pueden estar parasitadas por filamentos largos, delgados o gruesos. Cuando la escamas provienen de uñas se observan filamentos abundantes, con muchos artroconidios, redondeados y dispuestos en cadenas. (2)



1.2.3. CULTIVO DE LA MUESTRA

Los medios utilizados para el primo aislamiento de los dermatofitos son el agar dextrosa Sabouraud o agar Mycosel que es el medio de Sabouraud más antibióticos que inhiben la contaminación bacteriana. Los hongos desarrollan en un periodo de 10 a 15 días incubados a una temperatura de 28°C. ⁽²⁾ (ver apéndice 1, preparación de medios)

Cuando los medio de cultivo para primo aislamiento producen poca colonización, lo cual hace que la morfología sea inespecífica, se recurren a otros medio más selectivos. Entre ellos se encuentra el medio Borelli que favorece la esporulación, otro es el agar dextrosa papa que induce la esporulación de los dermatofitos y ayuda a que se produzcan pigmentos como es el caso de *T. rubrum*. ⁽²⁾ (Ver apéndice 1)

1.3 CARACTERÍSTICAS MICOLÓGICAS DE LOS DERMATOFITOS

Taxonómicamente existen varios criterios de clasificación, por ejemplo Emms clasificó a los dermatofitos en tres géneros que son: *Trichophyton*, *Microsporum*, y *Epidermophyton*, que se basa en las características de los conidios, que son las formas asexuadas de los dermatofitos. Los conidios pueden ser microconidios los cuales son unicelulares, o macroconidios que son pluricelulares. ^(2,5)

Otros autores encontraron que los dermatofitos también se reproducían sexualmente (Griffin 1960 y Nannizi 1961), de manera que se consideraron otros criterios para su clasificación. Badillet incluye a 48 especies de las cuales 19 corresponden al género *Trichophyton*, 28 a *Microsporum* y una a *Epidermophyton*, cabe mencionar que no todos son patógenos. ⁽²⁾

La fase asexuada es la forma más sencilla y rutinaria para identificación de los dermatofitos, por que se da en los medios de cultivo ordinarios, en cambio las fases sexuadas sólo se dan en medios y condiciones muy específicos. ⁽²⁾

Los dermatofitos por su tipo de hábitat también se puedan clasificar en geofílicos, zoofílicos y antropofílicos.



- a) **Geofílicos:** son aquellos que habitan en la tierra y raras ocasiones atacan al hombre y a los animales. La especie más frecuente es *M. gypseum*, que produce las tiñas de la cabeza, cuerpo y uñas, en individuos que están en constante contacto con la tierra. ⁽²⁾
- b) **Zoofílicos:** son dermatofitos que regularmente atacan a los animales y que por el contacto con el hombre pueden infectarlo, tal es el caso de *M. canis* que tiene como reservorio natural a perros y gatos. Otro dermatofito perteneciente a esta clasificación es *T. mentagrophytes*. ⁽²⁾
- c) **Antropofílicos:** son dermatofitos que regularmente atacan al hombre y excepcionalmente a los animales. Dentro de este grupo se encuentran aquellos que son cosmopolitas por ejemplo *T. rubrum* que se reporta en casi todas partes del mundo; otros en menor grado son *T. mentagrophytes* variedad *interdigitale*, y *E. floccosum*. También se encuentran dermatofitos que tienen una distribución geográfica restringida, tal es caso de *T. tonsurans* que solo se encuentra en América Latina. ⁽²⁾

1.3.1. GÉNERO *Trichophyton*

Se distingue por presentar abundantes microconidios de aproximadamente 2 - 4 μ . que se presentan en forma piriforme, claviforme y suele producir pocos macroconidios en forma de clava. Las especies más aisladas en México son *T. rubrum*, *T. tonsurans* y *T. mentagrophytes*. ⁽²⁾

1.3.1.1. *Trichophyton rubrum*

Es el principal agente etiológico de la tiña de los pies, ingle, uñas y cuerpo, es antropofílico. La colonia desarrolla en un tiempo promedio de 15 días en medio Sabouraud a temperatura ambiente. Existen dos tipos de cepas: vellosa y granulosa. La colonia de la variable vellosa, es de aspecto vellosa, algodonosa, blanca, seca y en algunas ocasiones con micelio color rosa; al reverso presenta un pigmento color rojo-vino (Ver apéndice 2, Fig. 1,2 y 3). Pero no todas las cepas llegan a presentar pigmento. Esta cepa es la más común y la que se considera más virulenta; la variable granulosa presenta una colonia de aspecto pulverulento, blanca, plana



ilimitada y prácticamente indistinguible de *T. mentagrophytes*. Al reverso puede presentar pigmento rojo. ⁽²⁾

T. rubrum microscópicamente tiene abundantes hifas delgadas, tabicadas, presenta muchos microconidios que nacen de la hifa con aspecto piriforme o de gotas, miden de 2- 4 μ de largo y por lo regular se disponen de manera alternadas (Ver apéndice 2, Fig. 4), y en menor proporción se disponen en cruz de Lorena. La mayoría de las cepas producen pocos macroconidios que se pueden estimular con medios como el agar sangre. ⁽²⁾

La variedad vellosa presenta pocas formas de reproducción, de manera que se puede sembrar en medios como papa-zanahoria, Borelli, etc. para estimularlo. ⁽²⁾

1.3.1.2. *Trichophyton tonsuran*:

Se aísla principalmente de tiña de cabeza y cuerpo, es antropofílico. La colonia desarrolla en promedio de 10 - 15 días en medio Sabouraud a temperatura ambiente, es limitada, aterciopelada, beige o café y puede presentar 3 formas: acuminadas, cerebriforme o crateriforme. Presenta al reverso de la colonia un pigmento café-oscuro. ⁽²⁾ (Ver apéndice 2, Fig. 5, 6 y 7).

Microscópicamente tiene hifas delgadas, tabicadas, un poco más gruesas de las de *T. rubrum*, presenta abundantes microconidios piriformes en forma de lagrimas, un poco más grandes que las de *T. rubrum*, miden entre 3 - 6 μ de largo, que nacen de la hifa y se disponen en forma de cruz de Lorena (Ver apéndice 2, Fig. 8) y pocas que están alternadas. Tiene escasos macroconidios. ⁽²⁾

1.3.1.3. *Trichophyton mentagrophytes*

Se aísla de las tiñas de los pies, uñas, ingle, cuerpo, y en raras ocasiones de la cabeza, existen variedades de esta, la variedad interdigital es antropofílico, y para las demás zoofílico. Se desarrolla de 8 - 12 días a temperatura ambiente en agar dextrosa Sabouraud. ⁽²⁾



Las variantes comunes son la vellosa y granulosa. La primera presenta una colonia vellosa, algodonosa, seca e ilimitada, por lo regular no forma pigmentos, pero puede dar un pigmento rojo-vino que lo hace indistinguible de *T. rubrum*; la variable granulosa, presenta una colonia pulverulenta o polvosa, plana, seca ilimitada, color blanca o blanca-amarillenta y en raras ocasiones forma pigmento. ⁽²⁾ (Ver apéndice 2, Fig. 9 y 10).

Presenta un micelio delgado y tabicado, en lagunas cepas se pueden presentar zarcillos e hifas en espiral. La variedad granulosa forma microconidios libres, redondeados o piriformes. Las últimas nacen desde la hifa y se ven en forma de cruz de Lorena. ⁽²⁾ (Ver apéndice 2, Fig. 11 y 12).

1.3.2. GÉNERO *Microsporium*

Se caracteriza por formar abundantes macroconidios, de diversas formas, miden entre 40 -60 μ de largo por 5 - 15 μ ancho, tienen paredes gruesas, presentan septos, cuyo número depende de la especie. ⁽²⁾

1.3.2.1. *Microsporium canis*

Es uno de los principales agentes etiológicos de la tiña de cabeza y de cuerpo, es zoofílico, se desarrolla en un tiempo de 6 - 8 días en medio agar Sabouraud a temperatura ambiente. La colonia es ilimitada, de aspecto vellosa, plano, al reverso presenta un color amarillo - naranja. ⁽²⁾ (Ver apéndice 2, fig. 13 y 14).

Micromorfológicamente presenta micelio con hifas delgadas, tabicadas, ramificadas, las hifas pueden tener la forma de raqueta (huesos de perro), sus macroconidios son de aproximadamente 50 - 100 μ de largo por 10 - 20 μ de ancho, tienen septos bien definidos en forma de recuadros que van de 6 - 12 unidades. Producen pocos microconidios piriformes de 3 - 5 μ largo, dispuestos alternadamente, de manera que se requieren medios especiales como agar papa-zanahoria para estimular su producción. ⁽²⁾ (Ver apéndice 2, Fig. 15 y 16)



1.3.2.2. *Microsporum gypseum*

Se aísla de tiñas de los pies, cuerpo y en raras ocasiones de cabeza, es geofílico, se desarrolla en un tiempo promedio de 8 - 10 días a temperatura ambiente en agar Sabouraud. La colonia es ilimitada de aspecto polvoso, arenoso, de color beige, al reverso no presenta ningún pigmento. ⁽²⁾ (Ver apéndice 2, Fig. 17)

Presenta poco micelio, delgado, tabicado, con macroconidios de aproximadamente 50 - 120 μ de largo por 10 - 20 μ de ancho, tienen septos que se extienden de membrana a membrana y por lo regular las conforman de 4 - 6 unidades. La mayoría de las cepas tienen escasos microconidios. ⁽²⁾ (Ver apéndice 2, Fig. 18)

1.3.3. GÉNERO *Epidermophyton*

Dentro de este género solo se ha aislado una especie que es *Epidermophyton floccosum*, el cual se aísla de tiña de los pies, ingle y uñas, y nunca parasita en pelo. Es antropofílico, se desarrolla en un tiempo promedio de 10 a 15 días a temperatura ambiente en medio Sabouraud, su colonia es limitada, aterciopelada, color beige-blanco, en ocasiones toma el aspecto crateriforme y presenta pigmento amarillo-verdoso. ⁽²⁾ (Ver apéndice 2, Fig.19)

Presenta micelio delgado y tabicado, tiene macroconidios en forma de clava que tienen de 3 - 4 tabiques transversales, que pueden nacer de manera independiente o varias de un mismo punto como racimos, y no presenta microconidios. ⁽²⁾ (Ver apéndice 2, Fig.20)

1.4. EPIDEMIOLOGÍA

Este tipo de infecciones son muy frecuentes en México. Actualmente constituye del 70 al 80% de todas las micosis y tiene una frecuencia del 5% en la consulta dermatológica. En áreas tropicales de nuestro país, llega a ocupar uno de los 3 primeros lugares. ⁽⁶⁾



En el Laboratorio de Micología del Centro Dermatológico Ladislao de la Pascua, durante el periodo de 1955 a 1996 se diagnosticaron 20,544 micosis, de las cuales el 82.21% correspondió a las de tipo superficial. Las dermatofitosis o tiñas ocuparon el primer lugar en frecuencia dentro de estas micosis con un 91.60% (15,472 casos).⁽⁶⁾

De acuerdo con los resultados de estudios epidemiológicos reportados por el Laboratorio de Micología del Hospital General de México, la frecuencia de las tiñas ha variado a través de los años (Ver tabla 1); se encontró que en 1952 la tiña de cabeza era la de mayor frecuencia (53.7%), la cual disminuyó considerablemente para el año 2008 (1.8%). Por otro lado, se observa un incremento notable en las tiñas de pies y uñas, pues en el año de 1952, éstas representaban el 19.6% y 9.2%, respectivamente y en el año 2008, tuvieron una frecuencia de 53.0% y 25.1 % cada una.⁽²⁾

Tabla 1.

Reporte de frecuencia de tiñas en México del año 1952 al 2008, Laboratorio de Micología, Hospital General de México.⁽²⁾

Frecuencia de Tiñas en México				
	1952 (%)	1979 (%)	1991 (%)	2008 (%)
Cabeza	53.7	3.8	2.6	1.8
Cuerpo	19.6	19.3	16.4	14.5
Pies	17.5	48.0	51.3	53.0
Ingle	0.00	12.6	6.4	5.6
Uñas	9.2	16.0	23.1	25.1

Por otro lado Arenas R., en un estudio realizado en el Hospital General de la Ciudad de México durante los años 1996 - 2005, encontró que *T. rubrum* fue el agente causal del 80% de las dermatofitosis, con un discreto predominio de la afección en las mujeres (56.2%). La mayor prevalencia se encontró en mujeres dedicadas al hogar (33.5%). El 63% de la población que acudió a cita presentó tiña de las uñas, el 27.7% presentó tiña de los pies, el 5.2% tiña del cuerpo y el 2.8% presentó tiña de la ingle. Dentro de las tiñas de uñas; el 58.9% presento la primer uña del pie afectada y la variante clínica distrófica total fue la más frecuente (50.7%).⁽⁷⁾

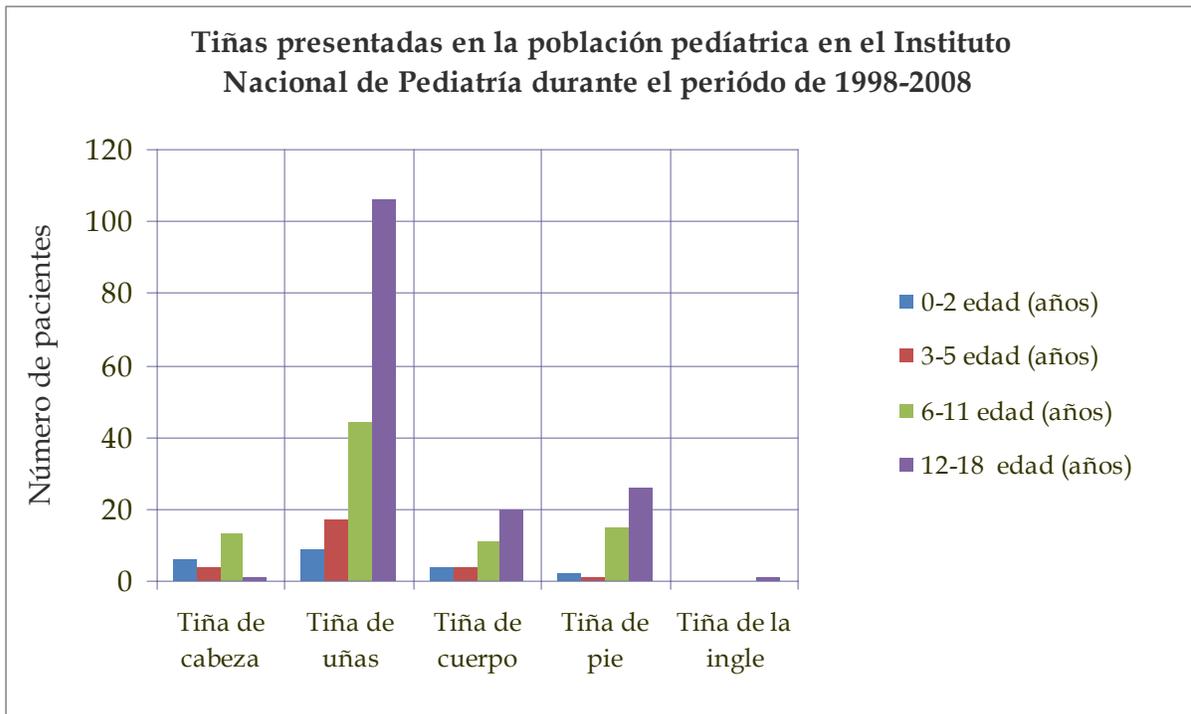


Otro estudio epidemiológico realizado por García et al. 1999, en Guadalajara, donde se estudiaron 2,227 niños de los cuales un 75% presentó dermatofitosis. La tiña de cabeza fue la de mayor frecuencia (71%), seguida de la tiña de los pies y tiña de cuerpo en un 12%, la tiña de uñas en 3% y al final la tiña inguinal en 1%. En estos casos los agentes etiológicos aislados fueron *M. canis* en un 42%, *T. tonsurans* en un 13%, *T. rubrum* en un 11%, *T. mentagrophytes* en 6%, *E. floccusum* con 5% y al final con 1% *M. gypseum*.⁽⁸⁾

En la última década se ha constatado un aumento de la tiña de pies de un 26% hasta un 45 - 52% en la población adulta principalmente en varones, mientras que en escolares este aumento ha sido de un 4 - 8%, y los principales agentes etiológicos involucrados han sido *T. rubrum* 85%, *T. mentagrophytes* 10% y *E. floccusum* en 5%.^(9, 10)

En el INP, el Laboratorio de Parasitología y Micología reportó que de 1998 al año 2008 se encontraron 284 casos de dermatofitosis, de las cuales la onicomicosis fue la de mayor frecuencia (61.97%), en segundo lugar la tiña de pie (15.49%), en tercer lugar la tiña de cabeza (13.48%), la tiña de cuerpo el cuarto lugar (13.73%); y el quinto lugar lo ocupa la tiña de la ingle (0.35%). (Ver gráfico 1)

Gráfico 1





Así mismo se observa que la población más afectada la presentan los adolescentes que se encuentran entre 12 - 18 años, lo cual corresponde con datos de la literatura. ⁽¹¹⁾

De acuerdo con los registros del laboratorio de micología, obtenidos después del análisis de las muestras, se confirmó el diagnóstico de dermatofitosis en un 82.39% de los casos, de los cuales las seis especies más frecuentes en las muestras fueron: *T. rubrum*, *M. canis*, *T. tonsurans*, *C. sp*, *T. mentagrophytes*, y *C. albicans*. (Ver tabla 2)

Tabla 2

Agentes Etiológicos más frecuentes aislados de pacientes pediátricos durante el periodo de 1998-2008 en el Lab. De Parasitología y Micología del INP.

Agente Etiológico	Casos	Porcentaje
<i>Trichophyton rubrum</i>	115	40.49
<i>Microspurum canis</i>	20	7.04
<i>Trichophyton tonsurans</i>	17	5.98
<i>Candida sp</i>	14	4.92
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	10	3.52
<i>T.rubrum</i> + otro agente	13	4.57
<i>Candida albicans</i>	7	2.46
<i>Candida parapsilosis</i>	4	1.4
<i>Candida albicans</i> + otro agente	3	1.05
<i>Microsporium gypseum</i>	3	1.05
<i>Epidermophyton floccusum</i>	1	0.35
Otras levaduras	8	2.81
Otros filamentosos	19	6.69
Sin cultivo	50	17.61
TOTAL DE CASOS	284	100

Durante muchos años se consideró que la onicomycosis en niños era rara, sin embargo en los últimos 10 - 15 años, ha despertado un interés por el incremento de pacientes. Un estudio realizado, en niños con onicomycosis muestra que este padecimiento se ha incrementado progresivamente a una frecuencia de 4.8%, siendo el grupo más afectado entre los 12 - 18 años de edad, esto probablemente por factores como la práctica deportiva y la pubertad. La principal fuente de infección fueron los padres (42.2%) y personas cercanas que padecían



onicomicosis o tiña de pies (65%). Dentro de este estudio los agentes etiológicos más comunes fue *Candida* (66.6%) y *T. rubrum* (33.3%).⁽¹²⁾

Bonifaz et al. 2007, observaron 16 casos de onicomicosis en niños menores de dos años de edad, en un periodo de 18 años en dos hospitales públicos de México, en donde encontraron como principal factor predisponente el síndrome de Down; como variedad clínica la onicomicosis OSD, y *T. rubrum* como agente causal principal.⁽¹³⁾

1.5. TRATAMIENTO

Existen dos tipos de tratamientos para combatir las dermatofitosis: sistémico y tópico. La selección de cada uno de ellos depende del tipo de padecimiento, así como tipo de paciente.⁽²⁾

1.5.1. TERAPIA SISTÉMICA

Es obligatoria en la tiña de cabeza y onicomicosis, en padecimientos extensos, e indispensable cuando la terapia tópica haya fracasado, no todos los pacientes pueden utilizarla, por ejemplo individuos con problemas gastrointestinales, hepáticos, y aquellos que ingieren muchos medicamentos, existe la posibilidad de que se presenten interacciones medicamentosas.⁽²⁾

Los antimicóticos sistémicos son los siguientes:

Griseofulvina: es un derivado benzofurano producido por *Penicillium griseofulvum*, es un fungistático y es el medicamento de elección para la tiña de cabeza y es útil para la tiña de uñas. Su mecanismo de acción es por queratopoyesis, que detiene en crecimiento del hongo.⁽¹⁴⁾

La griseofulvina tiene poco efecto en las tiñas de pies y manos, debido que se presenta hiperqueratosis, que impide que el fármaco llegue a la capa córnea que es donde lleva a cabo su mecanismo de acción. De manera que en estos padecimientos se recomienda utilizar primero un queratolítico como ácido salicílico o urea.⁽¹⁴⁾



Los efectos adversos fluctúan entre 10 - 25%, al ser entre ellos irritación gástrica, cefalea, vómito, fotosensibilidad, y esta contraindicado en daño hepático, embarazo y lactancia. ⁽¹⁴⁾

Ketoconazol: es un imidazol sintético de actividad fungistática, es un medicamento de alto espectro que actúa contra los dermatofitos y *Candida spp.* Actúa de la misma manera que la griseofulvina por queratopoyesis. Es muy útil en tiña de cabeza, uñas e ingle principalmente cuando se asocia con candidiosis. ⁽¹⁴⁾

Los efectos secundarios se presentan entre 5 - 15% de los casos en los que se presenta irritación gástrica, vómitos, riesgo de hepatitis medicamentosa, efectos hepatotóxicos y antiandrogenéticos. Esta contraindicado en daño hepático, embarazo y lactancia. ⁽¹⁴⁾

Itraconazol: es un derivado triazólico similar al ketoconazol, así como su mecanismo de acción, su espectro abarca dermatofitos y *Candida spp.* ⁽¹⁴⁾

Tiene menos efectos colaterales que la griseofulvina y el ketoconazol como irritación gastrointestinal, erupciones cutáneas. Esta contraindicado en daño hepático, embarazo y lactancia. ⁽¹⁴⁾

Fluconazol: es un derivado triazol, es muy efectivo en todas las variedades de tiña. Es un fungistático y su espectro abarca dermatofitos y *Candida spp.* Presenta pocos efectos secundarios, y esta contraindicado en embarazo, lactancia, y daño hepático. ⁽¹⁴⁾

Terbinafina: es una alilamina fungistático y fungicida, es efectiva contra dermatofitos y en menor acción contra *Candida spp.* Se presenta en comprimidos de 250 mg. ⁽¹⁴⁾

1.5.2. TERAPIA TÓPICA

Esta es útil cuando los casos son poco extensos o diseminados, se emplea sobre todo en tiñas de piel lampiña, también puede ser administrado como terapia concomitante con el medicamento oral, con el que se alcanzan más altos índices de curación. ⁽²⁾



También la terapia tópica se emplea cuando los pacientes no pueden ingerir medicamentos orales, por problemas a nivel gástrico, hepáticas, o multiterapia y pacientes pediátricos. ⁽²⁾

Entre los antimicóticos tópicos se encuentran los siguientes:

Imidazoles: dentro de ellos se encuentran el clotrimazol, isoconazol, ketoconazol, miconazol, oxiconazol, todos están indicados para tratar tiñas de pies, cuerpo, e ingule, son fungistáticos, se presentan en cremas, óvulos vaginales, soluciones, al 2 o 1 %, etc.

Como efectos secundarios se presentan dermatitis por contacto e irritación en las mucosas, y no se han reportado interacción con otros medicamentos. ⁽¹⁴⁾

Alilaminas: la naftifina, terbinafina, y butenafina, son activos contra los dermatofitos, se presentan en cremas al 1%, y se dosifican de 1 - 2 veces al día por 4 semanas. Están indicados para las tiñas de pies, cuerpo, e ingule, como efectos secundarios se encuentran la dermatitis por contacto, no se han reportado interacciones con medicamentos. ⁽¹⁴⁾

Entre otros productos se encuentran la urea, ácido salicílico, ácido benzoico, que tiene propiedades antimicóticas y queratolíticas se utilizan en tiñas de uñas, manos, pies hiperqueratósicas. El ácido salicílico se emplea en porciones del 3 - 5%, la urea en 10 - 20%.⁽²⁾

Entre otros antimicóticos se encuentran la amorolfina que tiene efecto fungistático y fungicida, se utilizan en tiñas de pies, cuerpo e ingule, se presenta en crema al 0.5% y solución al 1%.

La ciclopiroxolamina es un fungicida que aún se desconoce su mecanismo de acción, pero se cree que actúa a nivel de membrana y pared fúngica, se presenta en laca al 1%, y esta indicado en onicomycosis. ⁽¹⁵⁾



1.6. PROBLEMÁTICA DEL TRATAMIENTO EN DERMATOFITOSIS

La resistencia de los hongos hacia los antimicóticos se presenta cada vez con mayor frecuencia, y los casos de mala respuesta terapéutica al aplicar un tratamiento sistémico son atribuidos a factores como interacción de medicamentos, dosificación inadecuada, o una mala absorción. ⁽¹⁶⁾

En el Hospital de Especialidades Centro Médico Nacional siglo XXI, ante el aumento de personas con dermatofitosis y mala respuesta terapéutica, se realizó un estudio de sensibilidad antifúngica hacia el itraconazol, ketoconazol, y fluconazol en 36 aislamientos de dermatofitosis. Las dermatofitosis se localizaron en uñas (19 casos), cuerpo (8), plantas de pies (6), ingle (2), y cabeza (1); y las especies identificadas fueron *T. rubrum* (25 casos), *T. mentagrophytes* (6), *T. tonsurans* (3), *E. floccosum* (1) y *M. canis* (1). De los 36 aislamientos solo 7 (19.4%), mostraron valores de CMI que los ubicaron como resistentes a uno o varios antimicóticos. (Ver tabla 3)

Tabla 3.
Dermatofitos resistentes a ketoconazol, itraconazol o fluconazol (valores en µg/mL)*.

Dermatofitos	Procedencia	Ketoconazol	Itraconazol	Fluconazol
<i>Trichophyton rubrum</i> (04-509)	Tiña plantar	> 32	> 32	> 256
<i>Trichophyton rubrum</i> (04-519)	Onicomicosis	0,032	0,25	> 96
<i>Trichophyton rubrum</i> (05-325)	Onicomicosis	0,003	0,064	> 128
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (04-504)	Tiña del cuerpo	0,003	0,012	> 64
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (04-537)	Tiña plantar	0,004	0,008	> 64
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (04-711)	Tiña plantar	0,012	0,125	> 96
<i>Trichophyton tonsurans</i> (05-83)	Tiña de la cabeza	0,006	0,016	> 128

Tomado de Revista Iberoamericana de Micología, 24:(2007) ⁽¹⁶⁾

*Parámetros de resistencia establecidos por el *Clinical Laboratory Standars Institute* (NCCLS) en su método M38-A para hongos filamentosos: ketoconazol >16 µg/mL, fluconazol >64 µg/mL e itraconazol >16 µg/mL.⁽¹⁷⁾

Como se observa en la tabla anterior, el fluconazol, mostró ser una de los antimicóticos menos efectivo en los casos de dermatofitosis. El primer caso de tiña plantar que mostró elevados valores de CMI en los tres antifúngicos; fue tratado previamente con miconazol tópico conjunto a 100 mg de itraconazol que se administró diariamente por 7 días, lo que



demuestra que existe el riesgo de crear una resistencia; ya sea por el abuso de los mismos o el incremento de factores de inmunodepresión, etc. Aunque los pacientes recibieron tratamientos adecuados y en quienes fueron eliminados los factores que podrían interferir con la efectividad, obliga a repetir el tratamiento, prolongar el tiempo de administración o cambiar de fármacos, aunque en ocasiones la respuesta es deficiente. ⁽¹⁶⁾

Un problema que se presenta con los pacientes pediátricos es que no todos los fármacos pueden ser utilizados, debido a que algunos están contraindicados, tal es el caso de la terbinafina, itraconazol y fluconazol; ya que no están aprobados por la *Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento de onicomicosis en estos pacientes. ⁽¹¹⁾

El itraconazol que tiene un amplio espectro de acción y esta disponible en cápsulas y suspensión oral, tiene menos efectos secundarios, sin embargo presenta interacciones medicamentosas, pues es inhibidor del citocromo P₄₅₀, como la mayoría de los antifúngicos. ⁽¹⁸⁾

Con respecto al tratamiento en onicomicosis pediátricas, cuando esta es muy superficial o en etapas iniciales, el tratamiento tópico con cremas o lacas puede tener buen resultado. ⁽¹⁹⁾

De manera que es muy importante contar con un tratamiento eficaz y disponible para todos los miembros de la familia, con el fin de evitar la autoinoculación y el contagio de otras personas.

1.7 ACEITES ESENCIALES COMO ALTERNATIVA DE TRATAMIENTO

Como ya se ha mencionado anteriormente, debido al aumento de los microorganismos resistentes a fármacos y de la incidencia de efectos adversos asociados al uso de los medicamentos, se ha incrementado el interés por utilizar la medicina natural y tradicional en el tratamiento de diversas enfermedades, incluidas las infecciones causadas por hongos. Todo ello ha permitido el resurgimiento del uso de aceites esenciales y extractos de diversas plantas, en las que se ha comprobado que tienen propiedades terapéuticas; entre ellos se



tiene el aceite esencial del árbol del té (*Melaleuca alternifolia*), y el aceite esencial de lavanda (*Lavandula angustifolia*).^(25-26,41)

1.7.1 ACEITE ESENCIAL DEL ÁRBOL DEL TÉ (*Melaleuca alternifolia*),

Melaleuca alternifolia o árbol del té, es una planta nativa de la región costera del noreste de Australia, que pertenece a la familia de las *Mirtaceas* (*Myrtaceae*). De sus hojas se obtiene por el método de destilación por arrastre con vapor, un aceite esencial denominado comunmente como “aceite esencial del árbol del té” o “Tea Tree Oil” (TTO, por sus siglas en inglés), que ha sido usado en Australia como un antiséptico tópico por más de 80 años,⁽²⁰⁾ también como antiinflamatorio.⁽²¹⁾

Se han hecho estudios en donde se ha evaluado la actividad antimicrobiana del árbol del té, y varios autores han coincidido que dicha actividad se presenta en concentraciones menores a 1.0%, mientras que en especies que infectan a la piel como los géneros: *Staphylococcus*, *Micrococci*, *Enterococcus faecalis*, y *Pseudomonas aeruginosa*, se han encontrado CMI's del 2%.^(22,23)

Algunas investigaciones han confirmado que el aceite esencial del árbol del té tiene actividad en un amplio espectro contra bacterias gram positivas y negativas, incluyendo *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus aureus*.⁽²⁴⁾

La actividad microbiológica del aceite del árbol del té, también ha sido evaluada en hongos, de manera que se han encontrado concentraciones antifúngicas en el rango de 0.12 - 2%.⁽²⁵⁾

Otra investigación demostró que este aceite puede ser una alternativa de uso en el tratamiento tópico para infecciones superficiales causadas por *Candida*, pues se ha determinado la actividad *in vitro* por medio de CMI's al 90% (Concentración Mínima de un antimicrobiano que muestra inhibición en el crecimiento de un microorganismo en un 90% con respecto a un control de crecimiento) en especies como *Candida albicans*, *Candida glabrata*,



Candida parapsilosis entre otras (*Candida sp.*) en concentraciones menores a 0.5% v/v de aceite esencial. ⁽²⁶⁾

Un estudio por Hammer et al. 2000, realizado en especies de *Malassezia* (levaduras que son comúnmente encontradas en la piel humana en particular cuando las excreciones de sebo son elevadas) demostró que el aceite esencial de TTO, puede ser utilizado como tratamiento en infecciones causadas por estos oportunistas. En esta investigación se encontraron CMI's al 90%, (CMI₉₀), de 0.12% v/v para especies de *Malassezia furfur*. ⁽²⁷⁾

Entre otros agentes en los cuales se ha evaluado la actividad antifúngica *in vitro* están algunos aislados de hongos filamentosos como son: *Penicillium sp*, *Fusarium sp*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus*, *Alternaria sp*, así como dermatofitos: *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *M. canis*, *M. gypseum*, *E. floccusum*, en los que se han encontrado CMI's al 90%, menores a 0.5% v/v de aceite esencial. ⁽²⁸⁾

El aceite esencial del árbol del té, está compuesto por una serie de alcoholes mono y sesquiterpénicos, de los cuales se ha encontrado en mayor proporción el terpinen-4-ol (ver tabla 4). ⁽³⁰⁾

Tabla 4. Componentes del aceite esencial del árbol de té.

Componentes	Porcentaje
Terpinen-4-ol	41.5
γ-terpineno	21.2
α-terpineno	10.2
terpinoleno	3.5
α-terpineol	2.9
α-pineno	2.5
1,8-cineol	2.1
p-cymeno	1.5
aromadendreno	1.0
limoneno	0.9
Otros	13.48

Journal of Applied Microbiology; 2001.⁽³⁰⁾



Los componentes del TTO que han demostrado tener mayor actividad con una concentración mínima inhibitoria menor a 0.25 % son el terpinen-4-ol, α -terpineol, linalol, α -pineno y β -pineno; así como el 1,8-cineol. Para el resto de los componentes su el rango de actividad se encuentra entre 0.5 y 2.0%, con excepción del β -myrceno que no tiene actividad antifúngica.

(29,30)

El mecanismo de acción del aceite del árbol del té contra los hongos ha sido estudiado principalmente en el género *Candida*, por ejemplo, se ha determinado que al tratar a *Candida albicans* con una concentración de aceite de 0.25 % y 1 %, altera la permeabilidad de la membrana; así como su fluidez a las 24 h de exposición. Se piensa que los terpenos se insertan entre las cadenas lipofílicas que componen las membranas, por lo que alteran su composición y también su función.

También en este mismo estudio encontraron que al exponer a las células de *Candida* con el aceite, se presentaba una fuga del ion K^+ , mismo efecto que se presenta cuando una célula es expuesta a una enzima lítica. Como la función de la membrana es mantener una barrera de impermeabilidad al paso de iones, la cual es regulada por su estructura y composición química; la fuga de este ion, es un indicativo que la estructura de la membrana ha cambiado y por lo tanto se afecta el metabolismo y la célula muere. (31)

En otro estudio se demostró que el aceite del árbol del té inhibe el medio de acidificación que se produce cuando se induce la glucosa a las células de *Candida* en concentraciones de 0.2, 0.3 y 0.4 % v/v de aceite, esta acción parece perjudicar a la ATPasa de la membrana plasmática, ya que en una investigación se encontró que el terpeno sesquiterpeno dialdehído poligodial inhibe la ATPasa mitocondrial, lo que afecta el medio de acidificación de manera indirecta así como la disminución de ATP.(32) También este estudio esta soportado por una investigación en donde muestran que el terpeno eugenol inhibe la respiración mitocondrial y la producción de energía. (33)

También se ha comprobado que el aceite del árbol del té, inhibe la formación del tubo germinativo o conversión micelial en *C. albicans*, en concentraciones de 0.25 - 0.125% de



aceite, y asimismo se observó que al tratar a las células de *Candida* con 0.125% de aceite, los blastoconidios (formas de reproducción de las levaduras) ya no formaban tubos germinativos. ^(34, 35)

Algunos autores se han interesado en comprobar la actividad antimicótica de algunos productos que contienen al aceite del árbol del té, como principio activo, en pacientes con dermatofitosis, por ejemplo: fueron tratados 117 pacientes con onicomicosis, de los cuales 64 personas, fueron tratadas con el aceite del árbol del té a un 100% en administración tópica, y las demás 53 fueron tratadas con clotrimazol al 1%, la aplicación se llevó a cabo 2 veces al día por 6 meses. Después del periodo de tratamiento, no hubo diferencia significativa en la curación total de los pacientes, ($p > 0.05$), sin embargo el 7.8% de la población que fue tratada con TTO (5 personas), mostraron efectos de irritación, eritema y edema, mientras que con el clotrimazol solo el 5.7% mostró dichos efectos (3 personas). ⁽³⁶⁾

Lo anterior es un indicativo que la concentración de aceite a utilizar depende mucho de la presencia de efectos adversos, es por eso que es importante determinar una CMI que pueda ser utilizada en una forma farmacéutica tópica que pueda ser utilizada en estos padecimientos.

En otro estudio 137 pacientes con diagnóstico de *Tinea pedis*, fueron tratados de la siguiente manera: 36 pacientes con TTO al 25% con un vehículo de etanol y propilenglicol; 38 pacientes con TTO al 50% con vehículo y 46 pacientes fueron tratadas con placebo (vehículo), el tratamiento se aplicó por 4 semanas, dos veces al día. El 48% de los pacientes que fueron tratados con 25% del aceite mostró cura, mientras que el 50% de los pacientes que fueron tratados con 50% de TTO mostró cura y 13% en pacientes con el placebo también mostró cura, por lo que el TTO fue significativamente mejor que el placebo ($p < 0.0005$) y solo 2.8% del grupo que fue tratado con 25% y el 7.9% de la población tratada con el aceite al 50%, mostró dermatitis severa ⁽³⁷⁾

En la literatura se ha reportado que algunos compuestos que contiene el aceite del árbol del té, han generado casos de dermatitis de contacto, principalmente en personas de sexo femenino. La causa probable de estas reacciones adversas es el almacenamiento incorrecto de estos productos, lo que produce un alto porcentaje de epóxidos, peróxido y endoperóxidos



(monoterpenos), derivados de la oxidación de los componentes del TTO. ⁽³⁸⁾ Es por eso que el almacenamiento correcto de los aceites esenciales es de gran importancia, pues factores como la luz, exposición al aire, puede cambiar considerablemente la composición; ya que se ha visto que los niveles de P-cimeno incrementan mientras que el de α y γ -terpineno declinan. ⁽³⁹⁾

Se han encontrado un total de 16 alérgenos monoterpénicos en el TTO, de los cuales los más importantes son: terpinoleno, ascaridol, (α -terpineno, 1,2,4-trihidroximentano y limoneno, así como un sesquiterpeno, el α -felandreno. Estos alérgenos se incorporaron a un vehículo y fueron administrados de manera tópica a pacientes, con el fin de observar efectos adversos. (Figura 1, tabla 5) ⁽³⁸⁾

Figura 1

Estructuras de los cuatro alérgenos más importantes derivados de la oxidación del TTO

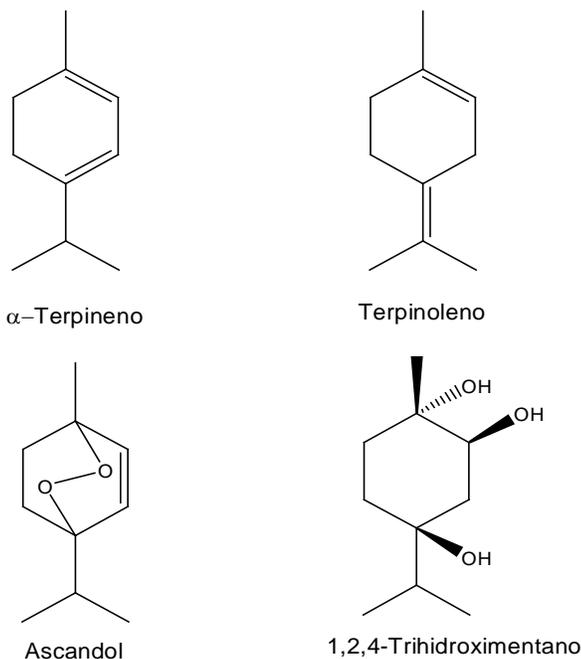




Tabla 5.
Número de pacientes que presentaron reacciones alérgicas a componentes de TTO reportados en Alemania (1998-2003).

Alergeno de TTO	casos publicados (n=38)	Nuevos casos publicados (n=20)	Total
Terpinoleno	23	17	40
Ascaridol	21	15	36
α -Terpineno	18	16	34
1,2,4-Trihidroxi metano	14	13	27
α -Felandreno	10	7	17
(+) -Limoneno	5	11	16
Myceno	4	7	11
Viridifloreno ^(S)	3	1	4
(+)-Carvono	-	4	4
(-)-Carvono	-	4	4
Aromadendreno ^(S)	1	1	2
Sabineno	-	2	2
Terpipen-4-ol	-	1	1
p-Cymeno	-	-	-
1,8-Cineol	-	-	-
α -Pino	-	-	-

Tomado de Dermatitis 2004.⁽³⁸⁾

Por tanto el terpinen-4-ol y el 1,8-cineol, que están directamente relacionado con la capacidad antimicótica no se consideran alérgenos importantes. Esta es otra razón importante por la cual se debe determinar una Concentración Mínima de Inhibición para evitar casos de reacciones adversas y alérgicas.⁽⁴⁰⁾

1.7.2 ACEITE ESENCIAL DE LAVANDA

Lavandula angustifolia pertenece a la familia de *Lamiaceae*, esta distribuido en la región del Mediterraneo y también se encuentra en España. El aceite de lavanda se obtiene por destilación en corriente de vapor o extracción con disolventes orgánicos, es usado en la aromaterapia, como relajante y sedante. También es un antiséptico utilizado en quemaduras, en picaduras de insectos, y en la práctica veterinaria es utilizado para matar a *Pediculus humanus* y otros parásitos.⁽⁴¹⁾



Un estudio realizado en aislados de *Candida albicans* (provenientes de aislados vaginales y orofaríngeos), demostró que a bajas concentraciones de este aceite esencial (0.69% v/v en aislados vaginales y 1.04% v/v en orofaríngeos) es capaz de inhibir la formación del tubo germinativo y la elongación de la hifa, lo que indica que puede ser efectivo en el dimorfismo de la levadura para que se reduzca la progresión del hongo y la difusión de la infección en el huésped. ⁽⁴²⁾

Otros estudios han demostrado que el aceite esencial de lavanda tiene actividad contra algunos hongos como son: *Aspergillus niger*, *Penicillium sp*, *Rhizopus sp*, *Mucor sp*, *Penicillium sp*, así como en algunos dermatofitos como *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, y *Epidermophyton floccusson* en concentraciones entre 0.5 - 1% v/v. ⁽⁴³⁾

La composición química consta de monoterpenos y sesquiterpenos, de los cuales el acetato de linalol y el linalool son los que se encuentran en mayor proporción (43.13 % y 32.75 % respectivamente). ⁽⁴²⁾

Tabla 6
Composición química del aceite esencial de Lavanda ⁽⁴²⁾

Componentes	Porcentaje
2-Octanone/myreno	2.41
Limoneno	0.27
1,8-Cineol	0.60
Trans- Ocimeno	1.50
Linalool	32.75
Camfor	0.52
Borneol	0.76
Terpipen 4-ol	3.10
α -Terpinenol	1.04
Acetato de linalool	43.13
Cariofileno	4.95
β - Farneseno	0.82
α -Humuleno	0.41
Oxido de cariofileno	0.52



En el mismo estudio se evaluó la actividad antimicótica de estos dos componentes en aislados de *Candida albicans* en los cuales se demostró que el linalool resultó ser más efectivo que el aceite esencial al mostrar una CMI en aislados vaginales de 0.09% y 0.29% v/v en aislados orofaríngeos. Y el acetato linalool fue menos efectivo. ⁽⁴²⁾

Sköld M. Et al. 2007, realizaron un estudio con la finalidad de demostrar la posibilidad de autooxidación del principal componente del aceite esencial de lavanda: el acetato de linanol, de manera que se comprobó que este compuesto se puede autooxidar por exposición al aire, y suele formar compuestos como son epóxidos, hidroperóxidos, y algunos alcoholes, a los cuales se relaciona con la causa de dermatitis de contacto. De manera que las condiciones de almacenamiento del aceite esencial son muy importantes. ⁽⁴⁴⁾

Algunas ventajas de utilizar a los aceites esenciales como tratamiento serían: no producirían efectos secundarios severos como los antimicóticos, pues al ser parte de una forma farmacéutica tópica, habría que determinar una CMI que no cause dermatitis de contacto, también sería de fácil administración, tendría aceptabilidad pues, los aceites esenciales presentan un olor agradable, podría ser utilizada a cualquier edad, sobre todo los pacientes pediátricos en los cuales se presenta una mayor problemática para la asignación del tratamiento.

Dentro de las ventajas de utilizar a estos aceites esenciales como una alternativa de tratamiento es que aún no se han presentado casos de resistencia microbológica ⁽²⁵⁾, esto tal vez a la composición tan compleja de los aceites, pues los microorganismos tendrían que llevar a cabo muchas mutaciones para crear resistencia, sin embargo existen ciertos factores ambientales que ya han sido mencionados anteriormente que pueden alterar su composición y por lo tanto su actividad, que derivarían en no llegar a un éxito terapéutico.

1.8 DETERMINACIÓN DE CONCENTRACION MÍNIMA INHIBITORIA

La CMI es definida como la más baja concentración de antifúngico que inhibe totalmente el crecimiento fúngico.



Existen diversos métodos para su determinación que constan en utilizar medios sólidos o líquidos en los que el cálculo de la concentración mínima inhibitoria se basa en la determinación de porcentajes de inhibición, con relación a un control de crecimiento.

1.8.1 MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE CMI

1.8.1.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.

Este método consiste en colocar sensidiscos impregnados con el antifúngico a diversas concentraciones sobre placas de medio de cultivo en donde se encuentra distribuido el inóculo, de manera que después de la incubación de las placas, se realiza una lectura de la medición de halos de inhibición de crecimiento.

Existe un método por difusión en agar para determinar la sensibilidad antifúngica en levaduras implementado por *The National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS); se trata del método M-44A el cual es sencillo y práctico, el cual ha sido validado solo para fluconazol y voriconazol en *Candida spp.* El medio de cultivo utilizado es agar Muller Hinton con 2% de glucosa y 0.5 µg/mL de azul de metileno que mejora la nitidez de los halos de inhibición, se utilizan sensidiscos de fluconazol de 25 µg, voriconazol de 1 µg y de posaconazol de 25 µg. El inóculo es ajustado a una escala de 0.5 MacFarland en solución salina que corresponde a una concentración de $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. Se hace la resiembra del inóculo en 3 direcciones, y se deja secar por 15 min, se incuban las placas a 35°C por 24 h para *Candida spp.* y para *Candida neoformans* por 48 h, en caso de no haber crecimiento se incuban por 24 h más. Las cepas control utilizadas en el método son: *C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC 22019 *C. tropicalis* ATCC 750 y *C. krusei* ATCC 6258.

Los criterios de interpretación son: halos de inhibición menores o iguales a 19 mm y 17 mm para fluconazol y voriconazol, respectivamente se consideran resistentes; halos mayores o iguales a 14 mm y 13 mm para fluconazol y voriconazol respectivamente, se consideran sensibles, y aquellos halos intermedios entre los dos criterios se les considera sensible dosis dependiente. ⁽⁴⁵⁾



Se han realizado estudios de susceptibilidad antimicótica en los cuales se han utilizado métodos comerciales. por ejemplo: se determinó la susceptibilidad *in vitro* en 52 aislamientos de hongos filamentosos, hacia 10 antifúngicos con el método NeoSensitabs®, que consiste en tener al antifúngico en forma de tableta a concentraciones fijas, en donde la difusión radial del antifúngico en el agar crea los halos de inhibición. En este estudio todos los aislamientos fueron sensibles a itraconazol, terbinafina y bifonazol (halos de inhibición ≥ 30 mm), 90.4% fueron sensibles al ketoconazol, 71% al miconazol y 46% al clotrimazol, los autores coinciden que este método es de gran utilidad pues es rápido fácil de realizar y económico. ⁽⁴⁶⁾

Sin embargo este método no es aplicable para todos los casos, ya que , en el laboratorio de Parasitología y Micología del INP, se realizó un estudio de susceptibilidad antimicótica por medio del método de difusión en agar contra *Trichophyton rubrum* con ketoconazol y los aceites esenciales de lavanda y árbol del té, así como a las esencias de estos, en dicho estudio se observó que los aceites no tenían una buena difusión radial en el agar, pues se que se presentó el efecto de satelitismo, ya que se presentaron zonas de inhibición irregulares, . (Ver apéndice 3, Fig. 1-6).

Bonifaz A., et al, 1997, en el Servicio de Dermatología del Hospital General de México, determinaron la actividad *in vitro* de un extracto del ajo llamado alicina, contra los principales agentes causales de dermatofitosis en pacientes que acudieron al servicio de dermatología, la determinación se realizó por tres métodos de los cuales el de difusión en agar fue descartado, debido a las complicaciones de difusión que presentó el extracto, a pesar de que la preparación fue hecha en medio acuoso. Con los otros dos métodos: sensibilidad en placa y sensibilidad en medio líquido (caldo); se encontraron CMI del extracto de 5 mg/mL, con excepción de *T. mentagrophytes* que presentó un CMI de 50 mg/mL. En este estudio el extracto fue empleado después en un tratamiento tópico en pacientes con tiña de cuerpo e inguino-crural, del cual el 90% de los casos se curaron y el 10% de los casos presentó dermatitis de contacto. ⁽⁴⁷⁾



1.8.1.2. MÉTODOS DE MICRODILUCIÓN EN PLACA

Estos métodos implican tener un medio líquido en el cual se diluye el antifúngico; así como el inóculo. La NCCLS que es *The National Committee for Clinical Laboratory Standards*, estableció dos metodologías internacionales para determinar la sensibilidad hacia ciertos antifúngicos en levaduras y algunos hongos miceliales (M27-A2: método de referencia para levaduras y la M38-A : método de microdilución para hongos miceliales).

1.8.1.2.1 M27-A2. MÉTODO DE REFERENCIA PARA LEVADURAS

Este método se utiliza en las especies de *Candida* y *Criptococcus neoformas*, y se puede realizar por medio de microdilución en placa; en donde se utilizan placas de microtiter (ELISA) de 96 pozos o de macrodilución en donde se utilizan tubos de ensaye. Los antifúngicos a evaluar son anfotericina B, fluorocitosina, ketoconazol, fluconazol, itraconazol, voriconazol, ravuconazol, posaconazol, a determinadas concentraciones.

El medio que se utiliza es el RPMI 1640 con glutamina con un amortiguador MOPS ácido (3-(N-Morfillino) propanel sulfónico) a una concentración final de 0.165 mol/L, y sin bicarbonato a un pH de 7.0 el cual tienen la característica que no antagoniza con ninguno de los antifúngicos. ⁽⁴⁸⁾ (Ver composición en apéndice 1, así como su preparación)

El tamaño del inóculo utilizado es ajustado a 0.5 en la escala de MacFarland que corresponde a $1 - 5 \times 10^6$ UFC/mL, del cual se hace una dilución 1:1000 en medio RPMI ($1-5 \times 10^3$), para obtener una concentración final en placas de $2,5 - 5 \times 10^3$ UFC/ml. La temperatura de incubación es a 35°C por 48 h y 72 h, y las cepas de control de calidad son *Candida krusei* ATCC 6258 y *Candida parapsilosis* ATCC 22019. ⁽⁴⁸⁾

La lectura de resultados se hace visualmente por medio de un espejo invertido en la cual se determina la CMI por medio de la turbidez producida por un control de crecimiento, a los cuales se les da la siguientes denotación: 0 = ópticamente claro; 1 = ligeramente turbio; 2 = disminución prominente de la turbidez; 3 = ligera disminución de la turbidez y 4 = sin



disminución de la turbidez. En los azoles y para la 5-fluorocitina se considera una CMI que elimine a más del 50%, mientras que para la anfotericina B se considera una CMI del 100% de inhibición. También la lectura de resultados se puede hacer espectrofotométricamente a las longitudes de onda 405, 490 y 530 nm, pues son las longitudes de onda máximas de absorción del medio RPMI 1640; y la CMI para los fungistáticos se determina con la densidad óptica (absorbancia) que corresponda al 50% con respecto al pocillo de control de crecimiento, mientras que para los antifúngicos fungicidas, se considera aquella concentración cuya densidad óptica corresponda al 5% del control de crecimiento. ⁽⁴⁸⁾

En una investigación realizaron diferentes métodos para determinar la actividad *in vitro* de la anfotericina B, ketoconazol, itraconazol, y flucitosina, en 30 aislados de diferentes hongos filamentosos, en los cuales la CMI fue determinada visualmente con agitación, sin agitación y espectrofotométricamente. El método utilizado fue el de microdilución en placa, y las lecturas fueron tomadas a las 48 y 72 horas de incubación. Un coeficiente de correlación fue utilizado para evaluar la reproducibilidad de cada uno de los métodos así como la correlación entre ellos. La reproducibilidad entre los tres métodos resultó ser alta (Coeficiente de correlación de 0.808 - 0.992), particularmente en el caso de los azoles y la flucitosina, y en general, el grado de correlación entre los tres métodos fue más alto (CCI > 0.98) con todos los antifúngicos bajo todas las condiciones probadas, lo que indica que con cualquier método que se evalué la CMI, no hay variación en los resultados. ⁽⁴⁹⁾ Sin embargo, se sabe que la lectura visual muchas veces genera errores, pues se debe tener un personal calificado para realizar dichas lecturas, ya que la visión varía de experimentador a experimentador, de manera que, es más confiable obtener resultados que sean cuantitativos y no cualitativos.

Existe un método alternativo para la evaluación de susceptibilidad antimicótica en levaduras, el cual es implantado por la EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*), en cual consiste en un método de microdilución en placa, en donde se utiliza el medio de cultivo RPMI 1640 con 2% de glucosa, lo que hace que el tiempo de incubación disminuya a 24 h a 35°C, la lectura se realiza solo espectrofotométricamente a una longitud de onda de 530 nm, las lecturas de CMI se consideran para la anfotericina B cuando inhibe a más del 90%, mientras que para los azoles, flucitosina y equinocandinas se consideran cuando se



inhibe más del 50%, las cepas control son las mismas que para el método de la NCCLS, y el inóculo se ajusta a un rango de $2.5-0.5 \times 10^5$ UFC/mL. ⁽⁵⁰⁾

1.8.1.2.2. M 38-A -MÉTODO DE MICRODILUCIÓN PARA HONGOS MICELIALES

Es utilizado en especies del género *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Pseudallescheria boydii*, *Sporotrix schenckii*, el medio de cultivo es el RPMI 1640 +2 % glucosa, y el inóculo es ajustado espectrofotométricamente a $0.4 - 5 \times 10^4$ UFC/mL; a determinados porcentajes de transmitancia; pues el tamaño y forma de las conidias es distinto para cada especie. En las especies de *Aspergillus*, se recomienda utilizar tween 20 para separar las conidias.

Los géneros *Aspergillus*, *Rhizopus*, y las especies de *Pseudoallescheria boydii*, *Sporotrix schenckii* se cultivan por 7 días a 35 °C en agar papa dextrosa, para inducir la formación conidias; mientras que *Fusarium* se cultiva en agar papa dextrosa 48 - 72 horas a 35 °C y luego a 25 - 28 °C hasta los 7 días.

Las temperaturas de incubación dependen de las especies a estudiar y la lectura se hace visualmente bajo los mismos criterios que en el método de microdilución para levaduras. ⁽⁵¹⁾

Los métodos *in vitro* propuestos por la NCCLS no han incluido aún a los dermatofitos, por lo que es importante que se tenga un método estandarizado que sea reproducible para elegir el tratamiento más adecuado cuando aparecen estos padecimientos. En años recientes varios autores se han dado a la tarea de desarrollar métodos de referencia con algunas modificaciones a la NCCLS, por ejemplo Fernández B., et al, 2002, evaluaron las optimas condiciones de susceptibilidad antimicótica de los dermatofitos hacia el clotrimazol, itraconazol, y la terbinafina con el método de microdilución en placa y medio de cultivo RPMI 1640 . Se evaluaron diversos parámetros como temperatura, periodo de incubación, tamaño del inóculo y criterio de CMI: completa inhibición o prominente. Las condiciones optimas fueron: un tamaño del inóculo de 1×10^4 UFC/mL, una temperatura de incubación de 28°C, un periodo de incubación de 7 días y un criterio de inhibición completo (100% inhibición). ⁽⁵¹⁾



El medio de cultivo también ha sido cuestión de investigación; Santos D.A., et al, 2005, realizaron un estudio de sensibilidad antimicótica en aislados de *Trichophyton rubrum* hacia ketoconazol, itraconazol, fluconazol y griseofulvina determinó como una variable el medio de cultivo, para ello utilizaron el medio RPMI 1640, McVeigh and Morton (MVM), y Agar Dextrosa Sabouraud en caldo. Al final la conclusión fue que el medio RPMI es el más conveniente debido a que su color permite comparar visualmente la turbidez, en el caso del medio McVeigh and Morton (MVM), que es usado para determinar la CMI de *Paracoccidioides brasiliensis*, fue el que tuvo más comparación con el RPMI 1640, pero la transparencia del medio, crea confusión en la visualización y además no hay más reportes de que este medio haya sido utilizado en dermatofitos; con respecto al caldo dextrosa Sabouraud, este fue elegido como alternativa pues es barato y es el medio de elección para los dermatofitos, sin embargo, este presenta muchas variaciones en la CMI. ⁽⁵²⁾

Con respecto a la preparación del inóculo también hay una diversidad de preparaciones, pues unos autores hacen la extracción de hifas, macroconidias y microconidias, mientras que otros solo extraen las microconidias.

En una investigación se determinó la CMI de diferentes antifúngicos en hongos filamentosos, pero con dos tipos de inóculo: hifas y conidias. Al ser evaluadas las CMI sólo con un inóculo de hifas, los valores de CMI se elevaban mientras que al utilizar un inóculo de conidios se mantenían bajas.⁽⁵³⁾ Autores han trabajado en métodos de extracción de microconios en hongos filamentosos tal es el caso de Santos D.A., et al, 2006, ⁽⁵⁴⁾ que proponen hacer una suspensión de conidios e hifas que después es filtrada a través de un papel filtro Whatman número 40 (poro de 8 μ m), con el fin de retener los fragmentos de hifas y los macroconidios, de esta investigación se obtuvo que cuando se utilizaba un inóculo sin filtrar, las CMI eran considerablemente más altas que al utilizar un inóculo filtrado. También se encontró que había una mayor reproducibilidad de las CMI cuando se utilizaba el inóculo microconidios. ⁽⁵⁴⁾ Asimismo otras metodologías proponen filtrar con una gasa pero este método no es muy confiable pues por el tamaño de poro hay posibilidad de que no se retengan las hifas, y también otros métodos proponen hacer una suspensión de hifas, macroconidios, y microconidios, que es centrifugada, y por densidad, las estructuras más grandes sedimentan y se utiliza solo el sobrenadante.



Dentro de la preparación del inóculo también se han propuesto métodos para hacer un ajuste de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), para evaluar la susceptibilidad antimicótica *in vitro*, por ejemplo, en una investigación se ajustaron los tamaños de inóculo de diferentes hongos filamentosos, por medio de un método espectrofotométrico, en el cual después de inocular la cepa en agar dextrosa Sabouraud, y ser incubada de 3 - 7 días, se hace una suspensión en la cual las partículas más pesadas se dejaban sedimentar, y se trabajaba solo con el sobrenadante. La suspensión final es ajustada a 75% de transmitancia a una longitud de onda de 530 nm; ya ajustado el inóculo se hacen diluciones de la suspensión para después resembrar cierto volumen en placas de agar dextrosa Saburaud y de esta manera obtener las UFC/mL, en el estudio encontraron que el rango de UFC en especies de *Aspergillus sp*, *Mucor sp*, *Rrizopus sp* y *Sporothrix schenckii* fueron de $> 5 \times 10^6$, $1 - 5 \times 10^5$, $4 - 9 \times 10^5$, $> 5 \times 10^6$ UFC/mL respectivamente. ⁽⁵⁵⁾

De los microorganismo a estudiar en esta investigación, un caso especial es el de *Microspurum canis*, pues de acuerdo a las revisiones realizadas con respecto a las preparación del inóculo, los autores solo involucran la obtención de microconidios, y este hongo se caracteriza por presentar más macroconidios que microconidios. Una investigación determinó las condiciones para llevar a cabo los estudios de susceptibilidad antimicótica hacia la terbinafina, ciclopiroxolamina y griseofulvina, en *Microspurum spp*. La principal variable a evaluar fue el tipo de inóculo; pues se preparó una suspensión de macroconidios, una de microconidios y una de ambas. Cuando se uso el inóculo de macro y microconidios, no se observó un buen crecimiento, mientras que con el inóculo de microconidios se obtuvo un crecimiento fue uniforme, una buena visualización en las lecturas y las CMI fueron más reproducibles, de manera que las condiciones finales fueron: el medio de cultivo Agar Dextrosa Papa para inducir la formación de microconidios, un tamaño de inóculo de 1×10^3 UFC/mL, de solo microconidios, un tiempo de incubación de 7 días, a 28°C, y un criterio de CMI de 100% de crecimiento para estos antifúngicos. ⁽⁵⁶⁾

Norris H., et al, 1999, determinaron las condiciones óptimas para evaluar la susceptibilidad antimicótica en tres especies de dermatofitos (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton tonsurans*) en el cual se uso un método de microdilución en



placa con los antifúngicos terbinafina, griseofulvina, itraconazol y fluconazol, de manera que se evaluaron diferentes tamaños de inóculo (10^3 , 10^4 , y 10^5 UFC/mL), una temperatura de incubación de 4 días a una temperatura de 35 °C. No se presentó diferencia significativa con respecto al tamaño de inóculo, ya que no hubo variación en la CMI. ⁽⁵⁷⁾

De manera que se utilizarón los dos métodos de microdilución en placa mencionados anteriormente solo que con algunas modificaciones en base a los resultados obtenidos en dermatofitos. El tamaño del inóculo se ajustó espectrofotométricamente, y solo se obtuvieron microconidios; los aceites esenciales (dos tipos de proveedores comerciales) fueron disueltos en DMSO, y se adicionó un surfactante que fue tween 80, el cual tuvo la función de incorporar los aceites en el medio de cultivo RPMI 1640, ya que la pobre solubilidad de los aceites en medio acuoso, es una limitante en evaluar su actividad microbiológica debido a su inmiscibilidad con el medio de cultivo. ⁽⁵⁸⁾



METODOLOGÍA



2. PREPARACIÓN DE LOS ANTIFÚNGICOS

2.1. KETOCONAZOL

Se pesaron 16 mg de ketoconazol (donado por el proveedor Moléculas Finas) y se disolvieron en 10 mL de Dimetil Sulfoxido (DMSO) estéril; para su esterilización se hizo pasar el DMSO a través de un acrodisco con membrana de nylon de tamaño de poro de 0.45 μm . Al final se obtuvo una concentración de 1600 $\mu\text{g/mL}$ (Ver apéndice 4 de cálculos) y a partir de esta solución se realizaron diluciones pertinentes para obtener una serie de concentraciones finales en un rango de 32 - 0.063 $\mu\text{g/mL}$. (Ver tabla 1 y figura 1)

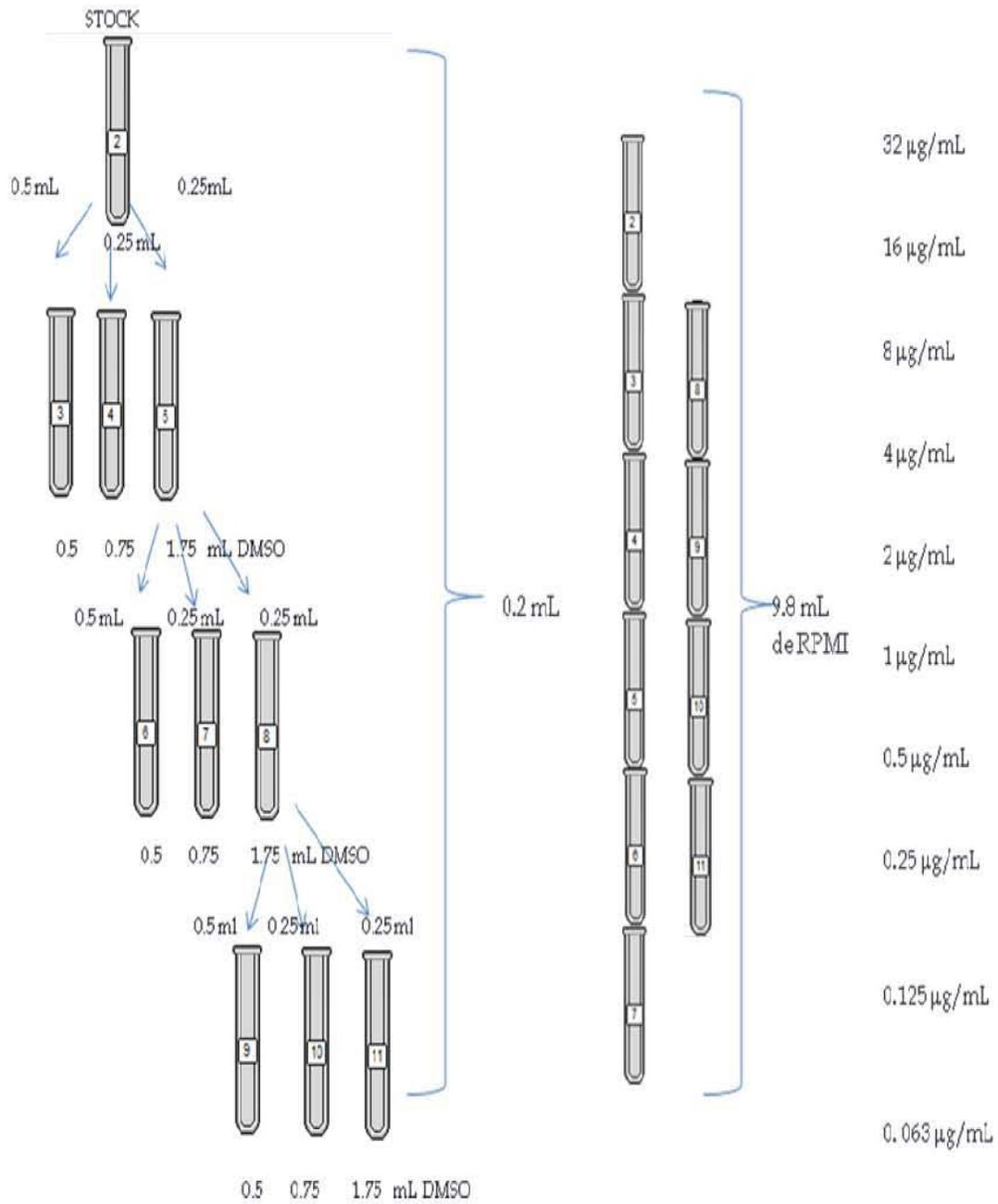
Tabla 1
Serie de diluciones de ketoconazol.

Conc. en ($\mu\text{g/mL}$) de ketoconazol	Tipo	# de tubo	1° Alícuota a tomar (mL)	1° Aforo con DMSO (mL)	1° Conc. resultante ($\mu\text{g/mL}$) de ketoconazol	2° Alícuota (mL)	2° Aforo con medio RPMI (mL)	2° Conc. final $\mu\text{g/mL}$ de ketoconazol
1600	Stock	2	---	---	1600	0.2	9.8	32
1600	Stock	3	0.5	0.5	800	0.2	9.8	16
1600	Stock	4	0.25	0.75	400	0.2	9.8	8
1600	Stock	5	0.25	1.75	200	0.2	9.8	4
200	5	6	0.5	0.5	100	0.2	9.8	2
200	5	7	0.25	0.75	50	0.2	9.8	1
200	5	8	0.25	1.75	25	0.2	9.8	0.5
25	8	9	0.5	0.5	12.5	0.2	9.8	0.25
25	8	10	0.25	0.75	6.25	0.2	9.8	0.125
25	8	11	0.25	1.75	3.125	0.2	9.8	0.063

Conc = Concentración



Figura 1
Preparación de las diluciones de ketoconazol





Se realizó el llenado de 12 placas de microtiter (ELISA) de 96 pozos de fondo plano estériles (dos placas por microorganismo: *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* y *Microsporium canis*, microorganismos elegidos de acuerdo a los resultados epidemiológicos del laboratorio de Micología y Parasitología del INP, actividad que se realizó en un área estéril que fue una campana de flujo laminar; la cual se limpió con etanol al 70%, con una gasa estéril, y después se expuso a luz ultravioleta por 30 minutos.

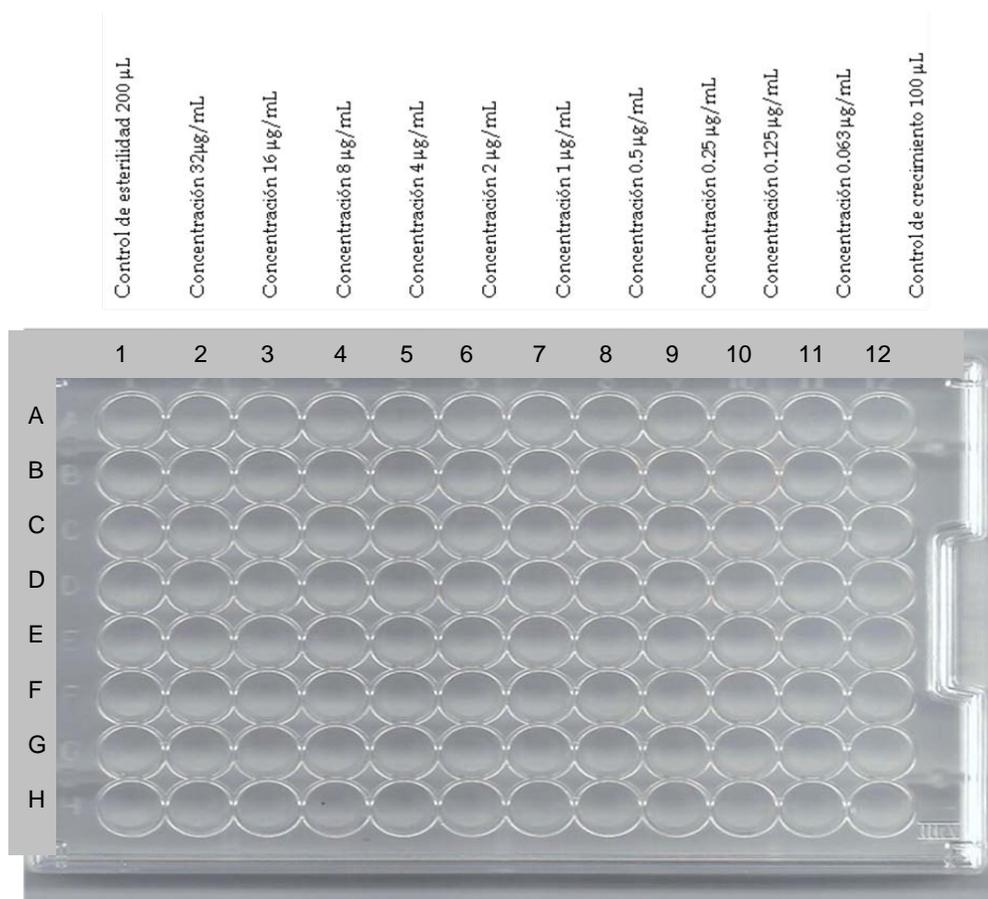
Las placas se llenaron de la siguiente manera:

- Los pocillos de la columna No.1 se llenaron con 200 μ L de medio RPMI (control de esterilidad).
- El contenido del tubo No.2 se vertió en una caja petri estéril y con ayuda de una pipeta multicanal (8 canales) se tomaron 100 μ L y se llenaron los pocillos de la columna No. 2 (2A - 2H).
- Con el contenido del tubo No. 3 se llenaron los pocillos de la columna No.3 (3A - 3H).
- Con el contenido del tubo No. 4 se llenaron los pocillos de la columna No.4 (4A - 4H).
- Este procedimiento se siguió hasta la columna No.11
- Los pocillos de la columna No.12 se llenaron con 100 μ L de RPMI con 2 % v/v de DMSO (control de crecimiento). (Ver figura 2)



Figura 2

Llenado de placas de 96 pozos con las diferentes concentraciones de antifúngico ketoconazol



Una vez llenas las placas, se sellaron con cinta adhesiva; se envolvieron con papel aluminio, para evitar la evaporación, y fueron almacenadas en un ultracongelador marca Revco a -70°C , hasta su uso.

2.2. PREPARACIÓN DE DILUCIONES DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LAVANDA Y ÁRBOL DEL TÉ (TTO), PARA SER UTILIZADAS CONTRA *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* y *Microsporum canis*.

Se prepararon dos soluciones stock: de aceite esencial de lavanda y árbol del té, para las cuales se tomaron 2.4 mL de cada aceite esencial con ayuda de una pipeta automática de un rango de 1000 - 5000 μL , y se mezclaron con 3.6 mL de DMSO estéril, de la cual se obtuvo una concentración final de 400 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Ver apéndice 4 de cálculos) y a partir de esta se



realizaron las diluciones pertinentes para obtener diferentes soluciones finales con un rango de 4 - 0.016 % v/v. A cada concentración se le adicionaron una cantidad establecida de tween 80 estéril (Autocable a 121 ° C por 15min) hasta observar su completa incorporación en el medio de cultivo RPMI 1640. (Ver tabla 2, figura 3)

Tabla 2

Serie de diluciones del aceite esencial árbol del té y lavanda utilizadas para las especies de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* y *Microsporum canis*.

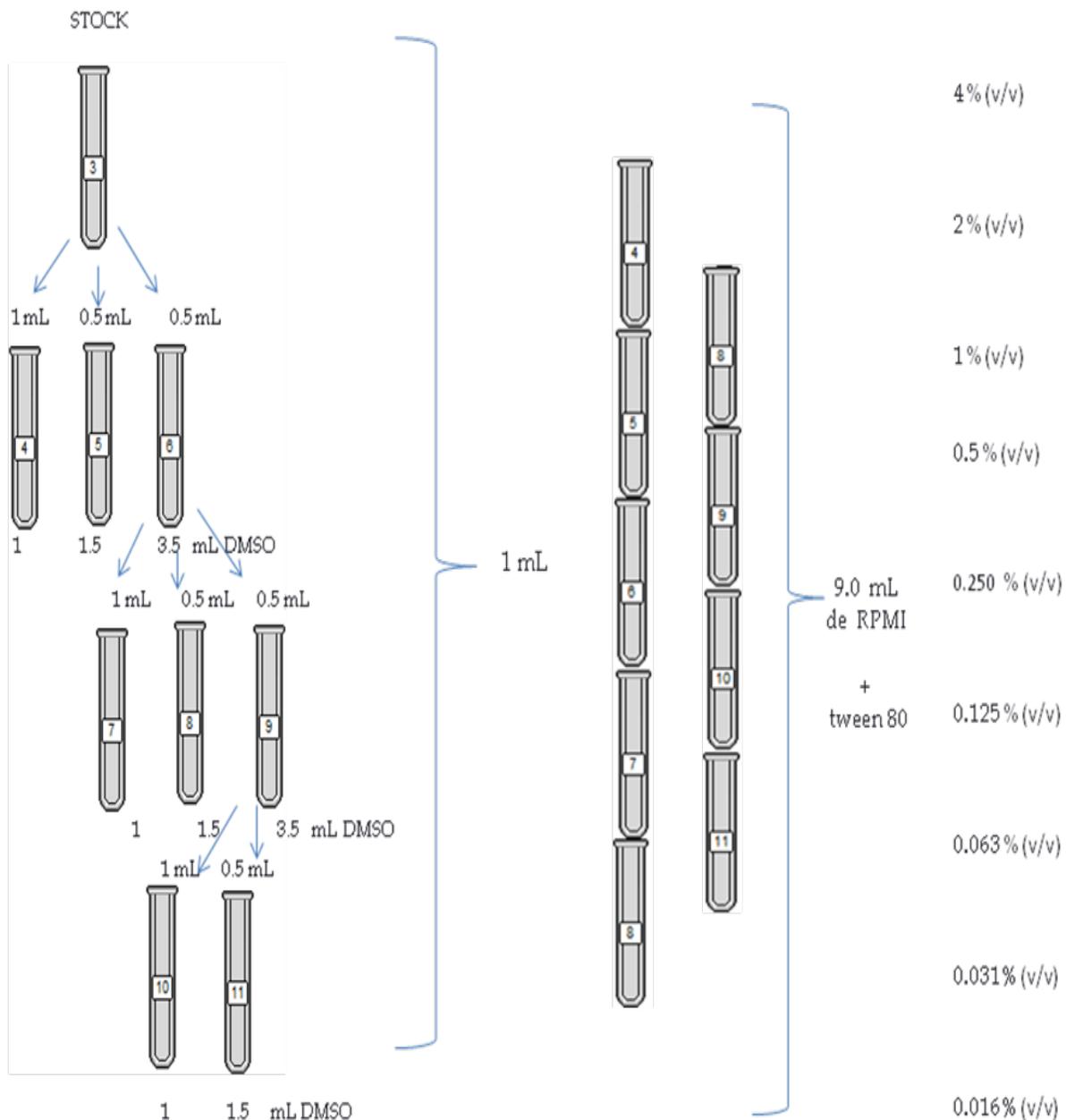
Conc. en (µg/mL) de aceite esencial	Tipo	# de tubo	1°Alicuota a tomar (mL)	1° aforo con DMSO (mL)	1° Conc. resultante (µg/mL) de aceite esencial	2° alícuota (mL)	2° aforo con medio RPMI (mL)	2° Conc. final (µL/mL) de aceite esencial	2° Conc. final (% v/v) de aceite esencial
400	Stock	2	----	----	400	1	9	40	4
400	Stock	3	1	1	200	1	9	20	2
400	Stock	4	0.5	1.5	100	1	9	10	1
400	Stock	5	0.5	3.5	50	1	9	5	0.5
50	5	6	1	1	25	1	9	2.5	0.25
50	5	7	0.5	1.5	12.5	1	9	1.25	0.125
50	5	8	0.5	3.5	6.25	1	9	0.625	0.063
6.25	8	9	1	1	3.125	1	9	0.312	0.031
6.25	8	10	0.5	1.5	1.562	1	9	0.156	0.016

Con. = Concentración



Figura 3

Serie de diluciones del aceite esencial de lavanda y árbol del té utilizadas para las especies de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* y *Microsporum canis*.





Con estas diluciones, se realizó el llenado de 10 placas de microtiter de 96 pozos de fondo plano estériles por antifúngico: aceite esencial de lavanda y árbol del té de importación y aceite esencial de lavanda y árbol del té de proveedor nacional.

El llenado de placas se realizó de la misma manera que el antifúngico ketoconazol:

- Los pocillos de la columna No.1 se llenaron con 200 μ L de medio RPMI (control de esterilidad).
- El contenido del tubo No.3 se vertió en una caja petri estéril y con ayuda de una pipeta multicanal (8 canales) se tomaron 100 μ L que se adicionaron a los pocillos de la columna No. 3 (3A - 3H).
- Con el contenido del tubo No. 4 se llenaron los pocillos de la columna No.4 (4A - 4H).
- Este procedimiento se siguió hasta completar la columna No.11
- Los pocillos de la columna No.12 se llenaron con 100 μ L de RPMI con 2 % v/v de DMSO (control de crecimiento). (Ver figura 4 y 5)



Figura 4

Llenado de placas del aceite esencial de lavanda importado y proveedor nacional utilizados contra las especies de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* y *Microsporum canis*

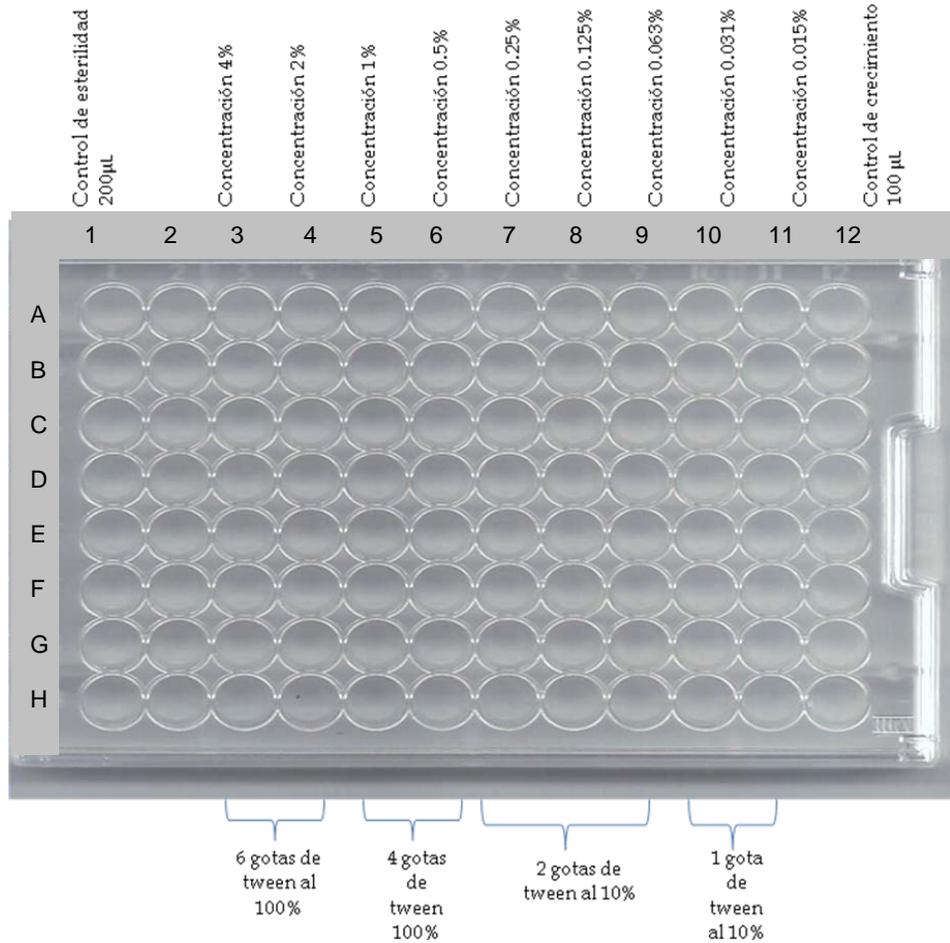
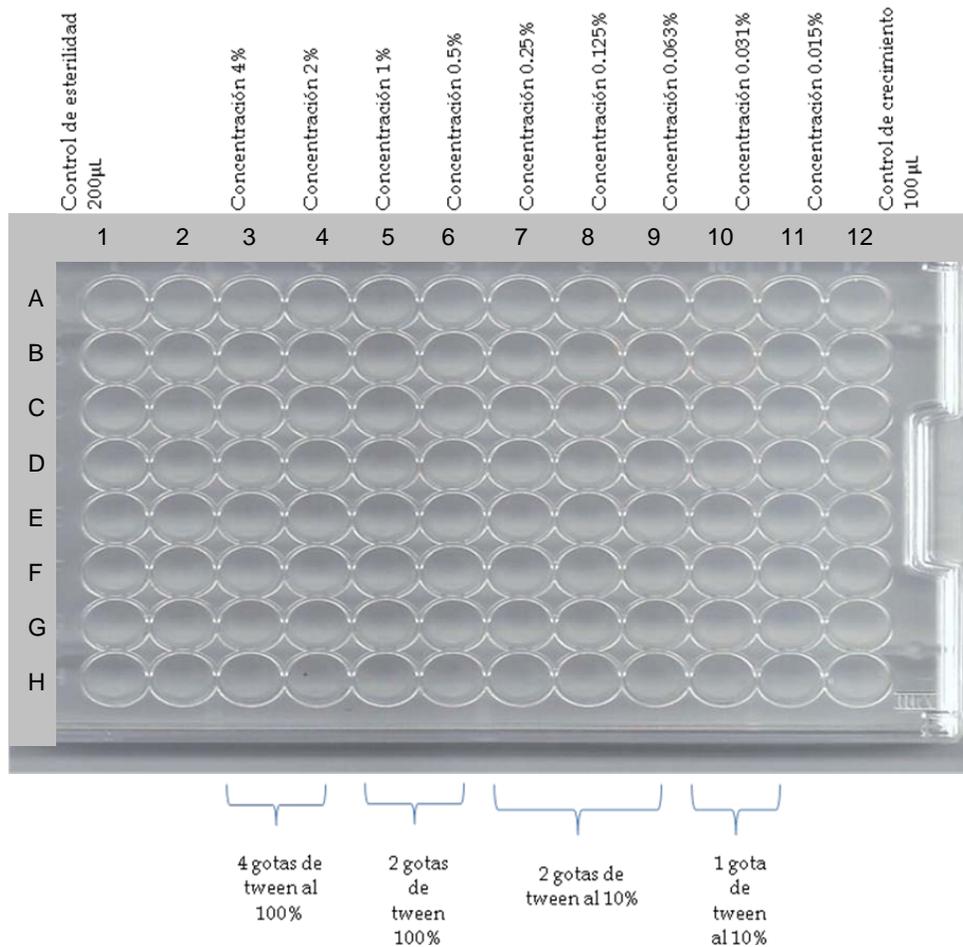




Figura 5

Llenado de placas del aceite esencial del árbol del té importado y proveedor nacional, utilizados contra las especies de *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* y *Microsporum canis*





2.3. PREPARACIÓN DE DILUCIONES DE LOS ACEITES ESENCIALES DE LAVANDA Y ÁRBOL DEL TÉ (TTO), PARA SER UTILIZADAS CONTRA *Candida albicans*.

Se preparó una solución Stock de cada antifúngico para la cual se tomaron 3.2 mL de cada aceite esencial con una pipeta automática de 1000 - 5000 μ L y se mezclaron con un volumen de 0.8 mL de DMSO estéril. La concentración final de esta solución correspondió a de 800 μ L/mL (Ver apéndice 4 cálculos) y a partir de esta solución se realizaron una serie de diluciones para obtener concentraciones finales en un rango de 8- 0.063% v/v. (Ver tabla 3 y fig. 6)

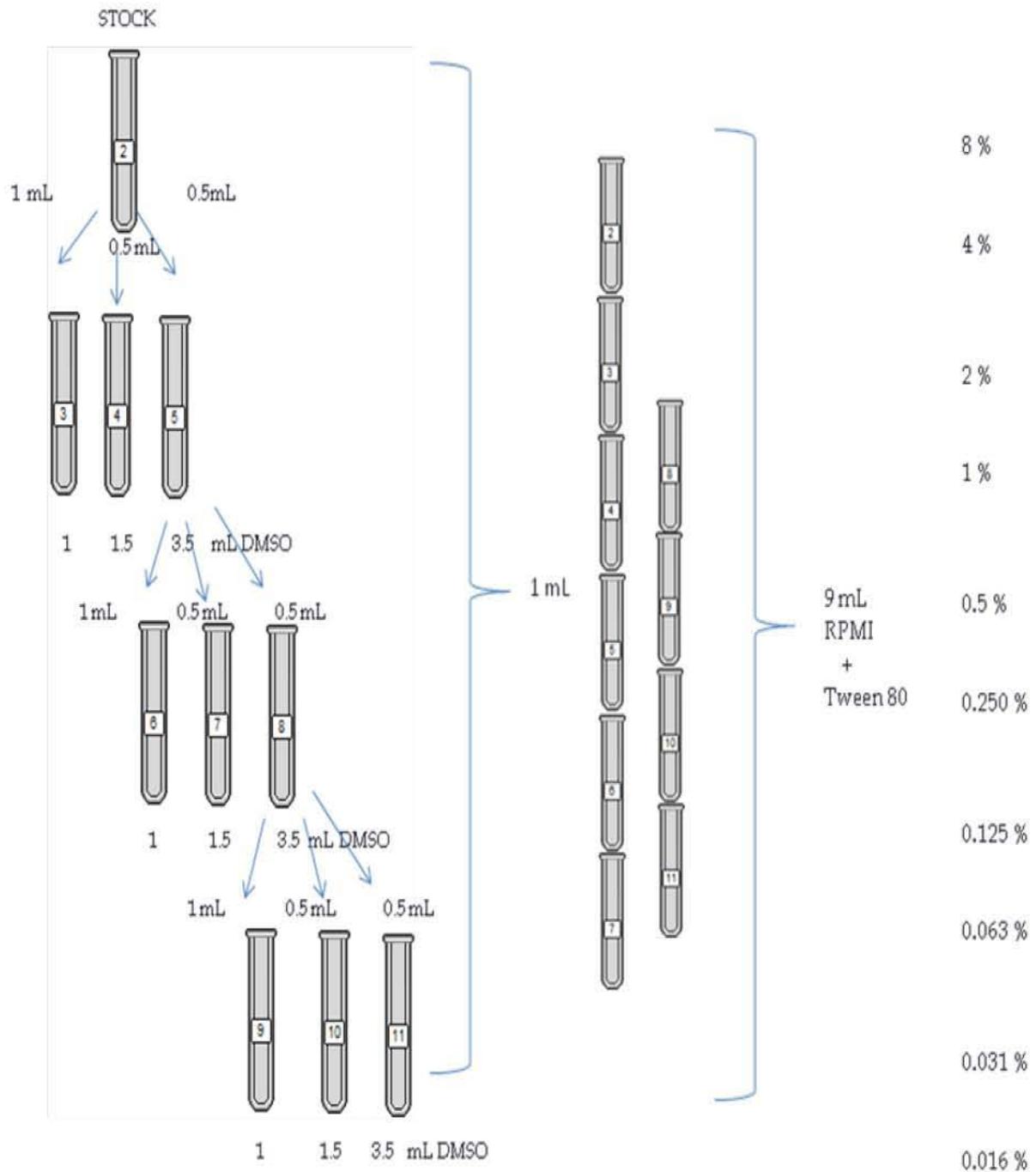
Tabla 3

Serie de diluciones de aceite esencial de lavanda y árbol del té (TTO) para *Candida albicans*

Conc. en (μ g/mL) de aceite esencial	Tipo	# de tubo	1°Alicuota a tomar (mL)	1° aforo con DMSO (mL)	1° Conc. resultante (μ g/mL) de aceite esencial	2° alicuota (mL)	2° aforo con medio RPMI (mL)	2° Conc. final (μ L/mL) de aceite esencial	2° Conc. final (% v/v) de aceite esencial
800	Stock	2	---	---	800	1	9	80	8
800	Stock	3	1	1	400	1	9	40	4
800	Stock	4	0.5	1.5	200	1	9	20	2
800	Stock	5	0.5	3.5	100	1	9	10	1
50	5	6	1	1	50	1	9	5	0.5
50	5	7	0.5	1.5	25	1	9	2.5	0.25
50	5	8	0.5	3.5	12.5	1	9	1.25	0.125
6.25	8	9	1	1	6.25	1	9	0.625	0.063
6.25	8	10	0.5	1.5	3.125	1	9	0.3125	0.031
6.25	8	11	0.5	3.5	1.563	1	9	0.1563	0.016



Figura 6
Preparación de las diferentes concentraciones de aceites de lavanda y árbol de té utilizadas en *Candida albicans*.





Se realizó el llenado de 4 placas de microtiter de 96 pozos de fondo plano estériles por antifúngico: aceite esencial de lavanda y árbol del té de importación y aceite esencial de lavanda y árbol del té de proveedor nacional.

El llenado de placas se realizó de la siguiente manera:

- Los pocillos de la columna No.1 se llenaron con 200 μ L de medio RPMI (control de esterilidad).
- El contenido del tubo No.2 se vertió en una caja petri estéril y con ayuda de una pipeta multicanal (8 canales) se toman 100 μ L y se llenaron los pocillos de la columna No. 2 (2A - 2H).
- Con el contenido del tubo No. 3 se llenaron los pocillos de la columna No.3 (3A - 3H).
- Con el contenido del tubo No. 4 se llenaron los pocillos de la columna No.4 (4A - 4H).
- Este procedimiento se siguió sucesivamente hasta la columna No.11
- Los pocillos de la columna No.12 se llenaron con 100 μ L de RPMI con 2 % v/v de DMSO (control de crecimiento). (Ver figura 7 y 8)



Figura 7
Llenado de placas del aceite esencial de lavanda para ser utilizadas en *Candida albicans*

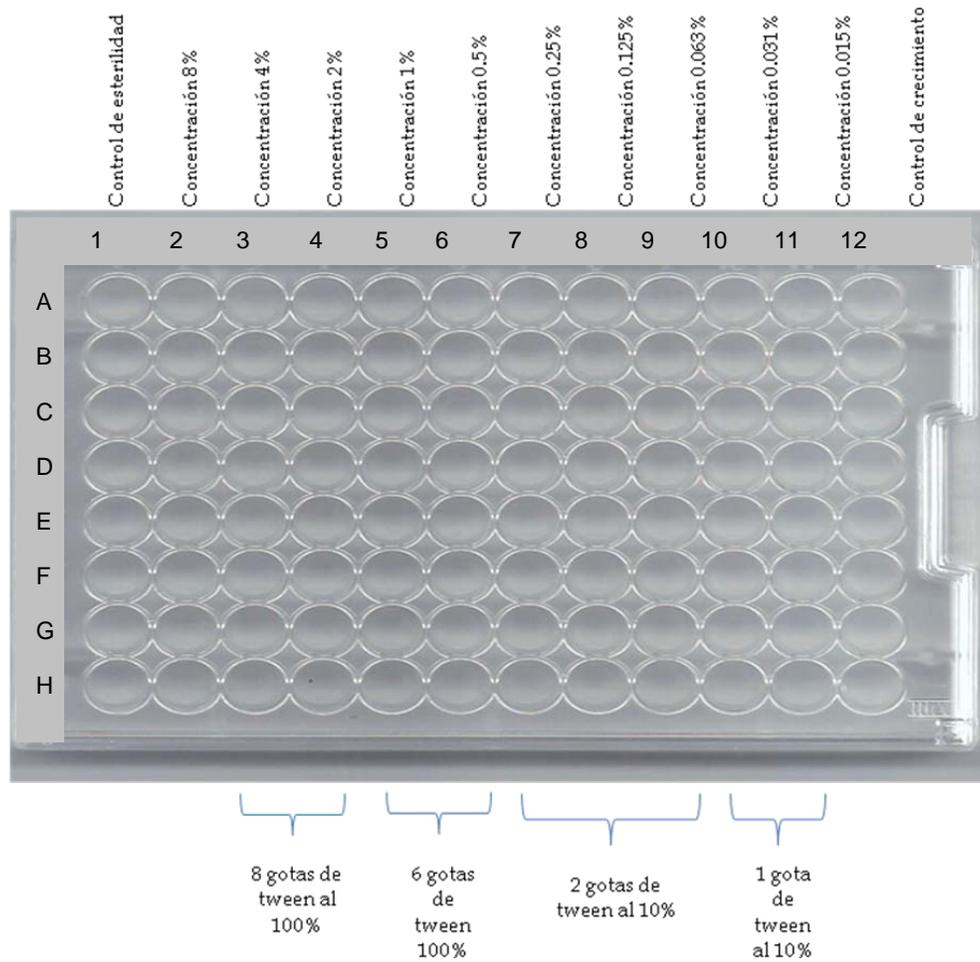
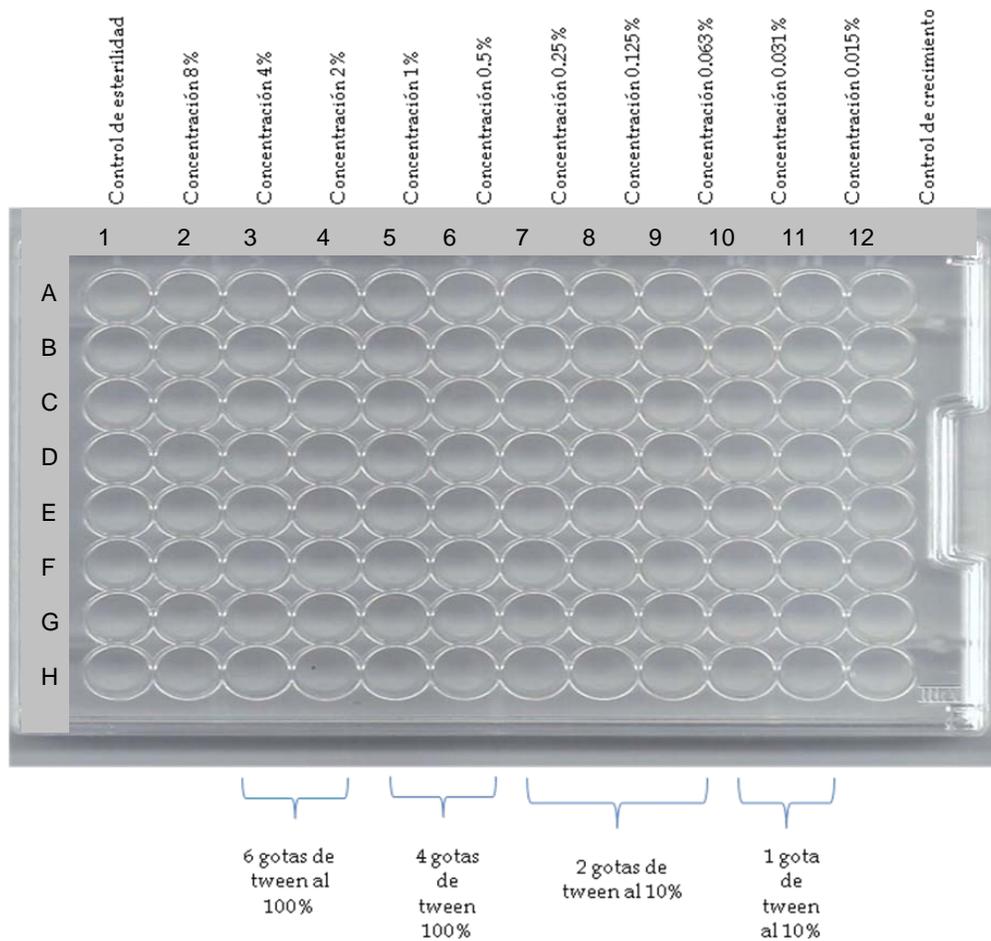




Figura 8
Llenado de placas con antifúngico árbol del té



2.4. PREPARACIÓN DE LOS INÓCULOS

Derivado de los datos epidemiológicos obtenidos a partir del laboratorio de Micología y Parasitología del INP, se estableció que la evaluación de la actividad antifúngica se realizaría con los 5 agentes etiológicos causantes de dermatofitosis *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton tonsurans*, *Trichophyton mentagrophytes*, y *Candida albicans*

Los microorganismos se aislaron de pacientes que acuden del Instituto Nacional de Pediatría y posteriormente fueron identificados macroscópica y microscópicamente



2.4.1. DERMATOFITOS (*Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* y *Microsporum canis*)

Los microorganismos después de su caracterización fueron almacenados en viales con solución salina isotónica (SSI al 0.9 %) a temperatura ambiente.

A partir de los microorganismos en solución, se realizaron resiembras en las siguientes condiciones: *T. mentagrophytes* y *T. tonsurans* fueron incubados por 10 días en medio de cultivo agar papa dextrosa (medio que permite la formación de microconidias), 7 días para *M. canis* en agar papa zanahoria (medio que estimula la producción de microconidias), y 15 días para *T. rubrum* en medio Borelli (medio enriquecido para observar mejor las estructuras de reproducción). Todos los hongos fueron incubados a 28 °C y observados al microscopio con la finalidad de corroborar su identidad, y la cantidad de microconidias producidas. (Ver apéndice 2)

Después del período de incubación, los hongos fueron cubiertos con 5mL de SSI estéril y con la punta de una pipeta Pasteur, se realizó un raspado lentamente en todo el micelio con la finalidad de dejar en suspensión las microconidias, hifas, macroconidias existentes. La suspensión producida se filtró a través de papel filtro Whatman número 40 (poro de 8µm), con el fin de retener los fragmentos de hifas y las macroconidias, y permitir el paso solo de las microconidias existentes. El filtrado obtenido se agitó por 15 seg en un vortex. ⁽³¹⁾ Dicho procedimiento se realizó en una campana de flujo laminar, y todo el material fue esterilizado por autoclave a 121°C por 15 minutos.

Las densidades ópticas de las suspensiones fueron ajustadas en un espectrofotómetro marca Unicam, modelo Helios α; a una longitud de 530 nm, a una transmitancia de 65 - 70%, con una celda de plástico desechable de 1 cm. Ya ajustado el inóculo se realizaron las diluciones necesarias para obtener una concentración final aproximada a 10³ UFC/mL con medio de cultivo RPMI 1640. En cada ensayo se controló el inóculo para ello se sembraron 10µL de una dilución 1/10, 1/100, 1/1000 del inóculo inicial, en cajas petri con agar dextrosa Sabraud y se incubaron a 28 °C hasta la aparición de colonias (Máximo 7 días).



(Ver tabla 1 de resultados las transmitancias obtenidas y apéndice 4 cálculo de UFC/mL obtenidas en cada ensayo).

2.4.2. ESPECIES DE *Candida*

2.4.2.1. *Candida albicans*

Se realizaron dos resiembras de la cepa en agar dextrosa Sabouraud: primera en tubo de ensayo y la segunda en placa y se incubaron por 24 h a 28 °C.

El inóculo se preparó a partir de la segunda resiembra, al tocar con el asa de cultivo 5 colonias (Ver apéndice 2, Fig. 21) y se resuspendieron en 5 mL de solución salina isotónica estéril y la suspensión se agitó vigorosamente con el asa. Esta suspensión se ajustó por turbidez con un estándar de la escala de Mc Farland 0.5 (Ver apéndice 1 preparación de soluciones y apéndice 5, Fig. 1). Esta solución contenía una concentración aproximada de $1 - 5 \times 10^6$ UFC/mL de la cual se realizó una dilución 1/100 con medio RPMI 1640 para obtener una concentración de $1 - 5 \times 10^3$. Esta última dilución se utilizó para inocular las placas con el antifúngico. En cada ensayo se controló el inóculo, para ello se sembraron 10 μ L de una dilución 1/10, 1/100, 1/1000 del inóculo inicial, en cajas petri con agar dextrosa Sabouraud y se incubaron a 37°C por 24h. (Ver apéndice 4 cálculo de UFC/mL obtenidas y Tabla 1 de los Resultados).

2.4.2.2. *Candida krusei* ATCC 6258

En el ensayo se incluyó una cepa control (*Candida krusei* ATCC 6258) con la que se corroboró la validez del método de microdilución en placa, debido a que es una cepa que ha mostrado tener estabilidad genética y en la cual se ha determinado la CMI del ketoconazol repetidamente, que permitió verificar si el valor de CMI era reproducible. ⁽³⁵⁾

La cepa *Candida krusei* ATCC 6258 se sembró en medio agar dextrosa Sabouraud y se incubó por 24h a 28°C. La preparación del inóculo se realizó al emplear la misma metodología para *Candida albicans*. (Ver apéndice 2, Fig.22 y apéndice 5, Fig. 2)



2.5. LLENADO DE PLACAS

Inicialmente las placas se descongelaron a temperatura ambiente y se inocularon con 100 μ L de la suspensión de conidias en el caso de los dermatofitos y 100 μ L de la suspensión de levaduras en el caso de las especies de *Candida*.

Se realizó el llenado de las placas por duplicado por antifúngico para cada microorganismo, y solo la cepa de *Candida krusei* ATCC 6258 fue evaluada en ketoconazol

Es importante mencionar que la concentración del antifúngico así como la del inóculo al final en las placas se diluyeron a la mitad.

2.6. INCUBACIÓN DE LAS PLACAS

Las placas se incubaron por un período de 7 días a 28 °C, sin agitación para los dermatofitos, para las placas de las levaduras estas se incubaron a 37 °C durante 48 h sin agitación.

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó una lectura espectrofotométrica en un lector de placas de ELISA marca Wallac Victor 2, con un Software 1420 Multilaber Counter a una longitud de onda de 490 nm (longitud de onda de máxima absorbancia del medio de cultivo RPMI 1640). (Ver apéndice 5, figura 3)

2.7. OBTENCIÓN DE RESULTADOS

Una vez realizada la lectura espectrofotométrica de las placas, se restó a todos los pocillos la absorbancia del medio, es decir la absorbancia del posillo número 1 (control de esterilidad).

Se realizó un promedio de las absorbancias corregidas obtenidas de las placas 1 y 2, que se utilizaron para cada microorganismo con cada antifúngico. (Ver apéndice 4, punto 4.9)



Se plantearon las siguientes hipótesis una alterna y una de nulidad:

HA (Hipótesis Alterna) = Existe diferencia significativa entre las absorbancias obtenidas por las diferentes concentraciones de los antifúngicos en comparación con un control de crecimiento. Si existe diferencia significativa hay inhibición.

Ho (Hipótesis de nulidad) = No existe diferencia significativa entre las absorbancias obtenidas por las diferentes concentraciones de los antifúngicos en comparación con un control de crecimiento. Si no existe diferencia significativa no hay inhibición

HA (Hipótesis Alterna) = Existe diferencia significativa entre las absorbancias producidas por cada concentración de antifúngico.

Ho (Hipótesis de nulidad) = No existe diferencia significativa entre las absorbancias producidas por cada concentración de antifúngico

El nivel de significancia fue:

Todo valor de p igual o menor a 0.05 se acepta la Hipótesis Alterna y se rechaza la de nulidad.

Todo valor de p mayor de 0.05 se acepta Hipótesis de Nulidad y se rechaza la Hipótesis Alterna.

El tipo de medición fue cualitativa, el tipo de variable discontinua, la escala fue de tipo nominal y la prueba estadística fue no paramétrica.

Con la finalidad de contrastar datos (las absorbancias producidas en las placas después del tratamiento con los antifúngicos) de varias muestras independientes, se realizó un análisis de varianza de Tukey-Kramer (prueba no paramétrica) . Dicho análisis estadístico se llevó a cabo con el programa JMP-8 versión 8.0, *SAS intitute*.



CAPÍTULO II METODOLOGÍA



Una vez que se determinó la presencia del efecto inhibitorio del antifúngico en los diferentes tratamientos, se eligió la concentración a la cual ya no había cambios significativos en valores de absorbancia. A esta concentración se le llamó CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) a la cual se le determinó el porcentaje de inhibición.

La CMI para el ketoconazol se definió como la concentración más baja de antifúngico cuya densidad óptica (absorbancia) representaba al 50% del pocillo No. 12 (control de crecimiento).⁽⁵⁹⁾



RESULTADOS Y ANÁLISIS



3.1.- AJUSTE DE INÓCULO PARA LOS DIFERENTES MICROORGANISMOS

Microorganismo	% de T	Dilución	UFC En las placas petri	UFC/mL en la suspensión	Dilución realizada para la inoculación con medio (RPMI)	UFC/mL en placas
<i>Trichophyton rubrum</i>	65.04 %	1/10	Incontables	6.8 - 7 x 10 ⁴	1/10	3.4 - 3.5 x 10 ³
		1/100	68			
		1/1000	7			
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	68.48 %	1/10	Incontables	2 - 3 x10 ⁴	1/10	1 - 1.5 x 10 ³
		1/100	30			
		1/1000	2			
<i>Trichophyton tonsurans</i>	68.98%	1/10	Incontables	3.8 - 4 x 10 ⁴	1/100	1.9 - 2.0 x 10 ³
		1/100	38			
		1/1000	4			
<i>Microsporum canis</i>	70.10%	1/10	Incontables	1.1 - 2 x10 ⁴	1/10	0.5 - 1.0 x 10 ³
		1/100	11			
		1/1000	2			
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	N/A	1/10	Incontables	6.6 - 7 X 10 ⁶	1/1000	3.3 - 3.5 X 10 ³
		1/100	66			
		1/1000	7			
<i>Candida albicans</i>	N/A	1/10	Incontables	3.9 - 4 x 10 ⁷	1/1000	1.95 -2.0 x 10 ⁴
		1/100	394			
		1/1000	40			

N/A: No aplica



3.2.- RESULTADOS CON ANTIFÚNGICO KETOCONAZOL

Tabla 1

Absorbancias promedio, obtenidas en placas 1 y 2, en el tratamiento de *Candida krusei* ATCC 6258 con antifúngico ketoconazol a diferentes concentraciones

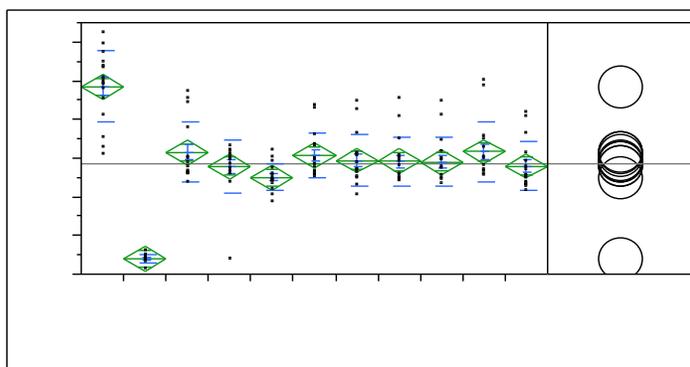
Concentraciones →	k1= > 16 µg/mL	k2= 8 µg/mL	k3= 4 µg/mL	k4 = 2 µg/mL	k5= 1 µg/mL	k6= 0,5 µg/mL	k7= 0,250 µg/mL	k8= 0,125 µg/mL	k9= 0,063 µg/mL	k10= 0,031 µg/mL	Control de crecimiento
Columnas	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,048	0,239	0,206	0,300	0,287	0,294	0,301	0,359	0,364	0,475	0,353
B	0,040	0,269	0,187	0,253	0,207	0,253	0,246	0,266	0,256	0,261	0,491
C	0,047	0,297	0,221	0,260	0,231	0,240	0,235	0,271	0,292	0,265	0,537
D	0,041	0,305	0,240	0,284	0,230	0,244	0,246	0,269	0,253	0,300	0,573
E	0,046	0,300	0,248	0,268	0,264	0,259	0,248	0,267	0,216	0,258	0,479
F	0,049	0,261	0,255	0,296	0,272	0,282	0,280	0,299	0,230	0,264	0,550
G	0,037	0,287	0,292	0,332	0,309	0,306	0,276	0,300	0,279	0,301	0,626
H	0,014	0,040	0,302	0,430	0,428	0,407	0,446	0,502	0,418	0,455	0,596
A	0,061	0,276	0,275	0,359	0,365	0,349	0,346	0,351	0,315	0,379	0,330
B	0,031	0,319	0,259	0,300	0,306	0,299	0,295	0,327	0,231	0,276	0,456
C	0,037	0,323	0,245	0,263	0,271	0,244	0,256	0,303	0,233	0,304	0,502
D	0,037	0,331	0,219	0,256	0,248	0,249	0,236	0,261	0,250	0,289	0,535
E	0,037	0,318	0,234	0,257	0,254	0,241	0,248	0,256	0,226	0,238	0,493
F	0,032	0,299	0,246	0,278	0,269	0,240	0,254	0,257	0,237	0,259	0,508
G	0,038	0,310	0,244	0,335	0,314	0,302	0,319	0,283	0,270	0,269	0,412
H	0,041	0,287	0,320	0,438	0,448	0,456	0,412	0,486	0,407	0,443	0,310
PROM	0,040	0,279	0,250	0,307	0,294	0,292	0,290	0,316	0,280	0,315	0,484
DE	0,010	0,068	0,035	0,059	0,068	0,064	0,063	0,077	0,064	0,078	0,093

PROM = Promedio

DE = Desviación Estándar

Figura 1

Gráfico control resultante del análisis estadístico con la Prueba de Tukey-Kramer v diferencias significativas entre las absorbancias promedio.



Absorbancias promedio

control k	A	0.48448349
k8	B	0.31601361
k10	B	0.31464739
k4	B	0.30692735
k5	B	0.29395644
k6	B	0.29157011
k7	B	0.29031642
k9	B	0.27982186
k2	B	0.27887045
k3	B	0.24970502
k1	C	0.03984522



CMI ketoconazol (k3) = 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Nota: Letras o conjunto de letras distintas indican que hay diferencia significativa entre las absorbancias y la misma letra o conjunto de ellas, indica que no hay diferencia significativa entre las lecturas de absorbancia

También en los gráficos, se puede observar por medio de los aros, que concentraciones son significativamente diferentes o iguales estadísticamente.

Concentración en negritas indica la CMI.

Figura 2

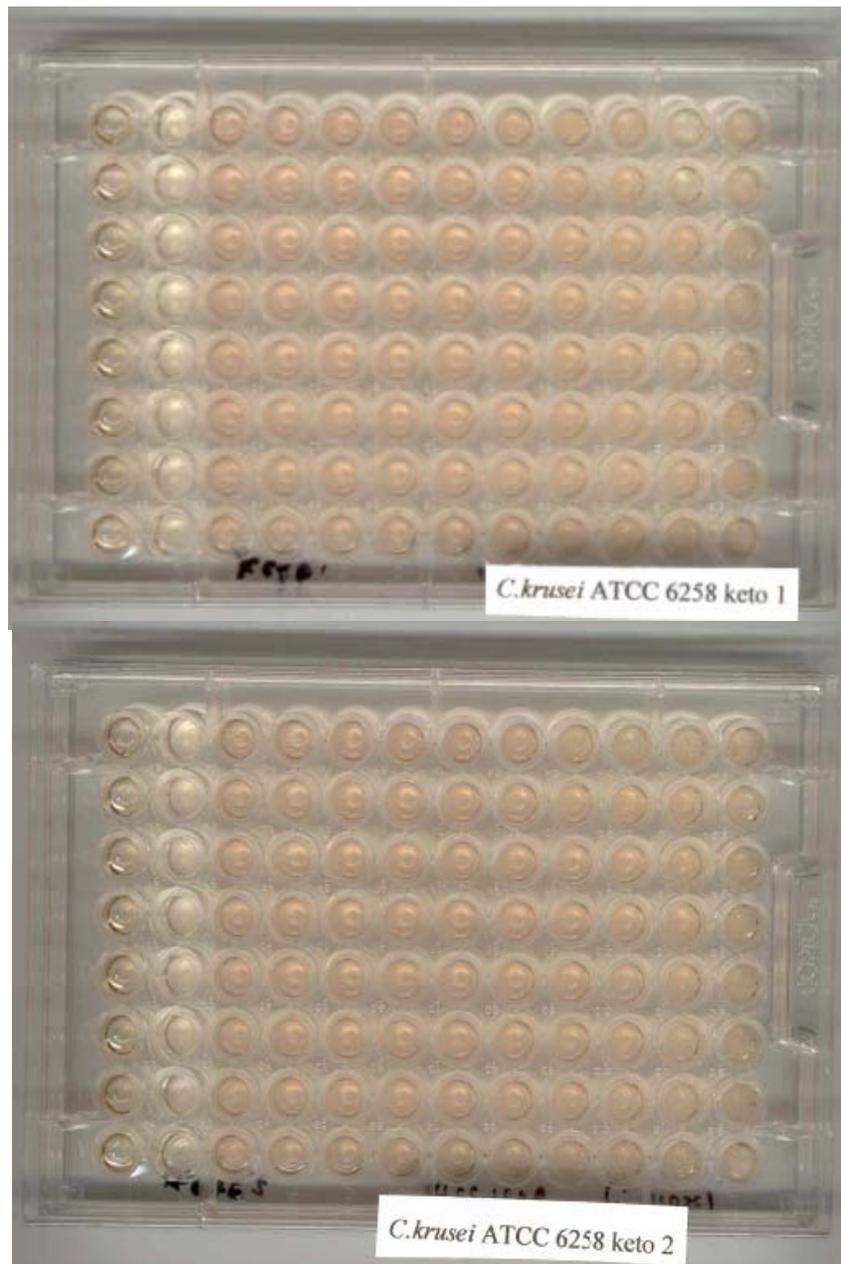




Tabla 2

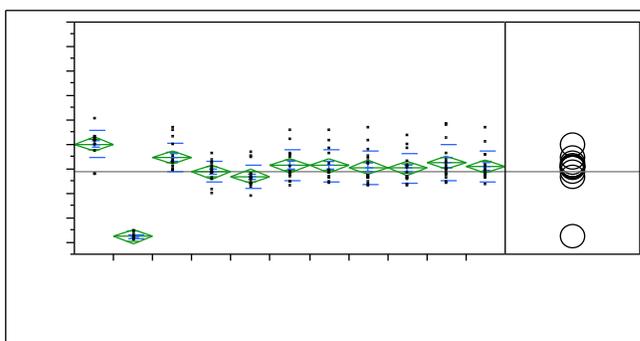
Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Candida albicans* con antifúngico ketoconazol a diferentes concentraciones

Concentraciones →	k1= > 16 µg/mL	k2= 8 µg/mL	k3= 4 µg/mL	k4 = 2 µg/mL	k5= 1 µg/mL	k6= 0,5 µg/mL	k7= 0,250 µg/mL	k8= 0,125 µg/mL	k9= 0,063 µg/mL	k10= 0,031 µg/mL	Control de crecimiento
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,031	0,211	0,366	0,357	0,360	0,376	0,383	0,423	0,357	0,397	0,276
B	0,016	0,289	0,261	0,306	0,321	0,319	0,314	0,335	0,297	0,337	0,400
C	0,024	0,257	0,241	0,285	0,290	0,263	0,232	0,284	0,277	0,323	0,416
D	0,013	0,260	0,226	0,288	0,284	0,266	0,269	0,279	0,261	0,329	0,420
E	0,021	0,310	0,269	0,273	0,284	0,260	0,281	0,262	0,294	0,325	0,416
F	0,032	0,334	0,262	0,288	0,291	0,274	0,303	0,296	0,270	0,308	0,396
G	0,020	0,362	0,276	0,344	0,359	0,352	0,305	0,314	0,310	0,353	0,418
H	0,030	0,325	0,347	0,418	0,412	0,415	0,396	0,478	0,408	0,457	0,504
A	0,023	0,283	0,189	0,361	0,381	0,324	0,330	0,362	0,359	0,430	0,430
B	0,018	0,286	0,237	0,268	0,246	0,270	0,260	0,271	0,270	0,299	0,394
C	0,020	0,299	0,252	0,248	0,239	0,230	0,255	0,246	0,236	0,292	0,415
D	0,020	0,280	0,227	0,244	0,262	0,234	0,234	0,241	0,282	0,299	0,431
E	0,009	0,282	0,234	0,232	0,246	0,247	0,259	0,304	0,273	0,295	0,413
F	0,019	0,296	0,262	0,284	0,267	0,262	0,259	0,291	0,267	0,293	0,372
G	0,019	0,322	0,275	0,358	0,291	0,338	0,306	0,322	0,314	0,332	0,412
H	0,047	0,196	0,351	0,454	0,456	0,468	0,436	0,483	0,469	0,469	0,276
PROM	0,023	0,287	0,267	0,313	0,312	0,306	0,301	0,325	0,309	0,346	0,399
DE	0,009	0,043	0,049	0,063	0,064	0,069	0,060	0,076	0,061	0,059	0,055

Figura 3

Gráfico control resultante del análisis estadístico con la Prueba de Tukey-Kramer y diferencias significativas entre las absorbancias promedio.

Absorbancias promedio



control k	A		0.39941434
k10	A	B	0.34613957
k8		B	0.32455455
k4		B	0.31300468
k5		B	0.31170590
k9		B	0.30900189
k6		B	0.30618973
k7		B	0.30132387
k2		B	0.28701576
k3		C	0.26718922
k1			0.02262315
		D	



CMI ketoconazol (k3) = 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Figura 4





Tabla 3

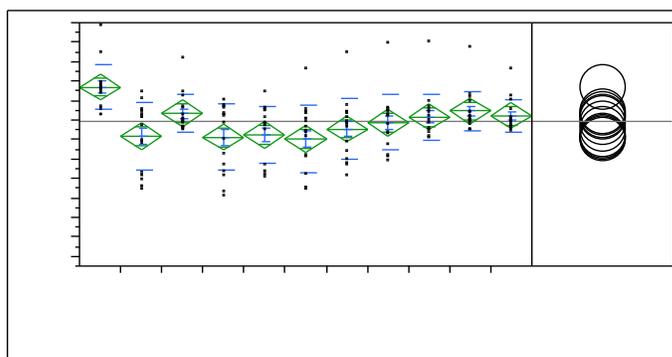
Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Trichophyton rubrum* con antifúngico ketoconazol a diferentes concentraciones

Concentraciones →	k1= > 16 µg/mL	k2= 8 µg/mL	k3= 4 µg/mL	k4 = 2 µg/mL	k5= 1 µg/mL	k6= 0,5 µg/mL	k7= 0,250 µg/mL	k8= 0,125 µg/mL	k9= 0,063 µg/mL	k10= 0,031 µg/mL	Control de crecimiento
Columnas	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,849	0,777	0,848	0,966	1,048	1,092	1,104	1,073	0,966	1,022	0,886
B	0,751	0,761	0,712	0,705	0,744	0,755	0,740	0,740	0,754	0,761	0,895
C	0,750	0,718	0,672	0,643	0,694	0,680	0,654	0,703	0,670	0,693	0,848
D	0,720	0,689	0,679	0,615	0,714	0,640	0,634	0,744	0,666	0,669	0,767
E	0,755	0,736	0,678	0,693	0,662	0,725	0,611	0,698	0,665	0,652	0,727
F	0,713	0,727	0,690	0,639	0,679	0,572	0,610	0,654	0,656	0,708	0,769
G	0,734	0,718	0,653	0,666	0,685	0,627	0,616	0,649	0,713	0,699	0,756
H	0,808	0,767	0,752	0,744	0,779	0,766	0,753	0,794	0,752	0,770	0,893
A	0,595	0,603	0,749	0,737	0,733	0,720	0,770	0,820	0,827	0,844	1,188
B	0,418	0,416	0,405	0,346	0,413	0,752	0,682	0,680	0,701	0,725	0,862
C	0,348	0,314	0,436	0,356	0,541	0,518	0,660	0,713	0,692	0,663	0,851
D	0,357	0,331	0,422	0,353	0,473	0,719	0,720	0,714	0,644	0,660	0,837
E	0,394	0,469	0,472	0,420	0,498	0,493	0,722	0,701	0,678	0,665	0,848
F	0,431	0,437	0,421	0,511	0,479	0,510	0,697	0,720	0,699	0,685	0,866
G	0,582	0,529	0,650	0,520	0,591	0,679	0,684	0,694	0,676	0,700	0,873
H	0,674	0,802	0,765	0,753	0,739	0,743	0,796	0,830	0,806	0,824	1,050
PROM	0,617	0,612	0,625	0,604	0,655	0,687	0,716	0,745	0,723	0,734	0,870
DE	0,173	0,169	0,144	0,174	0,155	0,142	0,118	0,102	0,084	0,096	0,113

Figura 5

Gráfico control resultante del análisis estadístico con la Prueba de Tukey-Kramer y diferencias significativas entre las absorbancias promedio.

Absorbancias promedio



control k	A	0.86973128
k8	A B	0.74545167
k10	A B	0.73372131
k9	A B	0.72289820
k7	A B	0.71583418
k6	B	0.68696707
k5	B	0.65460020
k3	B	0.62527248
k1	B	0.61731033
k2	B	0.61214866
k4	B	0.60413206



CMI ketoconazol (k4) = 2 µg/mL

Figura 6

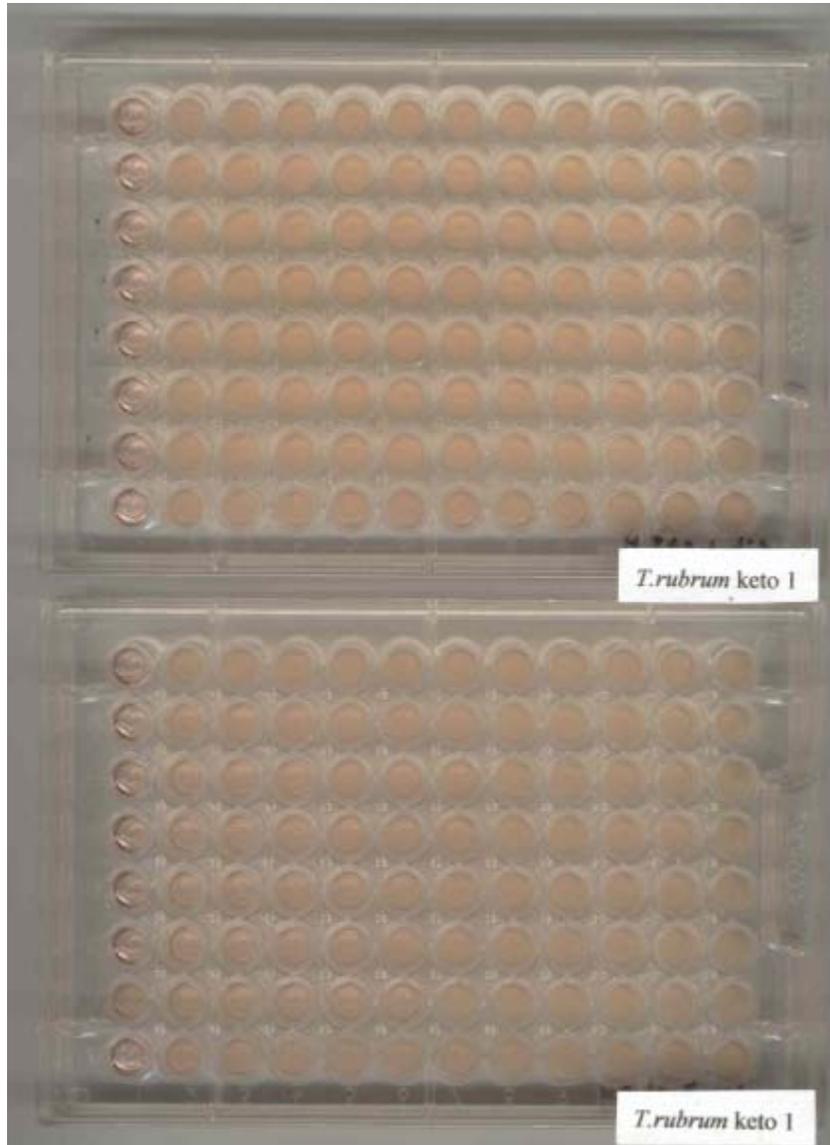




Tabla 4

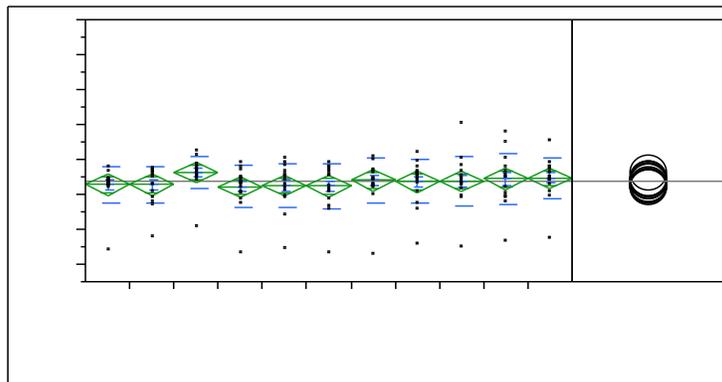
Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Trichophyton mentagrophytes* con antifúngico ketoconazol a diferentes concentraciones

Concentraciones →	k1= > 16 µg/mL	k2= 8 µg/mL	k3= 4 µg/mL	k4 = 2 µg/mL	k5= 1 µg/mL	k6= 0,5 µg/mL	k7= 0,250 µg/mL	k8= 0,125 µg/mL	k9= 0,063 µg/mL	k10= 0,031 µg/mL	Control de crecimiento
Columnas	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,229	0,279	0,283	0,272	0,301	0,261	0,268	0,257	0,228	0,260	0,230
B	0,272	0,174	0,254	0,214	0,265	0,247	0,233	0,256	0,273	0,255	0,230
C	0,261	0,247	0,212	0,209	0,221	0,254	0,245	0,220	0,263	0,265	0,242
D	0,253	0,206	0,191	0,253	0,200	0,207	0,231	0,303	0,241	0,288	0,228
E	0,172	0,186	0,142	0,280	0,264	0,280	0,246	0,267	0,262	0,281	0,244
F	0,190	0,205	0,250	0,254	0,240	0,253	0,230	0,250	0,242	0,283	0,230
G	0,230	0,233	0,258	0,259	0,261	0,264	0,254	0,249	0,292	0,324	0,246
H	0,264	0,273	0,303	0,294	0,301	0,322	0,405	0,381	0,356	0,278	0,236
A	0,253	0,246	0,265	0,269	0,272	0,266	0,282	0,281	0,251	0,254	0,223
B	0,269	0,239	0,242	0,224	0,231	0,257	0,230	0,206	0,251	0,266	0,231
C	0,250	0,229	0,211	0,186	0,230	0,159	0,196	0,180	0,197	0,254	0,227
D	0,251	0,248	0,220	0,167	0,225	0,173	0,215	0,192	0,209	0,240	0,236
E	0,210	0,221	0,195	0,217	0,248	0,233	0,192	0,194	0,240	0,251	0,245
F	0,178	0,235	0,230	0,159	0,245	0,243	0,236	0,252	0,279	0,313	0,267
G	0,078	0,032	0,047	0,033	0,028	0,058	0,050	0,068	0,076	0,108	0,041
H	0,274	0,292	0,292	0,280	0,308	0,295	0,304	0,351	0,280	0,270	0,281
PROM	0,227	0,222	0,225	0,223	0,240	0,236	0,238	0,244	0,246	0,262	0,227
DE	0,052	0,060	0,063	0,065	0,064	0,063	0,071	0,072	0,058	0,047	0,052

Figura 7

Gráfico control resultante del análisis estadístico con la Prueba de Tukey-Kramer y diferencias significativas entre las absorbancias promedio.

Absorbancias promedio



k10	A	0.26187436
k9	A	0.24620205
k8	A	0.24409078
k5	A	0.23996827
k7	A	0.23845758
k6	A	0.23574455
control k	A	0.22739134
k1	A	0.22711446
k3	A	0.22474725
k4	A	0.22298683
k2	A	0.22157975



No presentó inhibición.

Figura 8





Tabla 5

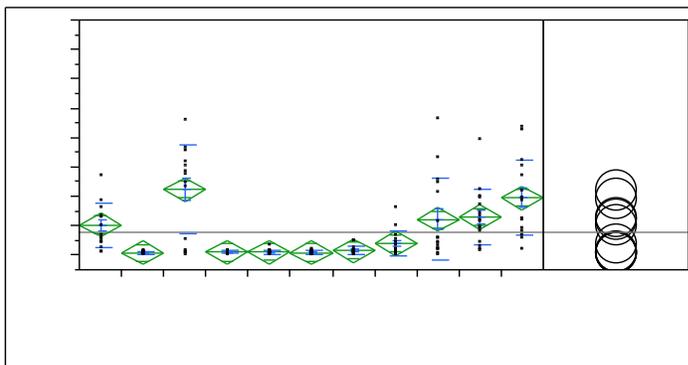
Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Trichophyton tonsurans* con antifúngico ketoconazol a diferentes concentraciones

Concentraciones →	k1= > 16 µg/mL	k2= 8 µg/mL	k3= 4 µg/mL	k4 = 2 µg/mL	k5= 1 µg/mL	k6= 0,5 µg/mL	k7= 0,250 µg/mL	k8= 0,125 µg/mL	k9= 0,063 µg/mL	k10= 0,031 µg/mL	Control de crecimiento
Columnas	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,080	0,022	0,006	0,058
B	0,013	0,016	0,015	0,012	0,014	0,014	0,334	0,044	0,195	0,285	0,009
C	0,009	0,009	0,008	0,007	0,007	0,012	0,057	0,119	0,269	0,055	0,133
D	0,008	0,012	0,004	0,004	0,007	0,014	0,061	0,134	0,126	0,277	0,055
E	0,008	0,008	0,004	0,007	0,010	0,044	0,019	0,226	0,427	0,304	0,103
F	0,008	0,007	0,008	0,008	0,028	0,160	0,022	0,197	0,435	0,460	0,067
G	0,007	0,007	0,006	0,005	0,005	0,068	0,258	0,096	0,118	0,017	0,026
H	0,006	0,005	0,006	0,006	0,005	0,007	0,466	0,200	0,060	0,004	0,187
A	0,006	0,011	0,011	0,012	0,010	0,009	0,008	0,014	0,084	0,011	0,043
B	0,018	0,018	0,018	0,021	0,051	0,022	0,041	0,115	0,188	0,317	0,186
C	0,014	0,015	0,014	0,015	0,047	0,101	0,247	0,020	0,321	0,233	0,269
D	0,009	0,009	0,008	0,009	0,016	0,037	0,113	0,145	0,188	0,303	0,129
E	0,006	0,009	0,008	0,009	0,017	0,067	0,043	0,171	0,218	0,354	0,042
F	0,011	0,010	0,013	0,010	0,012	0,052	0,032	0,032	0,090	0,318	0,164
G	0,010	0,009	0,011	0,012	0,011	0,023	0,214	0,392	0,305	0,247	0,165
H	0,000	0,003	0,033	0,002	0,002	0,005	0,021	0,092	0,067	0,364	0,013
PROM	0,008	0,009	0,010	0,009	0,015	0,040	0,121	0,130	0,195	0,222	0,103
DE	0,005	0,005	0,007	0,005	0,015	0,043	0,140	0,096	0,128	0,151	0,076

Figura 9

Gráfico control resultante del análisis estadístico con la Prueba de Tukey-Kramer y diferencias significativas entre las absorbancias promedio.

Absorbancias promedio



k10	A			0.22225990
k9	A	B		0.19457441
k8	A	B	C	0.12973378
k7		B	C	0.12098099
control k		B	C	0.10298907
k6			C	0.03967527
k5			D	0.01515174
k3			D	0.01042416
k2			D	0.00930087
k4			D	0.00869580
k1			D	0.00824884



CMI ketoconazol (k5) = 1 µg/mL

Figura 10





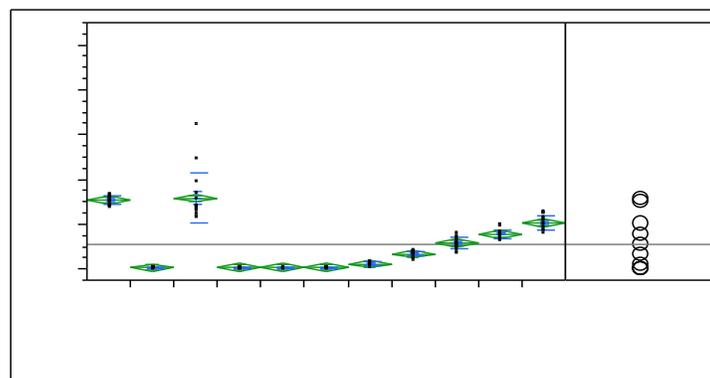
Tabla 6

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Microsporium canis* con antifúngico ketoconazol a diferentes concentraciones

Concentraciones →	k1= > 16 µg/mL	k2= 8 µg/mL	k3= 4 µg/mL	k4 = 2 µg/mL	k5= 1 µg/mL	k6= 0,5 µg/mL	k7= 0,250 µg/mL	k8= 0,125 µg/mL	k9= 0,063 µg/mL	k10= 0,031 µg/mL	Control de crecimiento
Columnas	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,004	0,004	0,003	0,003	0,013	0,021	0,036	0,071	0,124	0,140	0,143
B	0,003	0,004	0,002	0,003	0,011	0,032	0,051	0,084	0,110	0,323	0,149
C	0,003	0,005	0,003	0,003	0,018	0,043	0,059	0,080	0,087	0,130	0,150
D	0,003	0,003	0,002	0,003	0,008	0,040	0,073	0,065	0,080	0,157	0,141
E	0,001	0,000	0,002	0,000	0,010	0,040	0,056	0,078	0,088	0,116	0,155
F	0,004	0,002	0,003	0,004	0,013	0,038	0,067	0,070	0,092	0,169	0,165
G	0,003	0,002	0,003	0,002	0,007	0,036	0,062	0,082	0,114	0,119	0,159
H	0,001	0,002	0,002	0,002	0,004	0,027	0,048	0,079	0,130	0,134	0,139
A	0,003	0,004	0,002	0,003	0,009	0,023	0,040	0,082	0,115	0,124	0,152
B	0,003	0,003	0,004	0,004	0,015	0,035	0,054	0,080	0,099	0,140	0,159
C	0,003	0,004	0,001	0,003	0,012	0,035	0,070	0,074	0,085	0,118	0,140
D	0,001	0,004	0,003	0,003	0,013	0,034	0,059	0,099	0,088	0,139	0,157
E	0,003	0,004	0,003	0,004	0,014	0,040	0,054	0,065	0,125	0,246	0,156
F	0,001	0,005	0,005	0,005	0,015	0,033	0,082	0,064	0,086	0,197	0,159
G	0,002	0,002	0,002	0,003	0,012	0,035	0,047	0,080	0,102	0,140	0,167
H	0,004	0,004	0,004	0,005	0,012	0,032	0,059	0,096	0,113	0,139	0,161
PROM	0,003	0,003	0,003	0,003	0,012	0,034	0,057	0,078	0,102	0,158	0,153
DE	0,001	0,001	0,001	0,001	0,003	0,006	0,012	0,010	0,016	0,055	0,009

Figura 11

Gráfico control resultante del análisis estadístico con la Prueba de Tukey-Kramer y diferencias significativas entre las absorbancias promedio.





Absorbancias promedio

k10	A	0.15817164
control k	A	0.15329071
k9	B	0.10234018
k8	C	0.07816032
k7	C	0.05733618
k6	D	0.03401543
k5	E	0.01166138
k4	E	0.00316376
k2	E	0.00312514
k3	E	0.00279499
k1	E	0.00254959

CMI ketoconazol (k5) = 1 µg/mL al 90 %

CMI ketoconazol (k8) = 0.125 µg/mL al 50 %



Figura 12





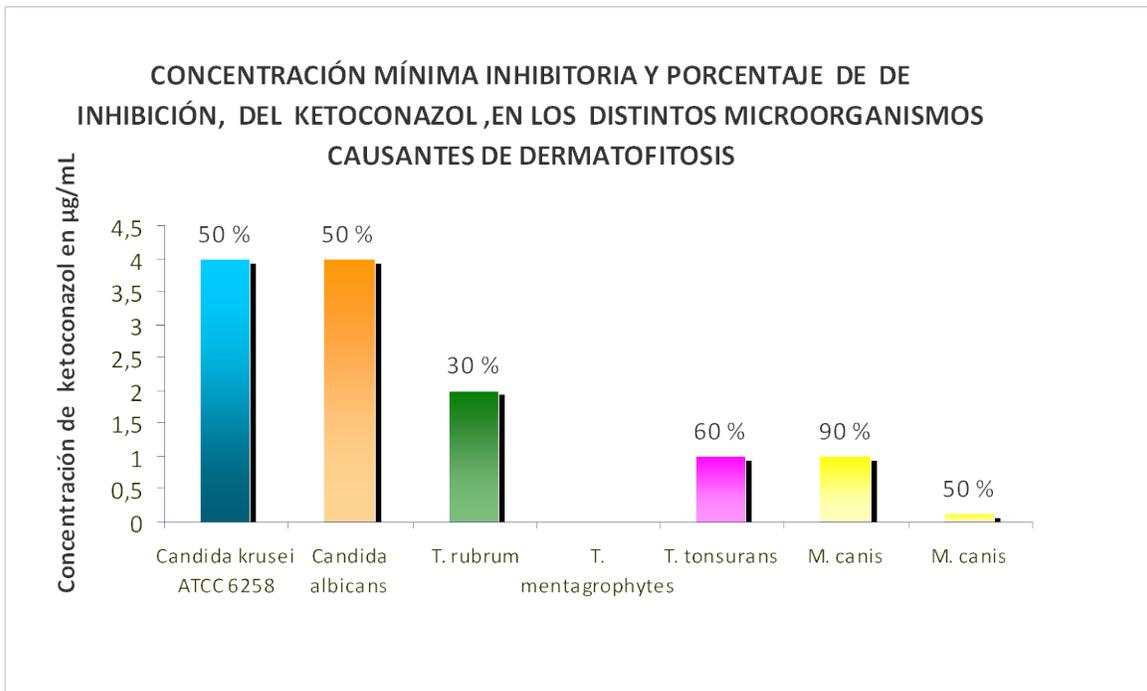
Tabla 7

Tabla resumen de los porcentajes de inhibición y Concentraciones Mínimas Inhibitorias de ketoconazol en los distintos microorganismos causantes de dermatofitosis

Microorganismo	Resultados	
<i>Candida krusei</i> ATCC 6258	Abs control	0.48448349
	Abs Inhibición	0.24970502
	% Inhibición	50
	CMI (µg/mL)	4
<i>Candida albicans</i>	Abs control	0.39941434
	Abs Inhibición	0.26718922
	% Inhibición	30
	CMI (µg/mL)	4
<i>Trichophyton rubrum</i>	Abs control	0.86973128
	Abs Inhibición	0.60413206
	% Inhibición	30
	CMI (µg/mL)	2
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Abs control	0.26187436
	Abs Inhibición	-----
	% Inhibición	0
	CMI (µg/mL)	----
<i>Trichophyton tonsurans</i>	Abs control	0.10298907
	Abs Inhibición	0.01515174
	% Inhibición	60
	CMI (µg/mL)	1
<i>Microsporum canis</i>	Abs control	0.15817164
	Abs Inhibición	0.01166138
	% Inhibición	90
	CMI (µg/mL)	1
<i>Microsporum canis</i>	Abs control	0.15817164
	Abs Inhibición	0.07816032
	% Inhibición	50
	CMI (µg/mL)	0.125



Gráfico 1



3.2.1 ANÁLISIS DEL TRATAMIENTO CON KETOCONAZOL

Al evaluar la actividad antimicótica del ketoconazol (que fue un control positivo) en los distintos microorganismos, se presentó inhibición en *Candida krusei* ATCC 6258, *Trichophyton tonsurans* y *Microsporium canis*, pues el fármaco inhibió a un 50 % o más de la concentración inicial de inóculo. Lo anterior se estableció por la diferencia significativa que se presentó por la comparación entre las absorbancias producidas por el control de crecimiento y las producidas por las distintas concentraciones por los antifúngicos ($p < 0.05$). (Ver figuras 1, 9 y 11)

La CMI₅₀ (Concentración Mínima Inhibitoria al 50 %) para *Candida krusei* ATCC 6258 fue 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para *Trichophyton tonsurans* fue de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, (CMI₆₀) y para *Microsporium canis* se determinaron dos concentraciones: una de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CMI₉₀) y otra de 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CMI₅₀). (Ver tabla 7 y gráfico 1)

Datos reportados en la literatura indican que la CMI para *Candida krusei* ATCC 6258, se encuentra entre los valores de 0.25 - 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ⁽⁴⁸⁾; en nuestros resultados se encontró una



CMI de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pues a esta concentración fue a la cual se inhibió a un 50%, sin embargo estadísticamente se obtuvo que las absorbancias producidas en las concentraciones de 0.031 a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, no mostraban diferencia significativa, ($p > 0.05$) de manera que al considerar este criterio, nos encontraríamos dentro del rango de concentración en donde regularmente se encuentra la CMI del ketoconazol.

Para *Trichophyton tonsurans*, se observó que a partir de la concentración de 0.125 a 0.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, las absorbancias obtenidas eran mayores que las absorbancias del control de crecimiento, lo cual pudo haberse debido a que a los 7 días de incubación (que es el tiempo de incubación que se recomienda en la literatura) no se observó un buen crecimiento en el control, y al incubar de nuevo las placas por 3 días más, el medio se evaporó y no permitió que el control de crecimiento proliferará, y aún así con esta concentración se logró obtener una CMI₆₀ que fue de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al comparar en la literatura la CMI del ketoconazol en este microorganismo, se obtuvo una concentración menor a la reportada en la bibliografía (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$).⁽⁶⁰⁾

En el tratamiento con *Microsporum canis* se encontró buena respuesta por parte del ketoconazol, ya que se encontraron valores de CMI mucho menores a los que se reportan en la bibliografía (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$).⁽⁶⁰⁾

Cuando se evaluó la actividad antifúngica del ketoconazol en *Trichophyton mentagrophytes*, al realizar el análisis de varianza, no se mostró diferencia significativa entre las absorbancias producidas en cada una de las concentraciones de antifúngico en comparación con la absorbancia del control de crecimiento ($p > 0.05$), de manera que no se presentó inhibición. (Ver figura 7 y 8)

Para el caso de *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum*, si hubo inhibición por parte del ketoconazol ($p > 0.05$), pero fue por debajo del 50%, lo cual no es algo aceptable, pues se considera que el ketoconazol es activo ante un microorganismo cuando inhibe al 50 % o más.⁽⁵⁹⁾



Inicialmente cuando se llevó a cabo la evaluación con *Candida albicans*, el ketoconazol no mostró inhibición a ninguna concentración, de manera que se probó una concentración 10 veces mayor a 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del antifúngico. Esta fue adicionada en los pocillos n° 1, los resultados obtenidos mostraron que la absorbancia promedio resultante de esta concentración, presentó diferencia significativa entre las absorbancias promedio obtenidas con el control de crecimiento y las distintas concentraciones de antifúngico, con lo cual fue descartado que la no inhibición se debiera a alguna anomalía con el antifúngico.

Cabe resaltar que la sensibilidad antimicótica depende mucho del origen del aislamiento, pues si la persona de la cual fue aislado el microorganismo fue tratada con anterioridad con este antifúngico u otros, los microorganismos: *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Candida albicans*, pudieron haber generado resistencia al ketoconazol.



3.3 RESULTADOS CON EL ANTIFÚNGICO ACEITE ESENCIAL DE LAVANDA

Tabla 8

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Candida albicans* con antifúngico lavanda proveedor nacional a diferentes concentraciones

Concentraciones →	Lcos 2 =0.5 % v/v	Lcos 3 =0.25% v/v	Lcos 4 = 0.125% v/v	Lcos 5 = 0.063 % v/v	Lcos 6 = 0.031 % v/v	Lcos 7 = 0.016 % v/v	Lcos 8 = 0.008 % v/v	Control de crecimiento
Columnas	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,003	0,007	0,007	0,016	0,018	0,020	0,040	0,675
B	0,002	0,013	0,006	0,008	0,012	0,040	0,063	0,599
C	0,008	0,014	0,008	0,027	0,117	0,171	0,062	0,592
D	0,008	0,017	0,007	0,019	0,364	0,250	0,276	0,572
E	0,003	0,017	0,008	0,086	0,362	0,318	0,089	0,545
F	0,003	0,016	0,008	0,069	0,136	0,110	0,099	0,628
G	0,001	0,010	0,007	0,029	0,062	0,085	0,092	0,628
H	0,000	0,003	0,004	0,008	0,060	0,013	0,067	0,779
A	0,000	0,002	0,096	0,330	0,112	0,128	0,117	0,658
B	0,000	0,012	0,084	0,622	0,542	0,516	0,587	0,582
C	0,001	0,016	0,013	0,403	0,439	0,473	0,306	0,600
D	0,010	0,016	0,011	0,268	0,472	0,390	0,238	0,607
E	0,002	0,022	0,012	0,286	0,464	0,486	0,526	0,593
F	0,000	0,022	0,008	0,244	0,497	0,307	0,426	0,577
G	0,000	0,018	0,007	0,159	0,255	0,157	0,423	0,643
H	0,000	0,002	0,015	0,071	0,083	0,081	0,281	0,849
PROM	0,003	0,013	0,019	0,165	0,250	0,221	0,231	0,633
DE	0,003	0,006	0,028	0,179	0,194	0,173	0,181	0,079

Lcos = lavanda proveedor nacional



Figura 13

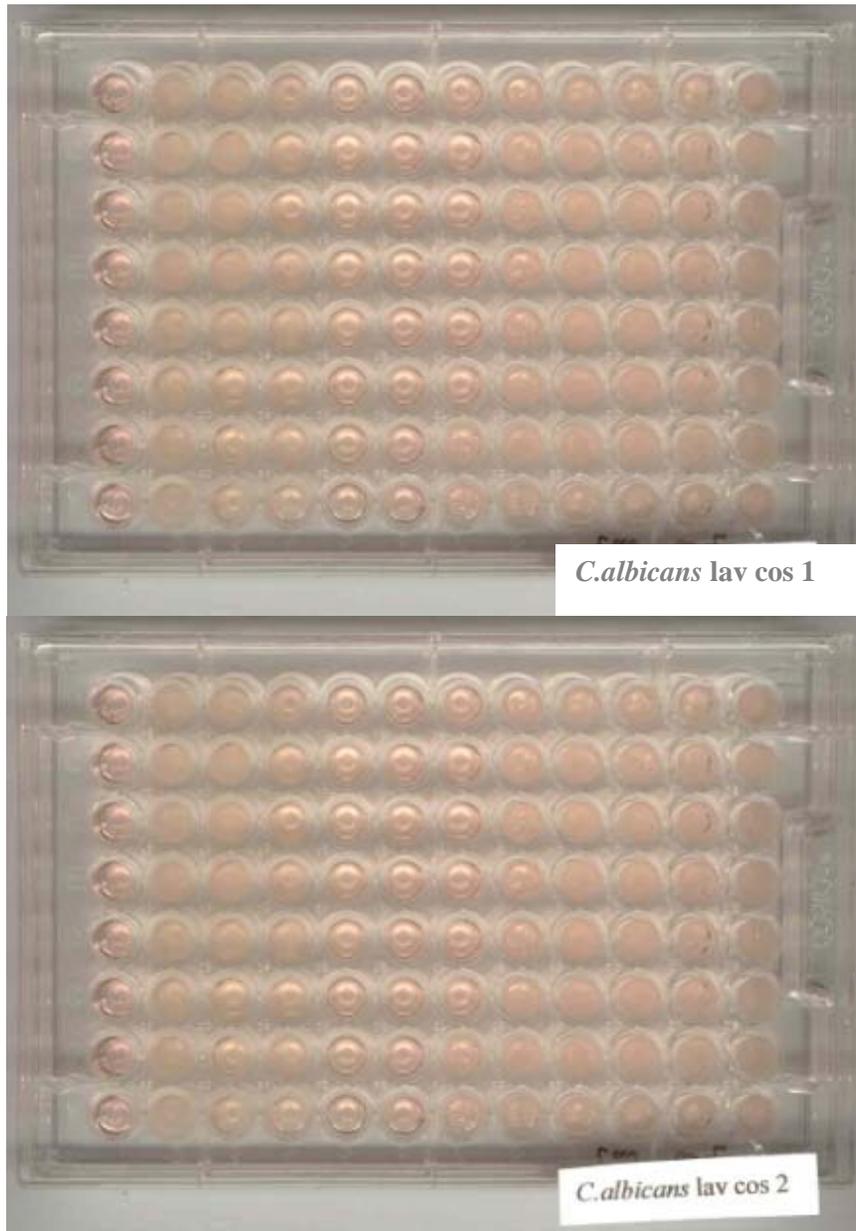




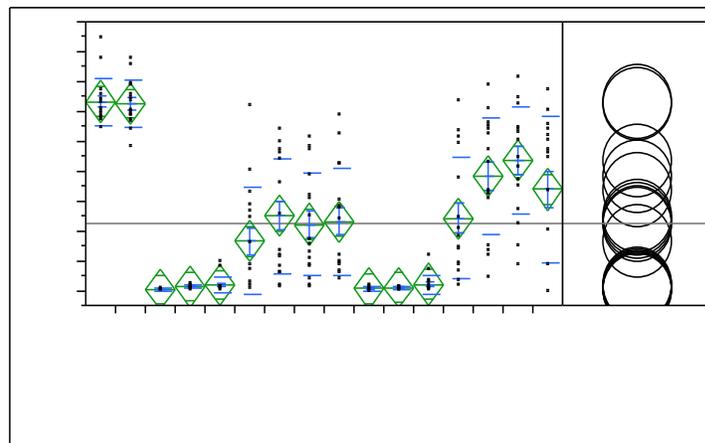
Tabla 9

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Candida albicans* con antifúngico lavanda importado a diferentes concentraciones

Concentraciones →	Limp 2 =0.5 % v/v	Limp 3 =0.25% v/v	Limp 4 = 0.125% v/v	Limp 5 = 0.063 % v/v	Limp 6 = 0.031 % v/v	Limp 7 = 0.016 % v/v	Limp 8 = 0.008 % v/v	Control de crecimiento
Columnas	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	0,001	0,034	0,017	0,117	0,149	0,000	0,636
B	0,000	0,009	0,119	0,515	0,611	0,648	0,000	0,586
C	0,009	0,013	0,006	0,246	0,428	0,503	0,000	0,482
D	0,018	0,013	0,001	0,379	0,526	0,532	0,000	0,541
E	0,020	0,015	0,006	0,209	0,543	0,548	0,337	0,648
F	0,009	0,013	0,008	0,494	0,470	0,539	0,464	0,697
G	0,000	0,012	0,070	0,638	0,688	0,716	0,556	0,659
H	0,000	0,003	0,031	0,064	0,136	0,226	0,447	0,781
A	0,000	0,001	0,014	0,087	0,150	0,270	0,205	0,690
B	0,003	0,008	0,017	0,537	0,561	0,542	0,602	0,584
C	0,009	0,012	0,008	0,180	0,336	0,352	0,471	0,603
D	0,013	0,013	0,005	0,145	0,308	0,417	0,503	0,591
E	0,013	0,014	0,002	0,141	0,325	0,372	0,521	0,598
F	0,007	0,013	0,001	0,094	0,322	0,445	0,543	0,565
G	0,001	0,011	0,006	0,087	0,554	0,624	0,673	0,575
H	0,000	0,001	0,002	0,033	0,047	0,086	0,086	0,760
PROM	0,006	0,010	0,021	0,241	0,383	0,436	0,451	0,625
DE	0,007	0,005	0,032	0,203	0,196	0,182	0,167	0,079

Figura 14

Gráfico control resultante del análisis estadístico con la Prueba de Tukey-Kramer y diferencias significativas entre las absorbancias promedio.





Absorbancias promedio

control Lcos	A			0.63293326
control Lim	A			0.62473011
Limp 7	B			0.43565530
Limp 6	B	C		0.38266653
Limp 8	B	C	D	0.33800765
Lcos6		C	D	0.24956742
Limp 5		C	D	0.24143806
Lcos8		C	D	0.23075736
Lcos7		C	D	0.22149966
Lcos5			D	0.16537182
Limp 4			E	0.02065050
Lcos4			E	0.01877720
Lcos3			E	0.01305430
Limp 3			E	0.00951533
Limp 2			E	0.00639065
Lcos2			E	0.00261657

CMI lavanda importado (Lim 4) = 0.125 %

CMI lavanda nacional (Lcos 4) = 0.125 %



Figura 15





Tabla 10

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Trichophyton rubrum* con antifúngico lavanda proveedor nacional a diferentes concentraciones

Concentraciones →	Lcos 2 =0.5 % v/v	Lcos 3 =0.25% v/v	Lcos 4 = 0.125% v/v	Lcos 5 = 0.063 % v/v	Lcos 6 = 0.031 % v/v	Lcos 7 = 0.016 % v/v	Lcos 8 = 0.008 % v/v	Control de crecimiento
Columnas	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,019	0,025	0,018	0,015	0,029	0,190	0,225	0,293
B	0,003	0,006	0,000	0,000	0,029	0,092	0,119	0,488
C	0,000	0,002	0,000	0,000	0,020	0,086	0,101	0,439
D	0,000	0,000	0,001	0,000	0,009	0,085	0,085	0,430
E	0,017	0,005	0,000	0,000	0,015	0,077	0,100	0,419
F	0,011	0,008	0,000	0,000	0,025	0,091	0,108	0,441
G	0,000	0,007	0,021	0,000	0,034	0,120	0,132	0,413
H	0,008	0,011	0,006	0,004	0,012	0,229	0,261	0,393
A	0,049	0,057	0,045	0,041	0,045	0,104	0,224	0,643
B	0,041	0,042	0,035	0,202	0,050	0,052	0,159	0,486
C	0,029	0,031	0,024	0,023	0,045	0,069	0,136	0,482
D	0,030	0,024	0,016	0,014	0,038	0,075	0,046	0,426
E	0,021	0,019	0,014	0,011	0,039	0,078	0,105	0,437
F	0,013	0,013	0,007	0,006	0,035	0,103	0,127	0,433
G	0,006	0,011	0,003	0,002	0,078	0,135	0,197	0,458
H	0,024	0,031	0,021	0,019	0,125	0,195	0,248	0,561
PROM	0,017	0,018	0,013	0,021	0,039	0,111	0,148	0,453
DE	0,015	0,016	0,014	0,050	0,029	0,051	0,064	0,075



Figura 16

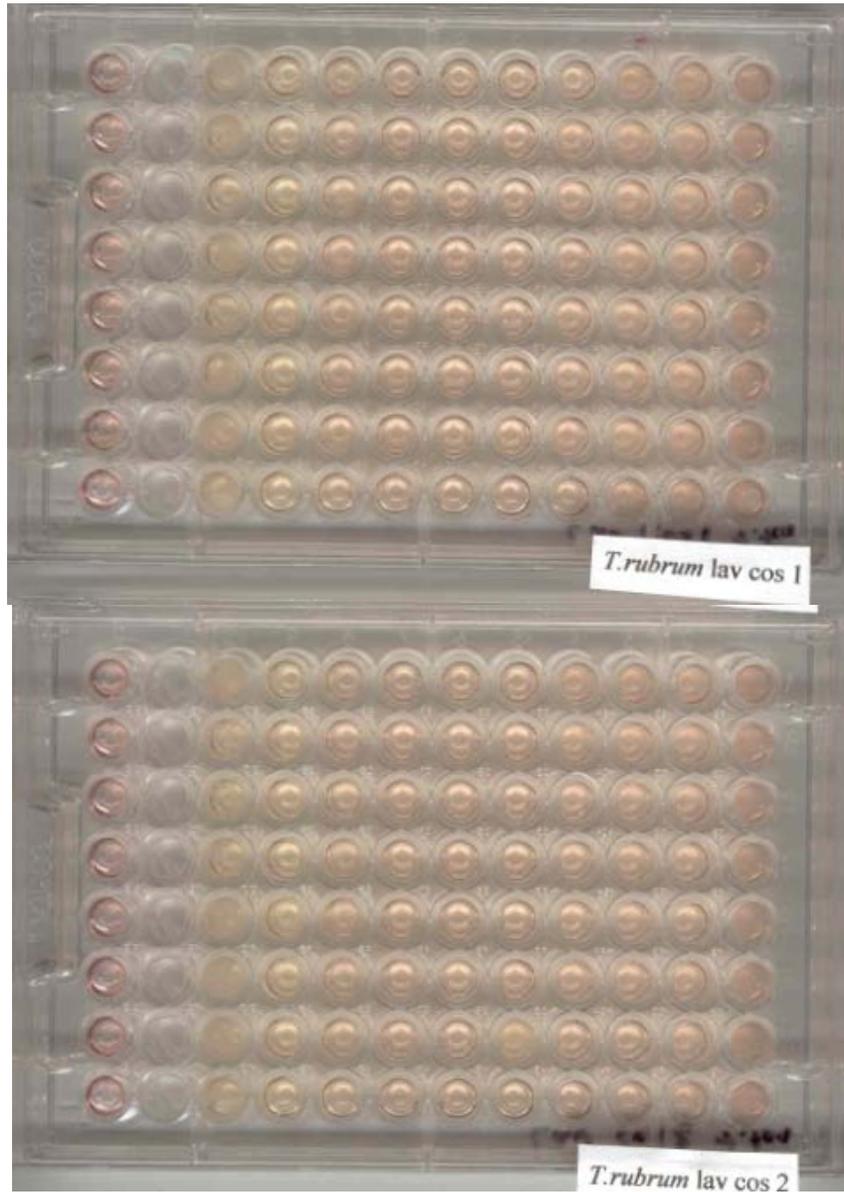




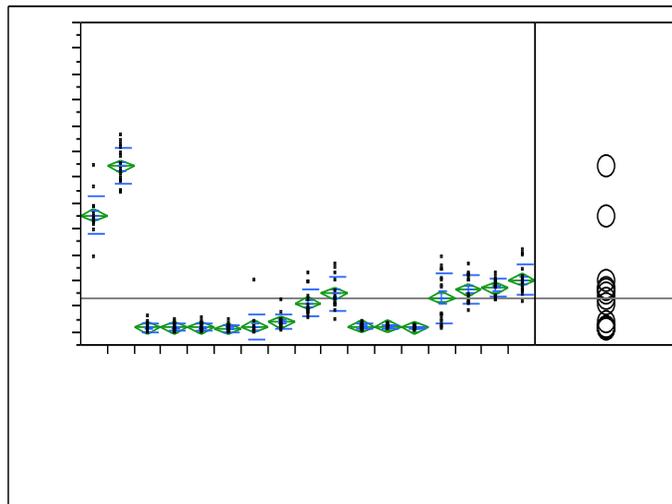
Tabla 11

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Trichophyton rubrum*, con antifúngico lavanda importado a diferentes concentraciones

Concentraciones →	Limp 2 =0.5 % v/v	Limp 3 =0.25% v/v	Limp 4 = 0.125% v/v	Limp 5 = 0.063 % v/v	Limp 6 = 0.031 % v/v	Limp 7 = 0.016 % v/v	Limp 8 = 0.008 % v/v	Control de crecimiento
Columnas	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,025	0,021	0,020	0,058	0,080	0,202	0,296	0,762
B	0,034	0,032	0,025	0,069	0,115	0,181	0,200	0,550
C	0,037	0,032	0,021	0,030	0,109	0,136	0,196	0,616
D	0,027	0,029	0,017	0,048	0,120	0,121	0,170	0,586
E	0,036	0,017	0,012	0,010	0,107	0,136	0,166	0,539
F	0,013	0,013	0,009	0,021	0,117	0,126	0,186	0,604
G	0,022	0,022	0,016	0,068	0,141	0,186	0,214	0,628
H	0,019	0,019	0,013	0,040	0,201	0,226	0,316	0,650
A	0,005	0,012	0,006	0,177	0,139	0,171	0,238	0,678
B	0,008	0,010	0,008	0,200	0,135	0,126	0,120	0,694
C	0,022	0,026	0,021	0,173	0,214	0,138	0,143	0,603
D	0,024	0,024	0,020	0,240	0,202	0,174	0,155	0,592
E	0,020	0,024	0,019	0,207	0,223	0,193	0,156	0,579
F	0,020	0,027	0,020	0,252	0,226	0,180	0,161	0,716
G	0,013	0,018	0,015	0,245	0,219	0,203	0,209	0,740
H	0,016	0,018	0,016	0,289	0,263	0,212	0,302	0,724
PROM	0,021	0,021	0,016	0,133	0,163	0,169	0,202	0,641
DE	0,009	0,007	0,005	0,098	0,056	0,034	0,059	0,070

Figura 17

Gráfico control resultante del análisis estadístico con la Prueba de Tukey-Kramer y diferencias significativas entre las absorbancias promedio.





Absorbancias promedio

control Lim	A			0.64130325
control Lcos		B		0.45260698
Limp 8			C	0.20185902
Limp 7			C D	0.16943734
Limp 6			C D	0.16330187
Lcos8			C D	0.14848108
Limp 5			D	0.13305352
Lcos7			D	0.11127264
Lcos6			E	0.03924738
Limp 3			E	0.02149768
Limp 2			E	0.02130223
Lcos5			E	0.02101427
Lcos3			E	0.01819556
Lcos2			E	0.01704400
Lcos1			E	0.01658260
Limp 4			E	0.01605369
Lcos4			E	0.01317851

CMI lavanda importado (Limp 4) = 0.125 %

CMI lavanda nacional (Lcos 6) = 0.031 %



Figura 18





Tabla 12

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Trichophyton mentagrophytes* con antifúngico lavanda proveedor nacional a diferentes concentraciones

Concentraciones →	Lcos 2 =0.5 % v/v	Lcos 3 =0.25% v/v	Lcos 4 = 0.125% v/v	Lcos 5 = 0.063 % v/v	Lcos 6 = 0.031 % v/v	Lcos 7 = 0.016 % v/v	Lcos 8 = 0.008 % v/v	Control de crecimiento
Columnas	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,048	0,011	0,006	0,288	0,309	0,302	0,313	0,468
B	0,030	0,012	0,007	0,249	0,275	0,286	0,325	0,685
C	0,046	0,014	0,029	0,326	0,305	0,321	0,352	0,657
D	0,058	0,022	0,005	0,331	0,346	0,356	0,354	0,522
E	0,105	0,059	0,091	0,290	0,376	0,381	0,392	0,564
F	0,071	0,086	0,081	0,327	0,372	0,404	0,409	0,536
G	0,062	0,077	0,069	0,348	0,361	0,387	0,404	0,652
H	0,005	0,016	0,003	0,245	0,337	0,338	0,383	0,612
A	0,014	0,002	0,000	0,291	0,249	0,281	0,280	0,403
B	0,008	0,011	0,118	0,265	0,266	0,237	0,261	0,461
C	0,014	0,013	0,154	0,231	0,258	0,244	0,309	0,445
D	0,073	0,014	0,000	0,253	0,239	0,248	0,233	0,445
E	0,009	0,013	0,117	0,215	0,251	0,251	0,237	0,583
F	0,013	0,022	0,004	0,241	0,235	0,268	0,263	0,473
G	0,010	0,014	0,001	0,253	0,255	0,271	0,268	0,423
H	0,005	0,014	0,000	0,260	0,270	0,320	0,301	0,407
PROM	0,036	0,025	0,043	0,276	0,294	0,306	0,318	0,521
DE	0,031	0,025	0,053	0,040	0,050	0,054	0,059	0,094



Figura 19





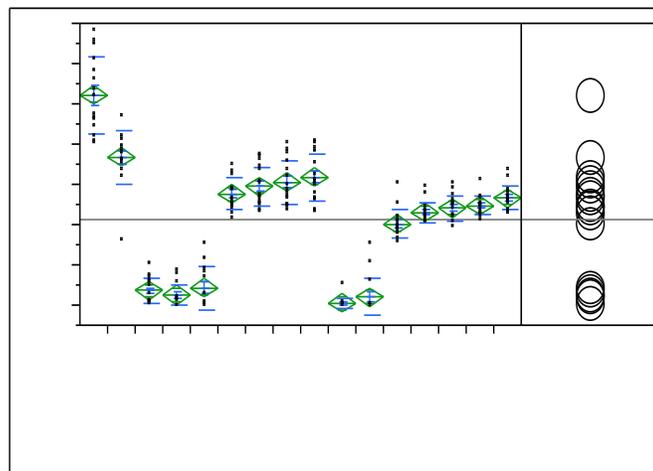
Tabla 13

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Trichophyton mentagrophytes* con antifúngico lavanda importado a diferentes concentraciones

Concentraciones →	Limp 2 =0.5 % v/v	Limp 3 =0.25% v/v	Limp 4 = 0.125% v/v	Limp 5 = 0.063 % v/v	Limp 6 = 0.031 % v/v	Limp 7 = 0.016 % v/v	Limp 8 = 0.008 % v/v	Control de crecimiento
Columnas	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	0,155	0,198	0,224	0,252	0,248	0,237	0,359
B	0,054	0,062	0,303	0,296	0,304	0,311	0,339	0,414
C	0,003	0,000	0,212	0,207	0,262	0,255	0,286	0,397
D	0,010	0,000	0,208	0,231	0,198	0,267	0,277	0,397
E	0,000	0,000	0,200	0,220	0,224	0,246	0,264	0,385
F	0,000	0,000	0,255	0,280	0,292	0,245	0,253	0,359
G	0,000	0,000	0,197	0,246	0,250	0,248	0,267	0,320
H	0,000	0,000	0,185	0,232	0,274	0,237	0,282	0,164
A	0,002	0,108	0,208	0,210	0,221	0,255	0,265	0,336
B	0,000	0,001	0,223	0,239	0,239	0,252	0,256	0,422
C	0,001	0,000	0,191	0,218	0,220	0,230	0,233	0,361
D	0,000	0,000	0,186	0,210	0,197	0,222	0,229	0,386
E	0,000	0,000	0,158	0,208	0,209	0,227	0,236	0,354
F	0,000	0,000	0,165	0,216	0,240	0,212	0,251	0,379
G	0,000	0,000	0,180	0,223	0,222	0,226	0,262	0,364
H	0,003	0,003	0,157	0,214	0,255	0,272	0,322	0,471
PROM	0,005	0,021	0,202	0,230	0,241	0,247	0,266	0,367
DE	0,013	0,047	0,037	0,026	0,032	0,024	0,030	0,065

Figura 20

Gráfico control resultante del análisis estadístico con la Prueba de Tukey-Kramer y diferencias significativas entre las absorbancias promedio.





Absorbancias promedio

control Lcos	A					0.52104843
control Lim	B					0.36681896
Lcos8	B	C				0.31780711
Lcos7		C				0.30591192
Lcos6		C	D			0.29390700
Lcos5		C	D	E		0.27586091
Limp 8		C	D	E		0.26629207
Limp 7			D	E	F	0.24699763
Limp 6			D	E	F	0.24126011
Limp 5				E	F	0.22962360
Limp 4					F	0.20163589
Lcos4					G	0.04292402
Lcos2					G	0.03574422
Lcos3					G	0.02498338
Limp 3					G	0.02057038
Limp 2					G	0.00456294

CMI lavanda importado (Lcos4) = 0.125 %

CMI lavanda nacional (Limp 3) = 0.25 %



Figura 21





Tabla 14

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Trichophyton tonsurans* con antifúngico lavanda proveedor nacional a diferentes concentraciones

Concentraciones →	Lcos 2 =0.5 % v/v	Lcos 3 =0.25% v/v	Lcos 4 = 0.125% v/v	Lcos 5 = 0.063 % v/v	Lcos 6 = 0.031 % v/v	Lcos 7 = 0.016 % v/v	Lcos 8 = 0.008 % v/v	Control de crecimiento
Columnas	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,002	0,099	0,592
B	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019	0,000	0,096	0,406
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,053	0,082	0,388
D	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,037	0,058	0,377
E	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,010	0,165	0,326
F	0,000	0,000	0,004	0,000	0,009	0,000	0,023	0,573
G	0,000	0,000	0,005	0,000	0,002	0,087	0,163	0,514
H	0,000	0,000	0,007	0,000	0,054	0,004	0,270	0,591
A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,224	0,561
B	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,117	0,476
C	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,138	0,379
D	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,009	0,102	0,436
E	0,000	0,000	0,002	0,000	0,026	0,060	0,082	0,445
F	0,000	0,000	0,004	0,000	0,000	0,054	0,042	0,339
G	0,000	0,000	0,003	0,000	0,073	0,017	0,187	0,389
H	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,064	0,056	0,414
PROM	0,000	0,000	0,002	0,000	0,012	0,025	0,119	0,450
DE	0,000	0,000	0,002	0,000	0,022	0,029	0,068	0,090



Figura 22

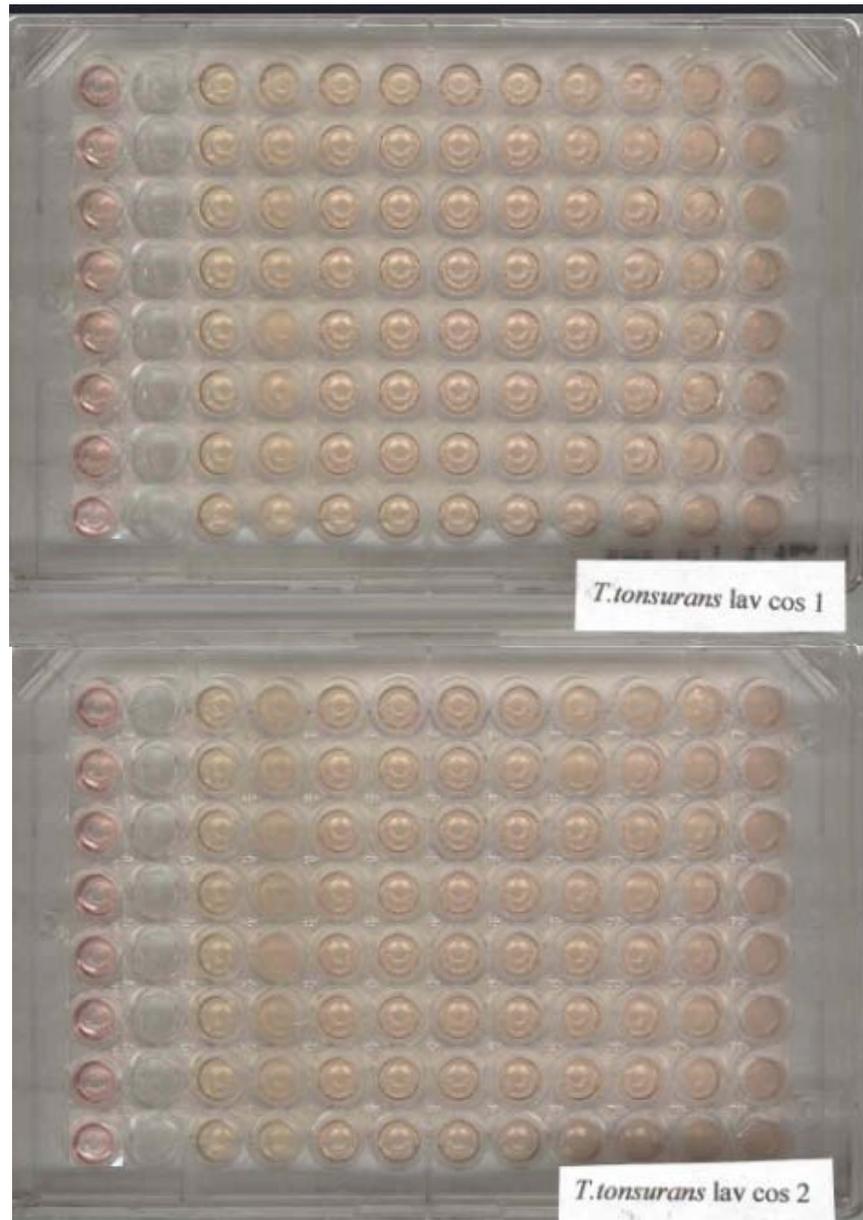




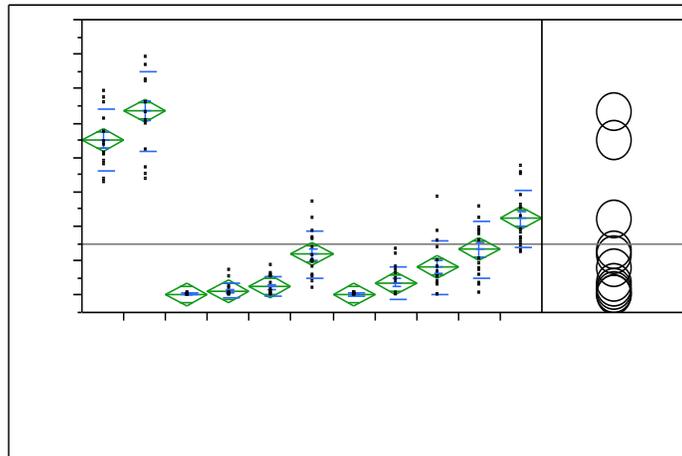
Tabla 15

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Trichophyton tonsurans*, con antifúngico lavanda importado a diferentes concentraciones

Concentraciones →	Limp 2 =0.5 % v/v	Limp 3 =0.25% v/v	Limp 4 = 0.125% v/v	Limp 5 = 0.063 % v/v	Limp 6 = 0.031 % v/v	Limp 7 = 0.016 % v/v	Limp 8 = 0.008 % v/v	Control de crecimiento
Columnas	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	0,000	0,000	0,065	0,081	0,091	0,356	0,626
B	0,000	0,000	0,000	0,006	0,036	0,108	0,181	0,558
C	0,006	0,000	0,000	0,000	0,030	0,028	0,146	0,337
D	0,004	0,000	0,000	0,000	0,042	0,007	0,192	0,372
E	0,005	0,000	0,000	0,048	0,051	0,056	0,131	0,495
F	0,000	0,000	0,000	0,006	0,002	0,037	0,227	0,352
G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,073	0,181	0,421
H	0,000	0,000	0,001	0,080	0,000	0,224	0,261	0,619
A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,188	0,257	0,164	0,507
B	0,000	0,000	0,004	0,000	0,156	0,185	0,353	0,670
C	0,003	0,000	0,008	0,038	0,103	0,160	0,122	0,618
D	0,006	0,000	0,007	0,000	0,138	0,076	0,290	0,693
E	0,000	0,000	0,007	0,122	0,056	0,196	0,252	0,620
F	0,000	0,000	0,007	0,000	0,052	0,176	0,152	0,532
G	0,000	0,000	0,007	0,134	0,068	0,187	0,169	0,497
H	0,000	0,000	0,002	0,071	0,286	0,259	0,377	0,626
PROM	0,002	0,000	0,003	0,036	0,081	0,132	0,222	0,534
DE	0,002	0,000	0,003	0,046	0,078	0,083	0,084	0,115

Figura 23

Gráfico control resultante del análisis estadístico con la Prueba de Tukey-Kramer y diferencias significativas entre las absorbancias promedio.





Absorbancias promedio

control Lim	A					0.53396604
control Lcos		B				0.45043118
Limp 8			C			0.22216551
Limp 7				D		0.13249868
Lcos8				D		0.11906194
Limp 6				D	E	0.08056470
Limp 5					E F	0.03563683
Lcos7					E F	0.02476841
Lcos6					E F	0.01210676
Limp 4					F	0.00267968
Lcos4					F	0.00214676

CMI lavanda importado (Limp 5) = 0.063 %

CMI lavanda nacional (Lcos 6) = 0.031 %



Figura 24

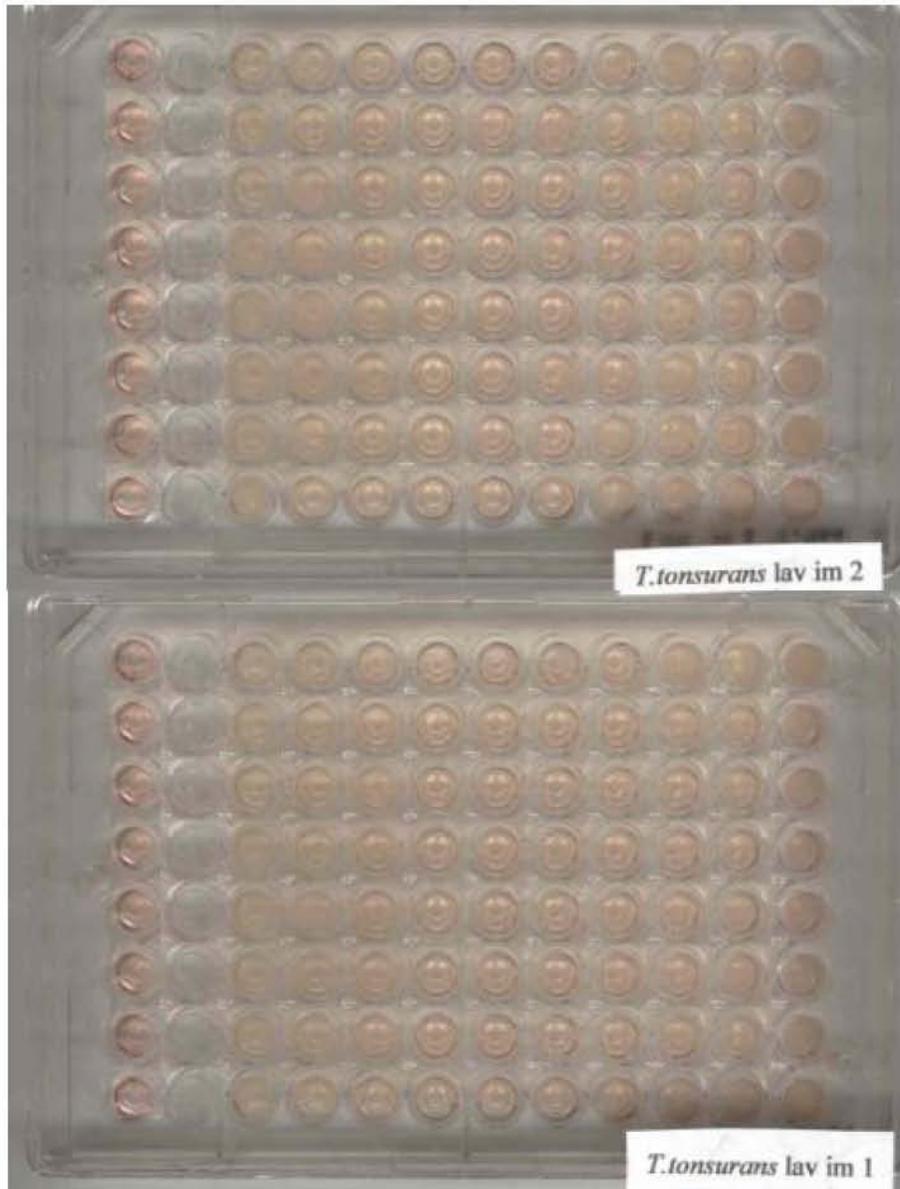




Tabla 16

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Microsporium canis* con antifúngico lavanda proveedor nacional a diferentes concentraciones

Concentraciones →	Lcos 2 =0.5 % v/v	Lcos 3 =0.25% v/v	Lcos 4 = 0.125% v/v	Lcos 5 = 0.063 % v/v	Lcos 6 = 0.031 % v/v	Lcos 7 = 0.016 % v/v	Lcos 8 = 0.008 % v/v	Control de crecimiento
Columnas	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,014	0,009	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,170
B	0,016	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,174
C	0,028	0,013	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,163
D	0,023	0,013	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,149
E	0,014	0,012	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,162
F	0,004	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,335
G	0,007	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,180
H	0,004	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,214
A	0,011	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,259
B	0,009	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,151
C	0,037	0,015	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,138
D	0,051	0,016	0,004	0,000	0,000	0,000	0,000	0,118
E	0,008	0,018	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,139
F	0,000	0,010	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,128
G	0,002	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,166
H	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,184
PROM	0,014	0,010	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,177
DE	0,014	0,005	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,054



Figura 25





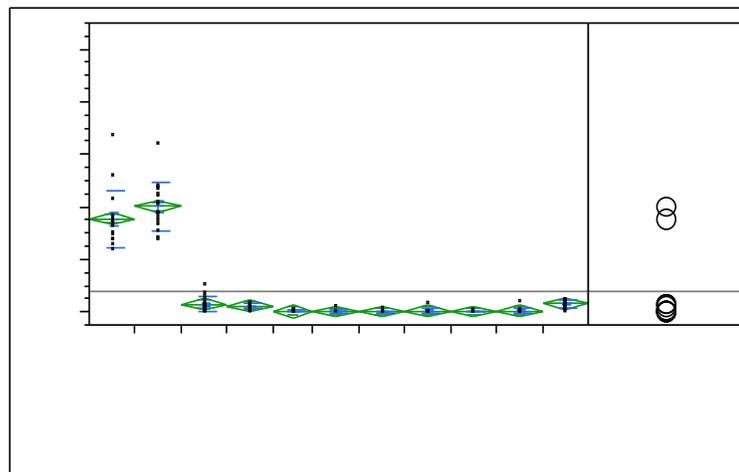
Tabla 17

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Microsporium canis*, con antifúngico lavanda importado a diferentes concentraciones

Concentraciones →	Limp 2 =0.5 % v/v	Limp 3 =0.25% v/v	Limp 4 = 0.125% v/v	Limp 5 = 0.063 % v/v	Limp 6 = 0.031 % v/v	Limp 7 = 0.016 % v/v	Limp 8 = 0.008 % v/v	Control de crecimiento
Columnas	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,004	0,239
B	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,005	0,024	0,207
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,019	0,167
D	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,019	0,224
E	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,022	0,185
F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019	0,188
G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,018	0,205
H	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,236
A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,222
B	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,019	0,179
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,024	0,138
D	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,142
E	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,153
F	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,002	0,018	0,172
G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,018	0,232
H	0,000	0,009	0,007	0,017	0,005	0,018	0,013	0,321
PROM	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000	0,002	0,015	0,201
DE	0,000	0,002	0,002	0,004	0,001	0,005	0,007	0,046

Figura 26

Gráfico control resultante del análisis estadístico con la Prueba de Tukey-Kramer y diferencias significativas entre las absorbancias promedio.





Absorbancias promedio

control Lim	A	0.20070438
control Lcos	A	0.17677136
Limp 8	B	0.01525828
Lcos2	B	0.01427853
Lcos3	B	0.01038424
Limp 7	B	0.00187385
Limp 5	B	0.00118581
Lcos4	B	0.00101500
Limp 3	B	0.00057633
Limp 4	B	0.00044308
Limp 6	B	0.00036490

CMI lavanda importado (Limp 8) = 0.008 %

CMI lavanda nacional (Lcos 8) = 0.008 % *

* El programa estadístico no acepta valores promedio de 0, por esa razón se consideró como la CMI la concentración más baja de 0.008 %, esto por los resultados visuales obtenidos en las placas y los valores de absorbancia obtenidos.



Figura 27

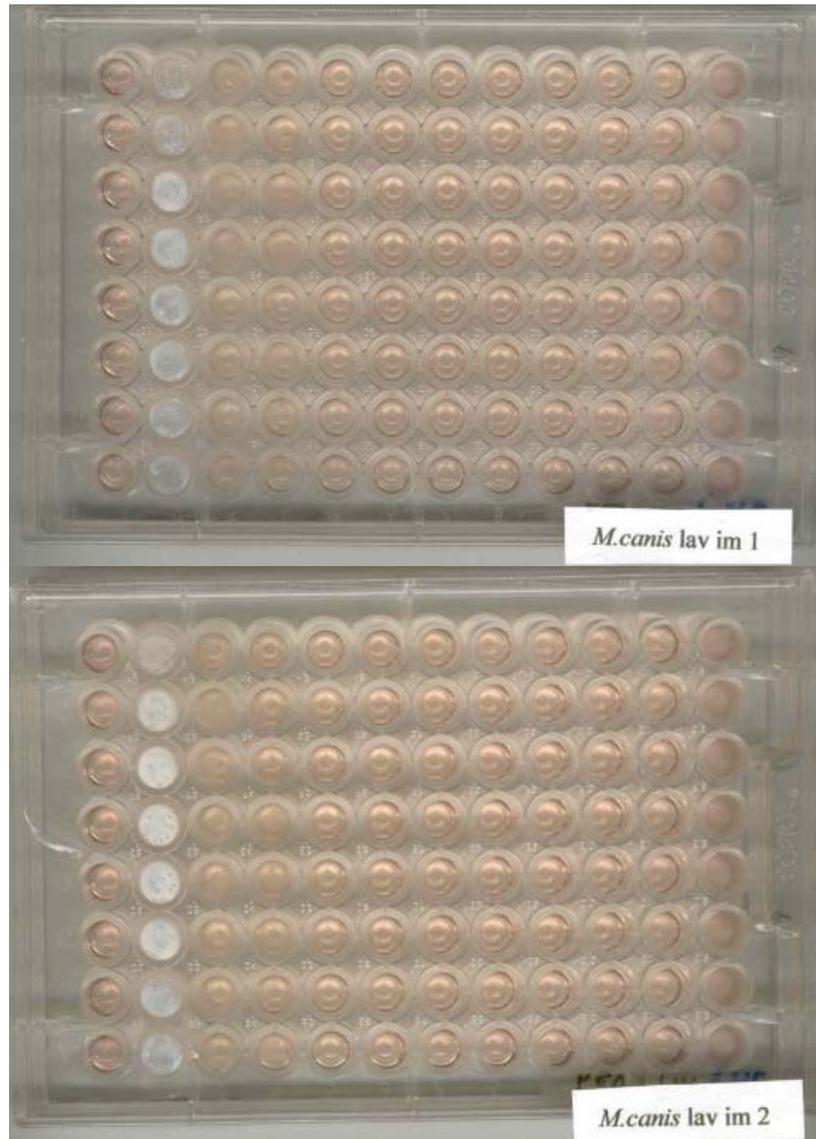




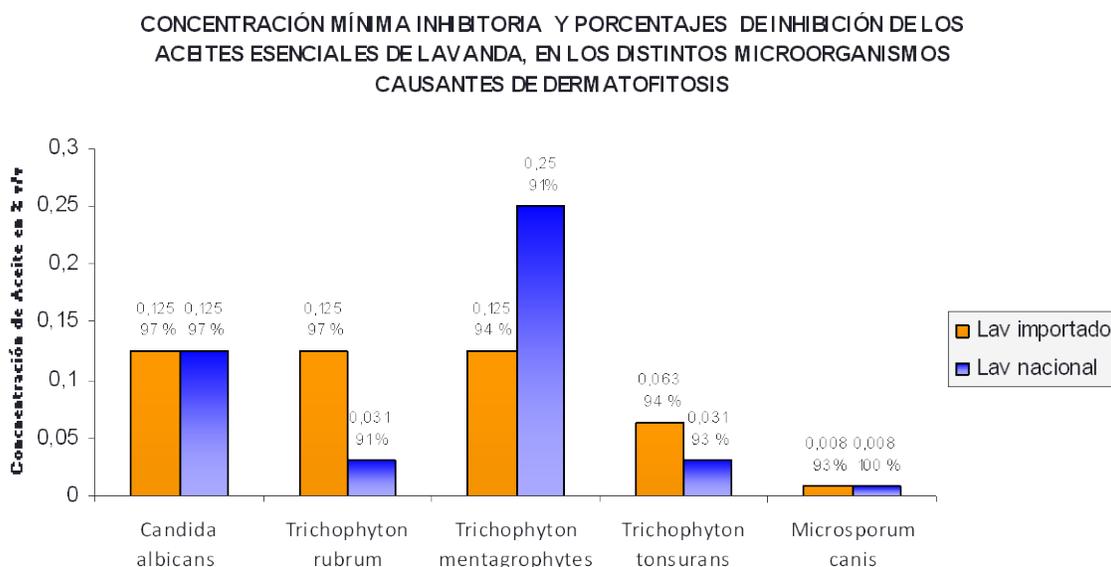
Tabla 18

Cuadro resumen de las CMI y Porcentajes de inhibición resultantes del tratamiento de lavanda en las diferentes especies de microorganismos causantes de dermatofitosis.

Microorganismo	Resultados	ACEITE ESENCIAL DE LAVANDA	
		Nacional	Importado
<i>Candida albicans</i>	Abs control	0,63293326	0,62473011
	Abs Inhibición	0,0187772	0,0206505
	% Inhibición	97	97
	CMI (% v/v)	0,125	0,125
<i>Trichophyton rubrum</i>	Abs control	0,45260698	0,64130325
	Abs Inhibición	0,03924738	0,01605369
	% Inhibición	91	97
	CMI (% v/v)	0,031	0,125
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Abs control	0,52104843	0,36681896
	Abs Inhibición	0,04292402	0,02057038
	% Inhibición	91	94
	CMI (% v/v)	0,25	0,125
<i>Trichophyton tonsurans</i>	Abs control	0,45043118	0,53396604
	Abs Inhibición	0,01210676	0,03563683
	% Inhibición	93	94
	CMI (% v/v)	0,031	0,063
<i>Microsporum canis</i>	Abs control	0,17677136	0,20070438
	Abs Inhibición	0.0000000	0,01525828
	% Inhibición	100	93
	CMI (% v/v)	0.008	0,008



Gráfico 2



3.3.1 ANÁLISIS DEL TRATAMIENTO CON EL ACEITE ESENCIAL DE LAVANDA

En el tratamiento con los aceites esenciales de lavanda, todos los microorganismos mostraron inhibición, pues en el análisis estadístico, se encontró diferencia estadísticamente significativa entre las absorbancias promedio producidas por el control de crecimiento y las producidas por los diferentes tratamientos ($p > 0.05$). (Ver figuras 17,20,23 y 26)

Para *Candida albicans*, se encontró una CMI para ambos aceites nacional y de importación, de 0.125 %, con una inhibición del 97 %, de manera que los aceites en este microorganismo, mostraron el mismo efecto inhibitorio. (Ver tabla 18, gráfico 2)

En la literatura se reportan valores de CMI_{90} , entre 0.69 % y 1.04 % v/v, para este microorganismo, ⁽⁴²⁾ y en este estudio se obtuvieron concentraciones menores y con un mayor porcentaje de inhibición.



Al evaluar la CMI de los aceites en *Trichophyton rubrum*, en el aceite esencial proveedor nacional se obtuvo un valor de 0.031 %, con una inhibición del 91 %, mientras que para el de importación, se obtuvo una CMI de 0.125 % con una inhibición del 97 %. Los dos aceites mostraron tener buena actividad antimicótica, sin embargo se requirió 4 veces más la concentración de aceite importado para lograr el mismo efecto que el aceite de proveedor nacional. (Ver gráfico 2)

Con el tratamiento del aceite esencial de lavanda proveedor nacional en *Trichophyton mentagrophytes*, se encontró una CMI de 0.25 % y una inhibición del 91%, mientras que al ser tratado con el aceite de importación, la CMI resultante fue de 0.125 %, con una inhibición del 94 %. Ambos aceites mostraron tener buena actividad inhibitoria, sin embargo el de importación, mostró tener actividad en una menor concentración que el de proveedor nacional. (Ver gráfico 2)

En la evaluación con *Trichophyton tonsurans*, la CMI resultante para el aceite de lavanda proveedor nacional fue de 0.031 %, con una inhibición del 93 %, mientras que para el aceite importado la CMI fue de 0.063 % con una inhibición del 94 %, como se observa los dos aceites mostraron tener la misma actividad antimicótica, pero el aceite de proveedor nacional mostró ser efectivo a una menor concentración. (Ver gráfico 2)

Al evaluar la actividad antimicótica del aceite esencial de lavanda proveedor nacional en *Microsporum canis*, la CMI para dicho aceite fue de 0.008 %. Y la inhibición fue de 100%.

La CMI del aceite esencial de lavanda de importación en *Microsporum canis*, fue de 0.008%, con una inhibición del 93 %. En los dos casos los dos aceites mostraron tener una similar actividad antimicótica. (Ver gráfico 2)

En la bibliografía se reportan valores de CMI para *M. canis* y *T. mentagrophytes* entre 0.5 a 1%, y en esta investigación se encontraron concentraciones menores a las reportadas en la literatura.



De manera general se observó que los dos aceites mostraron tener buena actividad antimicótica, al inhibir en un 90 % o más, a los microorganismos, sin embargo, el aceite esencial de importación, resultó ser efectivo a menores concentraciones. (Ver gráfico 2)

De acuerdo a los resultados obtenidos, la concentración de 0.125 % de aceite esencial lavanda de importación, tendría buena actividad antimicótica hacia todos los microorganismos.

3.4 RESULTADOS DEL ANTIFÚNGICO ACEITE ESENCIAL DEL ÁRBOL DEL TÉ (TTO)

Tabla 19

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Candida albicans*, con antifúngico TTO proveedor nacional a diferentes concentraciones

Concentraciones →	TTO cos 1 =1 % v/v	TTO cos 2 =0.5% v/v	TTO cos3 =0.25% v/v	TTO cos 4 = 0.125% v/v	TTO cos 5 = 0.063 % v/v	TTO cos 6 = 0.031 % v/v	TTO cos 7 = 0.016 % v/v	TTO cos 8 = 0.008% v/v	Control de crecimiento
Columnas	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	0,000	0,000	0,002	0,082	0,367	0,489	0,672	0,627
B	0,000	0,000	0,000	0,000	0,006	0,155	0,200	0,559	0,563
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,186	0,393	0,540	0,590
D	0,006	0,000	0,000	0,000	0,117	0,326	0,392	0,528	0,641
E	0,001	0,000	0,000	0,000	0,081	0,340	0,380	0,472	0,587
F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,252	0,445	0,453	0,606
G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,176	0,087	0,416	0,575
H	0,002	0,000	0,002	0,002	0,006	0,092	0,134	0,517	0,770
A	0,000	0,000	0,000	0,003	0,245	0,591	0,555	0,622	0,662
B	0,000	0,000	0,000	0,005	0,362	0,446	0,567	0,334	0,591
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,288	0,440	0,528	0,336	0,573
D	0,018	0,000	0,000	0,002	0,269	0,420	0,531	0,311	0,558
E	0,003	0,000	0,000	0,004	0,362	0,476	0,525	0,500	0,620
F	0,000	0,000	0,000	0,001	0,403	0,474	0,513	0,488	0,561
G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,370	0,537	0,544	0,560	0,607
H	0,000	0,000	0,000	0,000	0,118	0,300	0,482	0,692	0,613
PROM	0,002	0,000	0,000	0,001	0,174	0,349	0,423	0,500	0,609
DE	0,005	0,000	0,001	0,002	0,150	0,146	0,153	0,113	0,052

TTO cos = árbol del té proveedor nacional



Figura 28





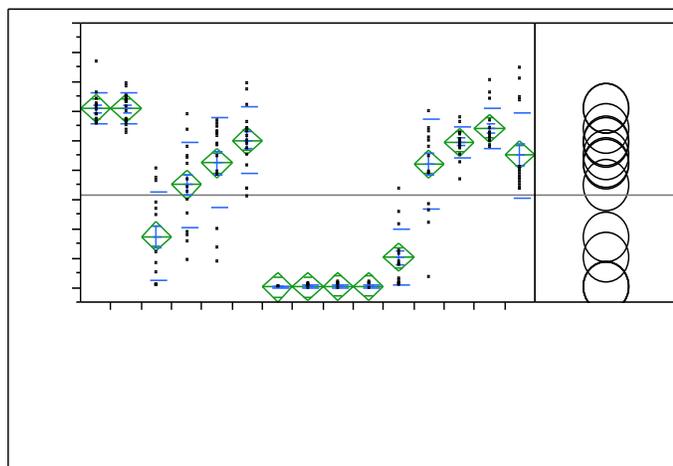
Tabla 20

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Candida albicans* con antifúngico TTO importado a diferentes concentraciones

Concentraciones →	TTO imp 1 =1 % v/v	TTO imp 2 =0.5% v/v	TTO Imp 3 =0.25% v/v	TTO imp 4 = 0.125% v/v	TTO imp 5 = 0.063 % v/v	TTO imp 6 = 0.031 % v/v	TTO imp 7 = 0.016 % v/v	TTO imp 8 = 0.008% v/v	Control de crecimiento
Columnas	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	0,000	0,000	0,012	0,218	0,504	0,641	0,638	0,685
B	0,000	0,000	0,000	0,114	0,543	0,524	0,499	0,382	0,535
C	0,000	0,000	0,000	0,024	0,444	0,473	0,496	0,370	0,598
D	0,000	0,000	0,000	0,006	0,445	0,487	0,483	0,358	0,566
E	0,000	0,000	0,000	0,016	0,395	0,491	0,514	0,408	0,633
F	0,000	0,000	0,000	0,014	0,386	0,425	0,499	0,335	0,651
G	0,000	0,000	0,000	0,085	0,479	0,477	0,542	0,396	0,630
H	0,000	0,000	0,000	0,030	0,037	0,368	0,567	0,648	0,696
A	0,015	0,017	0,018	0,125	0,260	0,451	0,705	0,711	0,637
B	0,008	0,010	0,011	0,337	0,598	0,580	0,509	0,383	0,552
C	0,010	0,013	0,013	0,125	0,529	0,523	0,523	0,394	0,572
D	0,010	0,013	0,015	0,079	0,510	0,528	0,526	0,334	0,563
E	0,000	0,000	0,000	0,254	0,509	0,499	0,498	0,384	0,526
F	0,000	0,000	0,000	0,116	0,501	0,484	0,480	0,344	0,617
G	0,000	0,000	0,000	0,214	0,596	0,527	0,523	0,367	0,648
H	0,000	0,000	0,000	0,075	0,284	0,564	0,664	0,746	0,640
PROM	0,003	0,003	0,004	0,102	0,421	0,494	0,542	0,450	0,609
DE	0,005	0,006	0,006	0,096	0,153	0,052	0,068	0,144	0,052

Figura 29

Gráfico control resultante del análisis estadístico con la Prueba de Tukey-Kramer y diferencias significativas entre las absorbancias promedio.





Absorbancias promedio

control TTOimp	A		0.60936110
control TTOcos	A		0.60906863
TTO imp 7	A B		0.54192882
TTO cos 8	A B C		0.50011835
TTO imp 6	A B C		0.49396016
TTO imp 8	B C D		0.44996717
TTO cos 7	B C D		0.42278863
TTO imp 5	C D		0.42089883
TTO cos 6	D		0.34853525
TTO cos 5	E		0.17362073
TTO imp 4	E F		0.10157743
TTO imp 3	F		0.00352404
TTO imp 2	F		0.00328649
TTO imp 1	F		0.00268208
TTO cos4	F		0.00118964

CMI TTO nacional (TTO cos 4) = 0.125 %
 CMI Tto importado (TTO imp 3) = 0.25 %

Tabla 22

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *T.richophyton rubrum* con antifúngico TTO proveedor nacional a diferentes concentraciones

Concentraciones →	TTO cos 1 =1% v/v	TTO cos 2 =0.5 % v/v	TTO cos3 =0.25% v/v	TTO cos 4 = 0.125% v/v	TTO cos 5 = 0.063 % v/v	TTO cos 6 = 0.031 % v/v	TTO cos 7 = 0.016 % v/v	TTO cos 8 = 0.008 % v/v	Control de crecimiento
Columnas	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,074	0,278	0,292	0,349	0,405
B	0,000	0,000	0,000	0,009	0,047	0,167	0,219	0,254	0,517
C	0,000	0,000	0,000	0,039	0,035	0,139	0,149	0,252	0,568
D	0,000	0,000	0,000	0,001	0,043	0,128	0,178	0,164	0,508
E	0,000	0,000	0,000	0,006	0,097	0,121	0,146	0,203	0,531
F	0,000	0,000	0,000	0,001	0,061	0,137	0,175	0,231	0,541
G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,115	0,244	0,273	0,288	0,570
H	0,000	0,000	0,000	0,000	0,055	0,340	0,363	0,358	0,531
A	0,004	0,005	0,007	0,006	0,046	0,263	0,273	0,314	0,595
B	0,000	0,000	0,001	0,002	0,029	0,221	0,251	0,221	0,540
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,052	0,191	0,224	0,186	0,543
D	0,000	0,000	0,000	0,000	0,048	0,220	0,223	0,173	0,528
E	0,000	0,000	0,000	0,000	0,062	0,063	0,131	0,184	0,551
F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,068	0,078	0,149	0,224	0,551
G	0,000	0,000	0,000	0,080	0,035	0,164	0,193	0,256	0,560
H	0,000	0,000	0,002	0,004	0,001	0,245	0,325	0,330	0,665
PROM	0,000	0,000	0,001	0,009	0,054	0,188	0,223	0,249	0,544
DE	0,001	0,001	0,002	0,021	0,027	0,076	0,069	0,063	0,052



Figura 30

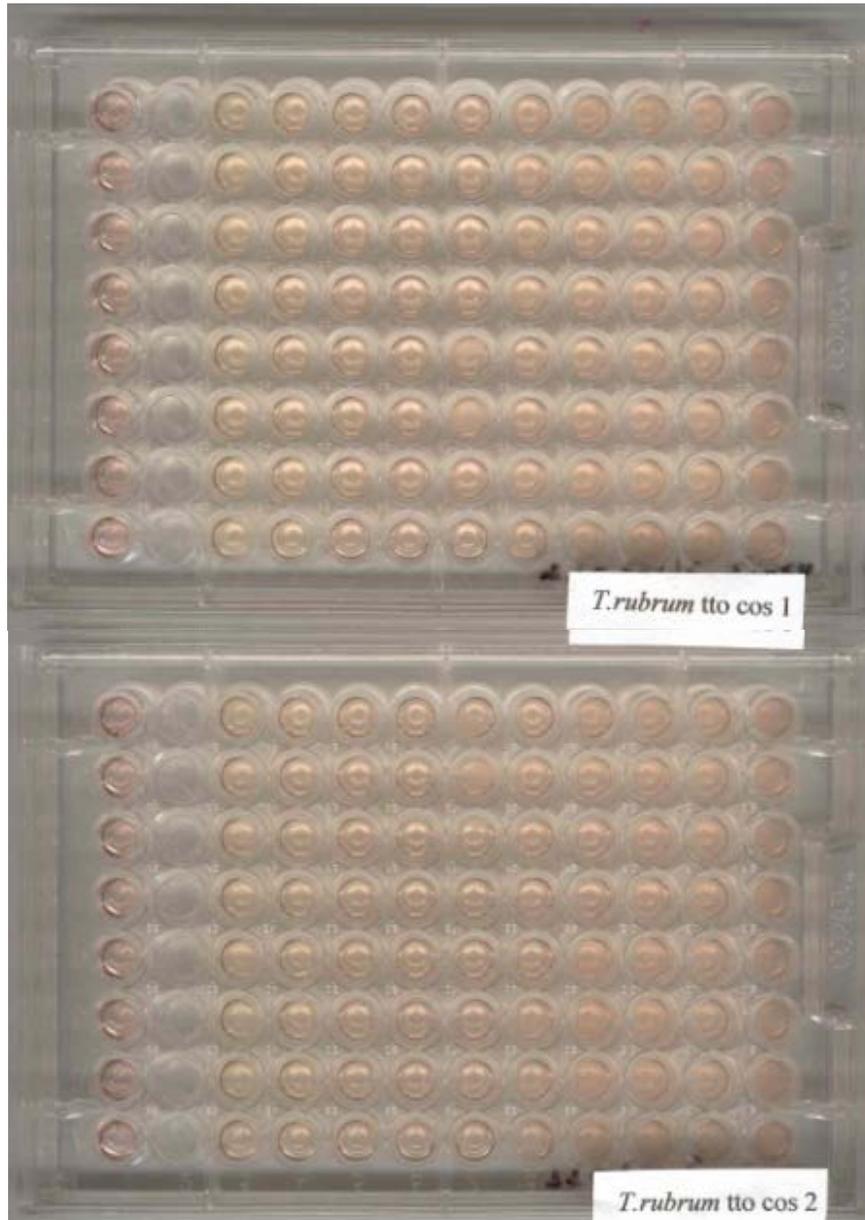




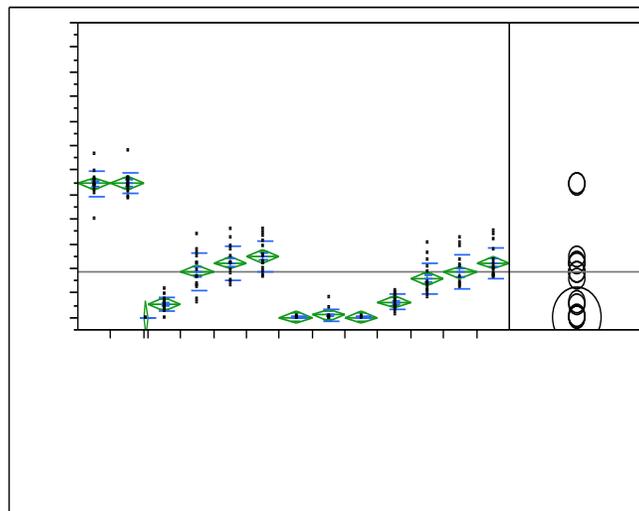
Tabla 23

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Trichophyton rubrum* con antifúngico TTO importado a diferentes concentraciones

Concentraciones →	TTO imp 0 = 2 % v/v	TTO imp 1 =1 % v/v	TTO imp 2 =0.5 % v/v	TTO imp3 =0.25 % v/v	TTO imp 4 = 0.125% v/v	TTO imp 5 = 0.063 % v/v	TTO imp 6 = 0.031 % v/v	TTO imp 7 = 0.016 % v/v	TTO imp 8 = 0.008 % v/v	Control de crecimiento
Columnas	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,111	0,263	0,233	0,278	0,515
B	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,064	0,128	0,166	0,192	0,537
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,095	0,107	0,133	0,174	0,542
D	0,007	0,000	0,000	0,000	0,000	0,067	0,084	0,131	0,170	0,525
E	0,000	0,000	0,000	0,000	0,008	0,059	0,140	0,131	0,164	0,551
F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,111	0,142	0,134	0,199	0,564
G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,100	0,187	0,214	0,223	0,557
H	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,088	0,306	0,325	0,355	0,681
A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,074	0,210	0,306	0,318	0,544
B	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,115	0,148	0,204	0,541
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,027	0,113	0,133	0,197	0,565
D	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,047	0,099	0,125	0,163	0,534
E	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,044	0,126	0,134	0,170	0,491
F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,038	0,142	0,147	0,179	0,558
G	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,036	0,145	0,204	0,235	0,485
H	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,015	0,233	0,290	0,335	0,571
PROM	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,063	0,159	0,185	0,222	0,548
DE	0,002	0,000	0,000	0,000	0,002	0,031	0,064	0,069	0,064	0,043

Figura 31

Gráfico control resultante del análisis estadístico con la Prueba de Tukey-Kramer y diferencias significativas entre las absorbancias promedio.





Absorbancias promedio

control TTOimp	A	0.54763836
control TTOcos	A	0.54390704
TTO cos 8	B	0.24917831
TTO cos 7	B C	0.22279420
TTO imp 8	B C	0.22236171
TTO cos 6	C D	0.18758874
TTO imp 7	C D	0.18462951
TTO imp 6	D	0.15872964
TTO imp 5	E	0.06314455
TTO cos 5	E F	0.05432204
TTO cos4	F	0.00918460
TTO imp 4	F	0.00071545
TTO cos3	F	0.00063078
TTO cos 0	F	0.00000000

CMI TTO nacional (TTO cos 4) = 0.125 %

CMI TTO importado (TTO imp 4) = 0.125 %



Figura 32

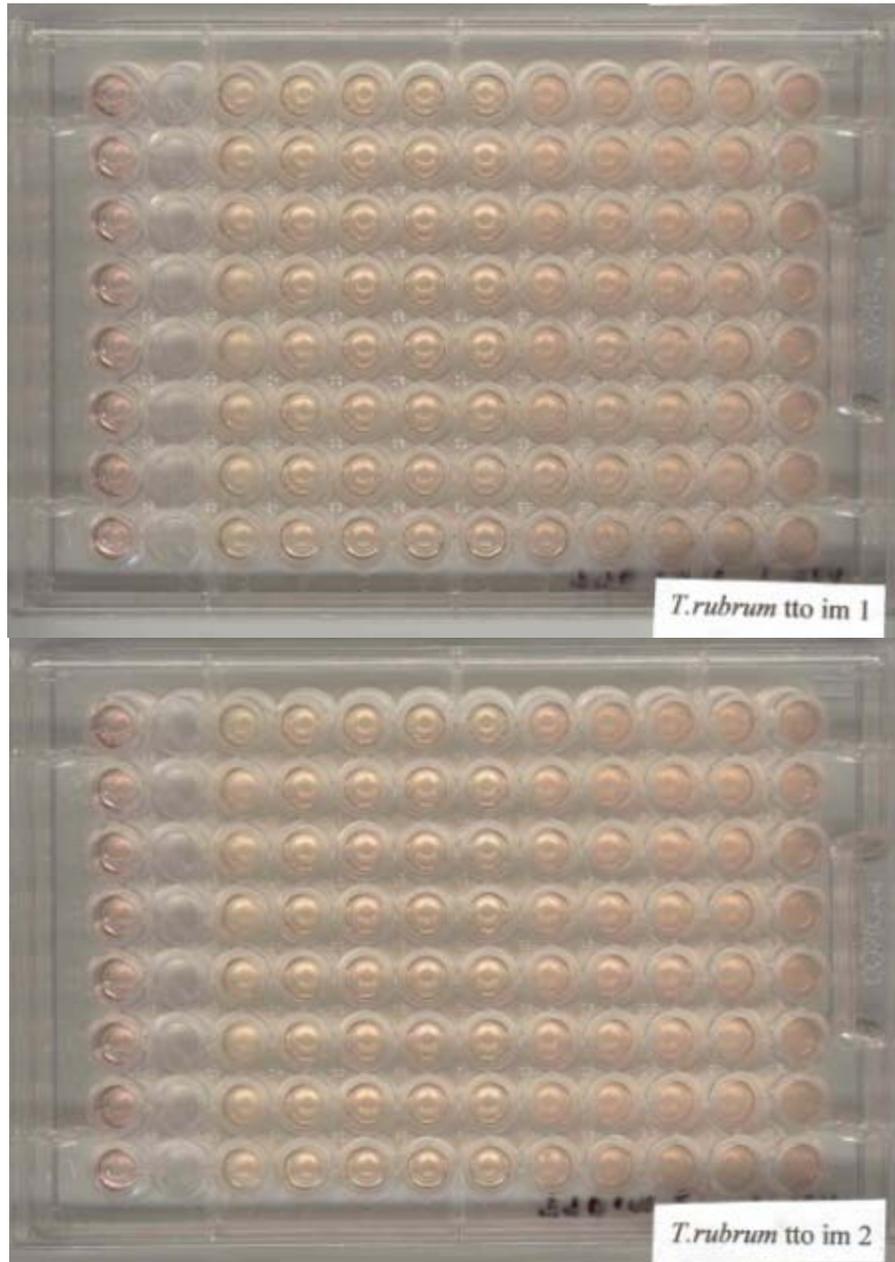




Tabla 24

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Trichophyton mentagrophytes* con antifúngico TTO proveedor nacional a diferentes concentraciones

Concentraciones →	TTO cos 1 =1 % v/v	TTO cos 2 =0.5 % v/v	TTO cos3 =0.25% v/v	TTO cos 4 = 0.125% v/v	TTO cos 5 = 0.063% v/v	TTO cos 6 = 0.031 % v/v	TTO cos 7 = 0.016% v/v	TTO cos 8 = 0.008% v/v	Control de crecimiento
Columnas	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,001	0,0014	0,000	0,001	0,280	0,303	0,259	0,301	0,271
B	0,000	0,0000	0,000	0,011	0,240	0,285	0,279	0,286	0,325
C	0,000	0,0011	0,000	0,000	0,219	0,252	0,256	0,269	0,373
D	0,000	0,0047	0,002	0,000	0,209	0,222	0,233	0,274	0,377
E	0,006	0,0011	0,000	0,000	0,180	0,245	0,245	0,277	0,367
F	0,005	0,0061	0,004	0,006	0,185	0,234	0,254	0,290	0,341
G	0,000	0,0004	0,001	0,000	0,166	0,272	0,249	0,270	0,326
H	0,000	0,0012	0,002	0,000	0,209	0,274	0,249	0,269	0,327
A	0,002	0,0020	0,000	0,000	0,238	0,267	0,303	0,281	0,375
B	0,000	0,0000	0,000	0,000	0,202	0,281	0,276	0,288	0,350
C	0,006	0,0065	0,000	0,000	0,136	0,236	0,260	0,244	0,338
D	0,001	0,0014	0,000	0,000	0,112	0,239	0,247	0,267	0,391
E	0,001	0,0005	0,002	0,000	0,106	0,230	0,243	0,283	0,356
F	0,001	0,0013	0,000	0,000	0,103	0,242	0,235	0,258	0,373
G	0,000	0,0000	0,000	0,000	0,108	0,241	0,234	0,261	0,334
H	0,000	0,0000	0,000	0,000	0,192	0,262	0,248	0,255	0,312
PROM	0,001	0,002	0,001	0,001	0,180	0,255	0,254	0,273	0,346
DE	0,002	0,002	0,001	0,003	0,054	0,023	0,019	0,015	0,031



Figura 33





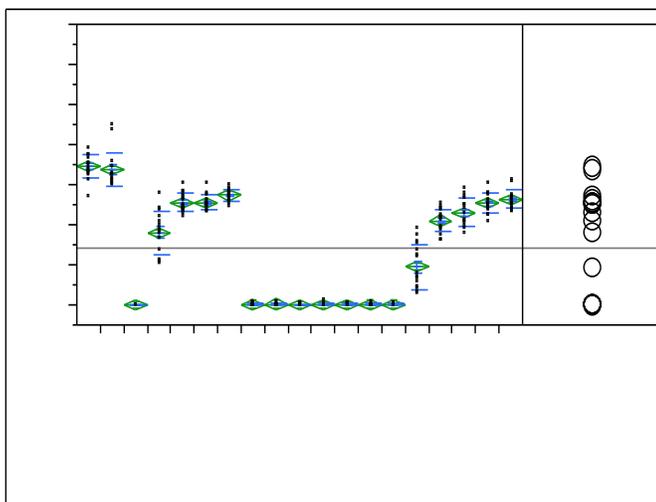
Tabla 25

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Trichophyton mentagrophytes* con antifúngico TTO importado a diferentes concentraciones

Concentraciones →	TTO imp =1 % v/v	TTO imp 2 =0.5 % v/v	TTO imp3 =0.25% v/v	TTO imp 4 = 0.125% v/v	TTO imp 5 = 0.063 % v/v	TTO imp 6 = 0.031 % v/v	TTO imp 7 = 0.016 % v/v	TTO imp 8 = 0.008 % v/v	Control de crecimiento
Columnas	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	0,008	0,004	0,193	0,254	0,291	0,264	0,259	0,324
B	0,000	0,000	0,002	0,127	0,220	0,240	0,256	0,265	0,317
C	0,000	0,001	0,000	0,070	0,186	0,211	0,249	0,270	0,357
D	0,000	0,000	0,000	0,046	0,175	0,204	0,240	0,232	0,450
E	0,002	0,001	0,001	0,031	0,161	0,208	0,244	0,239	0,329
F	0,000	0,001	0,000	0,029	0,164	0,209	0,224	0,241	0,314
G	0,000	0,000	0,000	0,042	0,191	0,229	0,256	0,268	0,315
H	0,000	0,000	0,001	0,120	0,236	0,272	0,306	0,275	0,305
A	0,000	0,000	0,000	0,066	0,242	0,281	0,251	0,254	0,323
B	0,000	0,000	0,000	0,138	0,220	0,206	0,251	0,266	0,331
C	0,000	0,000	0,000	0,159	0,196	0,180	0,227	0,254	0,327
D	0,000	0,000	0,000	0,173	0,215	0,192	0,209	0,240	0,436
E	0,005	0,008	0,005	0,033	0,212	0,194	0,240	0,251	0,345
F	0,004	0,001	0,005	0,078	0,226	0,252	0,279	0,313	0,324
G	0,000	0,000	0,000	0,058	0,220	0,268	0,276	0,308	0,308
H	0,004	0,003	0,006	0,155	0,244	0,251	0,280	0,270	0,301
PROM	0,001	0,001	0,001	0,095	0,210	0,230	0,253	0,263	0,338
DE	0,002	0,003	0,002	0,056	0,029	0,035	0,024	0,023	0,043

Figura 34

Gráfico control resultante del análisis estadístico con la Prueba de Tukey-Kramer y diferencias significativas entre las absorbancias promedio.





Absorbancias promedio

Control TTOcos	A					0.34610177
control TTOimp	A					0.33790783
TTO cos 8	B					0.27334177
TTO imp 8	B	C				0.26281021
TTO cos 6	B	C				0.25526447
TTO cos 7	B	C				0.25439334
TTO imp 7	B	C				0.25324947
TTO imp 6		C	D			0.23040763
TTO imp 5			D	E		0.21008433
TTO cos 5				E		0.18024374
TTO imp 4					F	0.09495283
TTO cos2					G	0.00173006
TTO imp 3					G	0.00148953
TTO cos1					G	0.00145529
TTO imp 2					G	0.00136112
TTO cos4					G	0.00108647
TTO imp 1					G	0.00101446
TTO cos3					G	0.00075392
TTO cos 0					G	0.00000000

CMI TTO nacional (TTO cos 4) = 0.125 %
 CMI TTO importado (TTO imp 3) = 0.25 %



Figura 35

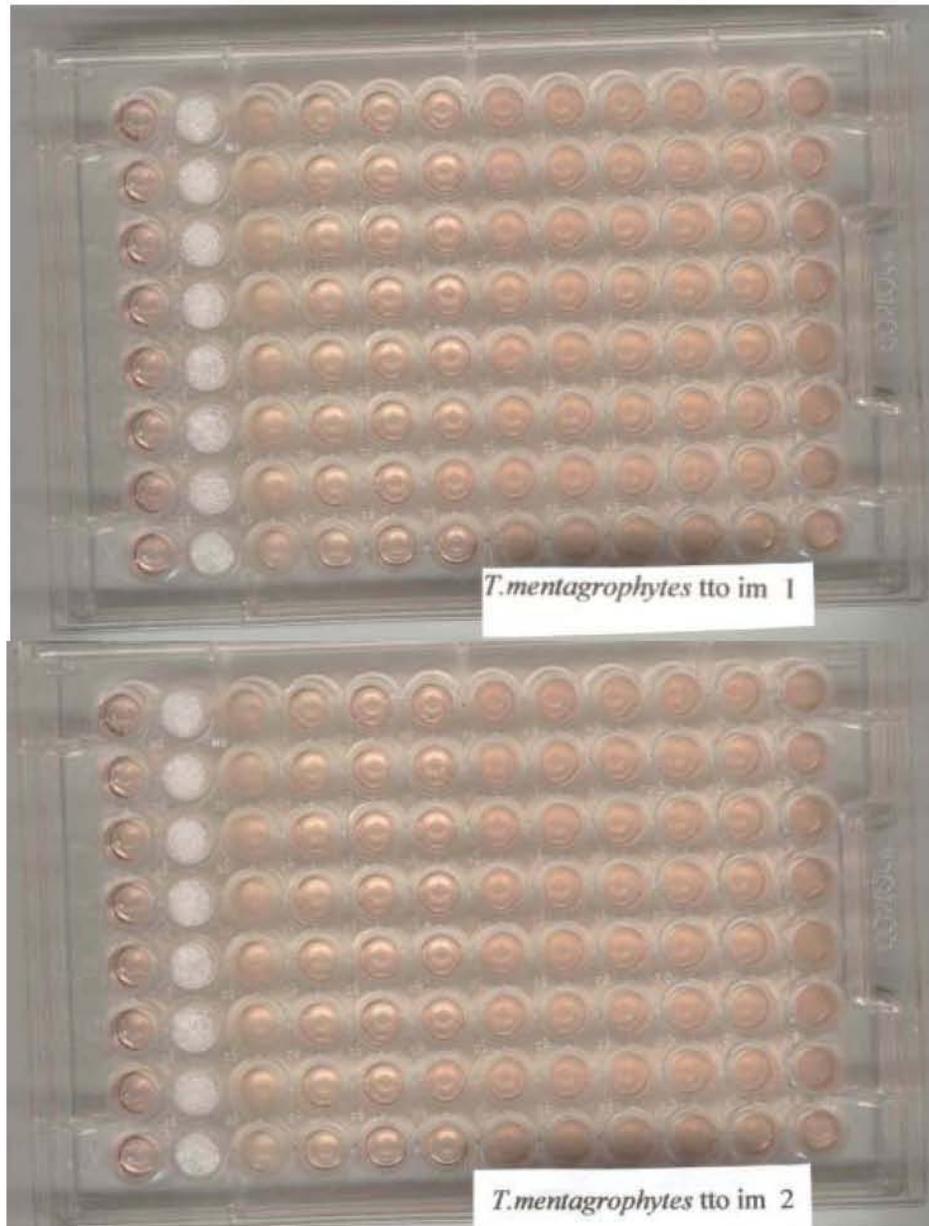




Tabla 26

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Trichophyton tonsurans* con antifúngico TTO proveedor nacional a diferentes concentraciones

Concentraciones →	TTO cos 1 =1 % v/v	TTO cos 2 =0.5% v/v	TTO cos3 =0.25% v/v	TTO cos 4 = 0.125% v/v	TTO cos 5 = 0.063% v/v	TTO cos 6 = 0.031 % v/v	TTO cos 7 = 0.016 % v/v	TTO cos 8 = 0.008% v/v	Control de crecimiento
Columnas	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,007	0,005	0,008	0,053	0,061	0,108	0,193	0,250	0,798
B	0,011	0,008	0,010	0,013	0,040	0,069	0,039	0,143	0,718
C	0,001	0,000	0,000	0,000	0,019	0,042	0,131	0,114	0,558
D	0,002	0,000	0,000	0,000	0,014	0,008	0,000	0,131	0,649
E	0,000	0,000	0,000	0,000	0,026	0,014	0,111	0,118	0,524
F	0,003	0,000	0,000	0,000	0,012	0,044	0,009	0,139	0,476
G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,033	0,076	0,037	0,181	0,570
H	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,127	0,296	0,278	0,663
A	0,004	0,003	0,004	0,007	0,054	0,046	0,214	0,271	0,695
B	0,000	0,000	0,000	0,002	0,011	0,071	0,108	0,165	0,583
C	0,001	0,000	0,000	0,002	0,008	0,062	0,067	0,135	0,559
D	0,003	0,000	0,000	0,000	0,031	0,059	0,068	0,134	0,573
E	0,006	0,000	0,000	0,003	0,026	0,017	0,122	0,159	0,568
F	0,006	0,001	0,001	0,003	0,026	0,031	0,098	0,155	0,538
G	0,001	0,004	0,000	0,002	0,027	0,088	0,171	0,207	0,611
H	0,006	0,002	0,002	0,005	0,082	0,149	0,141	0,334	0,629
PROM	0,003	0,001	0,002	0,006	0,029	0,063	0,113	0,182	0,607
DE	0,003	0,002	0,003	0,013	0,021	0,040	0,079	0,066	0,082



Figura 36

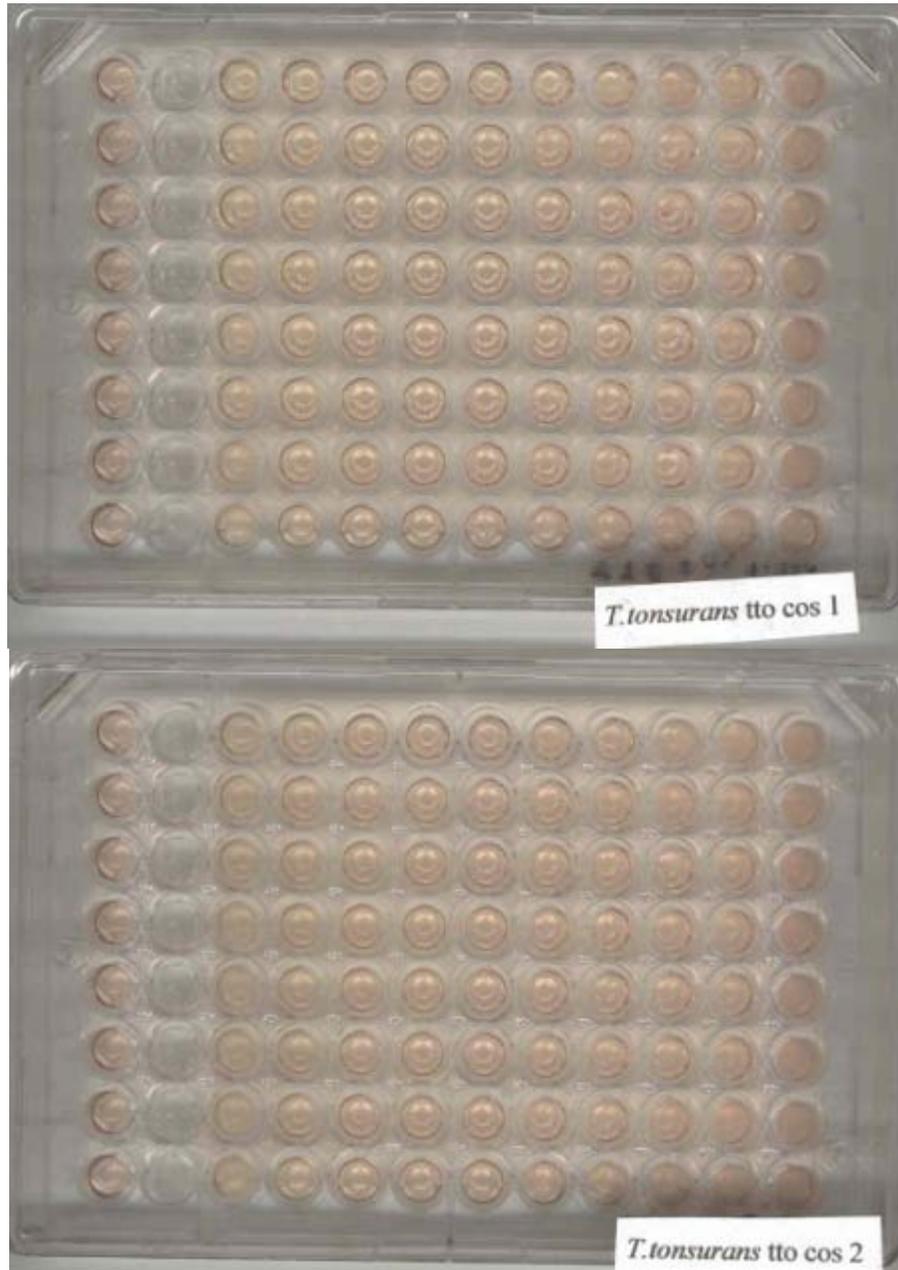




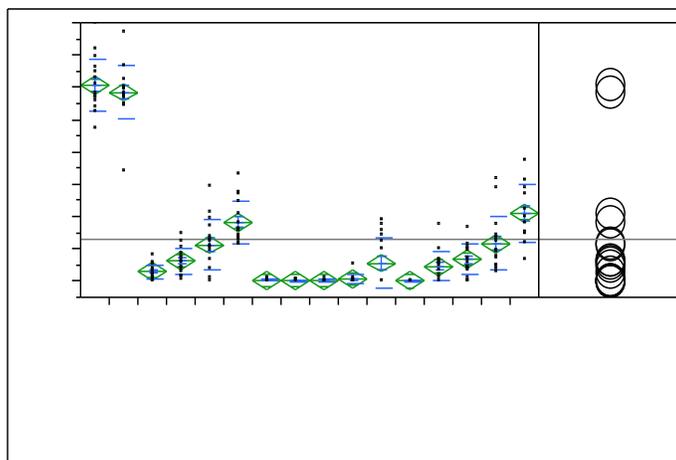
Tabla 27

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Trichophyton tonsurans* con antifúngico TTO importado a diferentes concentraciones

Concentraciones →	TTO imp 0 = 2 % v/v	TTO imp 1 =1 % v/v	TTO imp 2 =0.5 % v/v	TTO imp3 =0.25% v/v	TTO imp 4 = 0.125% v/v	TTO imp 5 = 0.063 % v/v	TTO imp 6 = 0.031 % v/v	TTO imp 7 = 0.016 % v/v	TTO imp 8 = 0.008% v/v	Control de crecimiento
Columnas	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	0,000	0,000	0,159	0,000	0,101	0,166	0,288	0,376	0,584
B	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,058	0,102	0,141	0,199	0,603
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,115	0,097	0,149	0,666
D	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,035	0,047	0,051	0,118	0,625
E	0,010	0,000	0,000	0,000	0,000	0,047	0,107	0,033	0,117	0,603
F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,066	0,034	0,048	0,119	0,579
G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,037	0,073	0,079	0,270	0,568
H	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,014	0,000	0,316	0,311	0,574
A	0,024	0,000	0,000	0,127	0,000	0,177	0,098	0,123	0,311	0,773
B	0,000	0,000	0,000	0,144	0,002	0,065	0,107	0,136	0,181	0,575
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,055	0,043	0,039	0,180	0,598
D	0,000	0,000	0,000	0,176	0,000	0,022	0,066	0,097	0,153	0,572
E	0,000	0,000	0,000	0,100	0,000	0,000	0,038	0,073	0,070	0,547
F	0,005	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,060	0,074	0,290	0,595
G	0,000	0,000	0,000	0,001	0,003	0,062	0,009	0,092	0,291	0,552
H	0,000	0,000	0,000	0,191	0,000	0,000	0,003	0,177	0,224	0,342
PROM	0,002	0,000	0,000	0,056	0,000	0,046	0,067	0,117	0,210	0,585
DE	0,006	0,000	0,000	0,077	0,001	0,046	0,046	0,083	0,089	0,084

Figura 37

Gráfico control resultante del análisis estadístico con la Prueba de Tukey-Kramer y diferencias significativas entre las absorbancias promedio





Absorbancias promedio

control TTOcos	A						0.60693004
control TTOimp	A						0.58480706
TTO imp 8		B					0.21008750
TTO cos 8		B	C				0.18219028
TTO imp 7			C	D			0.11653526
TTO cos 7			C	D	E		0.11277197
TTO imp 6				D	E	F	0.06670579
TTO cos 6				D	E	F	0.06304429
TTO imp 3				D	E	F	0.05607211
TTO imp 5					E	F	0.04614989
TTO cos 5						F	0.02936299
TTO cos4						F	0.00564491
TTO cos1						F	0.00327085
TTO cos3						F	0.00155691
TTO cos2						F	0.00149858
TTO imp 4						F	0.00036427

CMI TTO nacional (TTO imp 4) = 0.125 %
 CMI TTO importado (TTO cos 5) = 0.063 %



Figura 38

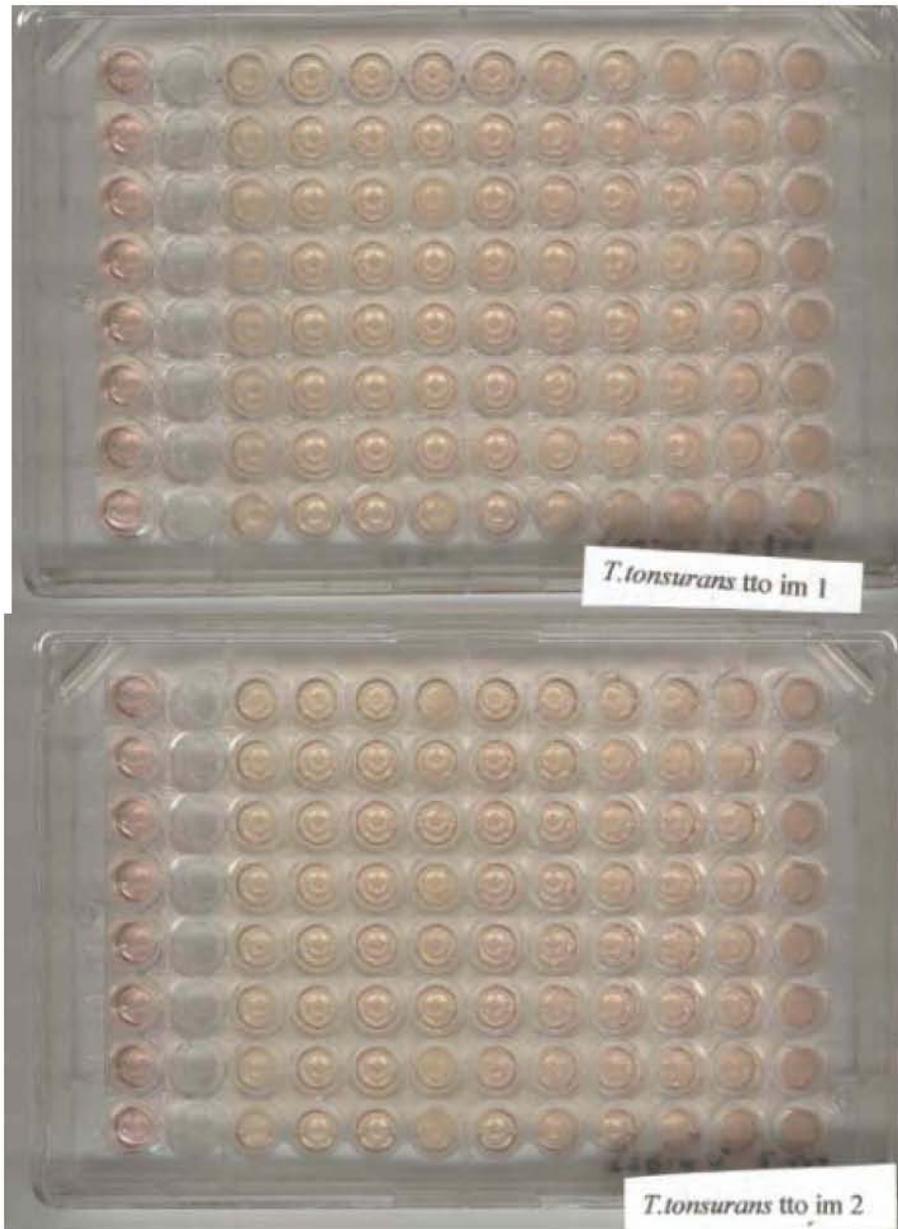




Tabla 28

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Microsporium canis* con antifúngico TTO proveedor nacional a diferentes concentraciones

Concentraciones →	TTO cos 2 =0.5 % v/v	TTO cos3 =0.25% v/v	TTO cos 4 = 0.125% v/v	TTO cos 5 = 0.063 % v/v	TTO cos 6 = 0.031 % v/v	TTO cos 7 = 0.016 % v/v	TTO cos 8 = 0.008% v/v	Control de crecimiento
Columnas	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,089	0,376
B	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,290	0,423
C	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,290	0,425
D	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,322	0,408
E	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,292	0,368
F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,281	0,441
G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,237	0,350
H	0,000	0,003	0,000	0,005	0,000	0,000	0,237	0,455
A	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,269	0,266
B	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,291	0,398
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,253	0,426
D	0,000	0,000	0,000	0,005	0,000	0,000	0,299	0,363
E	0,004	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,244	0,415
F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,231	0,430
G	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,227	0,476
H	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,297	0,493
PROM	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,259	0,407
DE	0,001	0,001	0,001	0,002	0,000	0,000	0,054	0,055



Figura 39

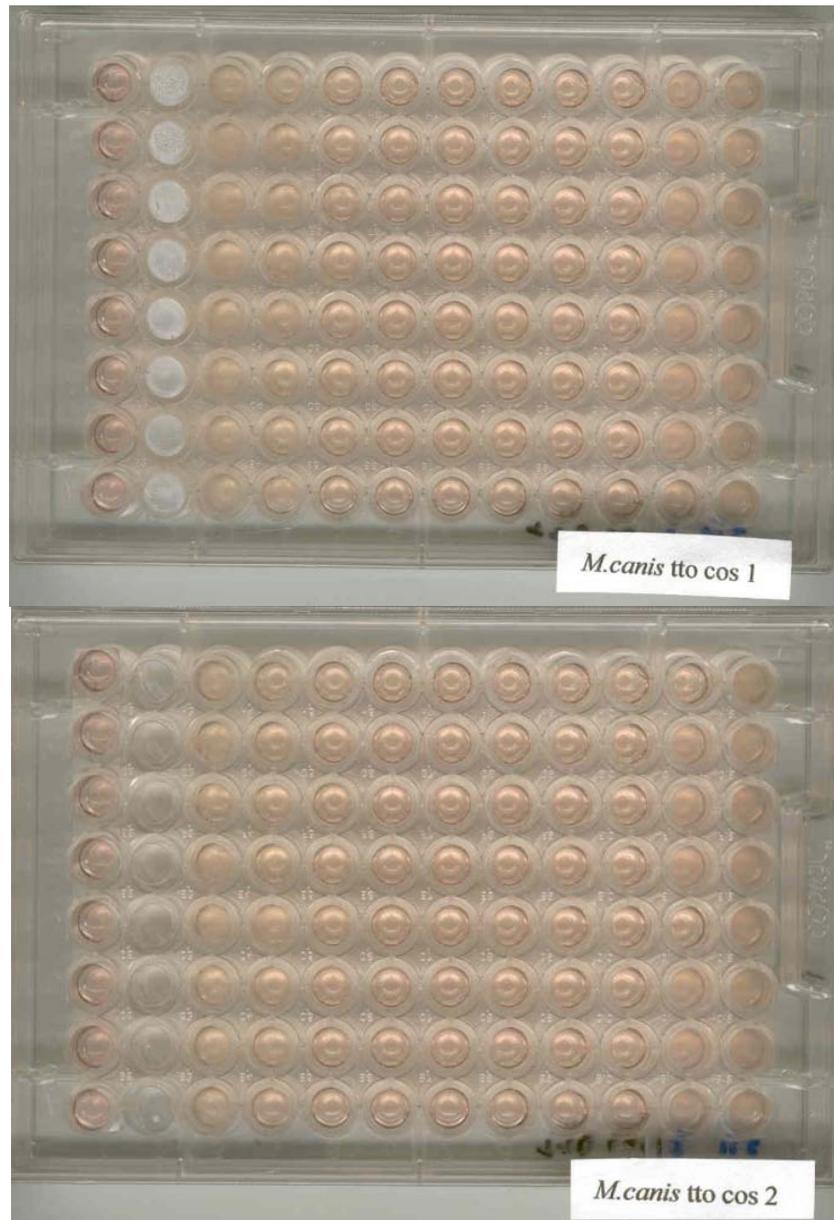




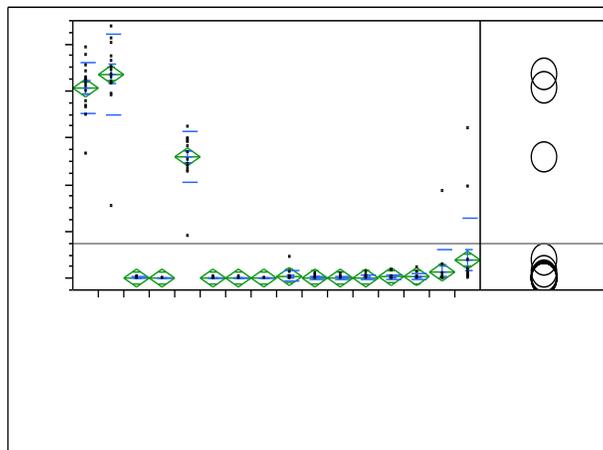
Tabla 29

Absorbancias promedio obtenidas en las placas 1 y 2, en el tratamiento de *Microsporium canis* con antifúngico TTO importado a diferentes concentraciones

Concentraciones →	TTO imp 1 =1 % v/v	TTO imp 2 =0.5 % v/v	TTO imp3 =0.25% v/v	TTO imp 4 = 0.125% v/v	TTO imp 5 = 0.063 % v/v	TTO imp 6 = 0.031 % v/v	TTO imp 7 = 0.016 % v/v	TTO imp 8 = 0.008% v/v	Control de crecimiento
Columnas	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,004	0,006	0,000	0,007	0,001	0,000	0,000	0,002	0,539
B	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012	0,417
C	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,007	0,394
D	0,005	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,002	0,004	0,420
E	0,002	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,196	0,463
F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,003	0,474
G	0,005	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,020	0,451
H	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,501
A	0,012	0,011	0,009	0,014	0,017	0,013	0,009	0,011	0,154
B	0,004	0,006	0,004	0,003	0,016	0,023	0,028	0,038	0,446
C	0,000	0,002	0,000	0,000	0,004	0,004	0,187	0,321	0,430
D	0,002	0,002	0,000	0,000	0,002	0,001	0,002	0,004	0,451
E	0,045	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,002	0,002	0,390
F	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,004	0,501
G	0,000	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,004	0,006	0,513
H	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,434
PROM	0,005	0,002	0,001	0,002	0,003	0,003	0,015	0,039	0,436
DE	0,011	0,003	0,003	0,004	0,005	0,006	0,046	0,089	0,086

Figura 40

Gráfico control resultante del análisis estadístico con la Prueba de Tukey-Kramer y diferencias significativas entre las absorbancias promedio





Absorbancias promedio

control TTOimp	A	0.43607048
control TTOcos	A	0.40711065
TTO cos 8	B	0.25942354
TTO imp 8	C	0.03948727
TTO imp 7	C	0.01467805
TTO imp 1	C	0.00492361
TTO imp 5	C	0.00277182
TTO imp 6	C	0.00262412
TTO imp 2	C	0.00188218
TTO imp 4	C	0.00157387
TTO imp 3	C	0.00101737
TTO cos 5	C	0.00074620
TTO cos 2	C	0.00038539
TTO cos 3	C	0.00034767
TTO cos 4	C	0.00019614
TTO cos 6	C	0.00000564

CMI TTO nacional (TTO cos 6) = 0.031 %

CMI TTO importado (TTO imp 8) = 0.008 %



Figura 41

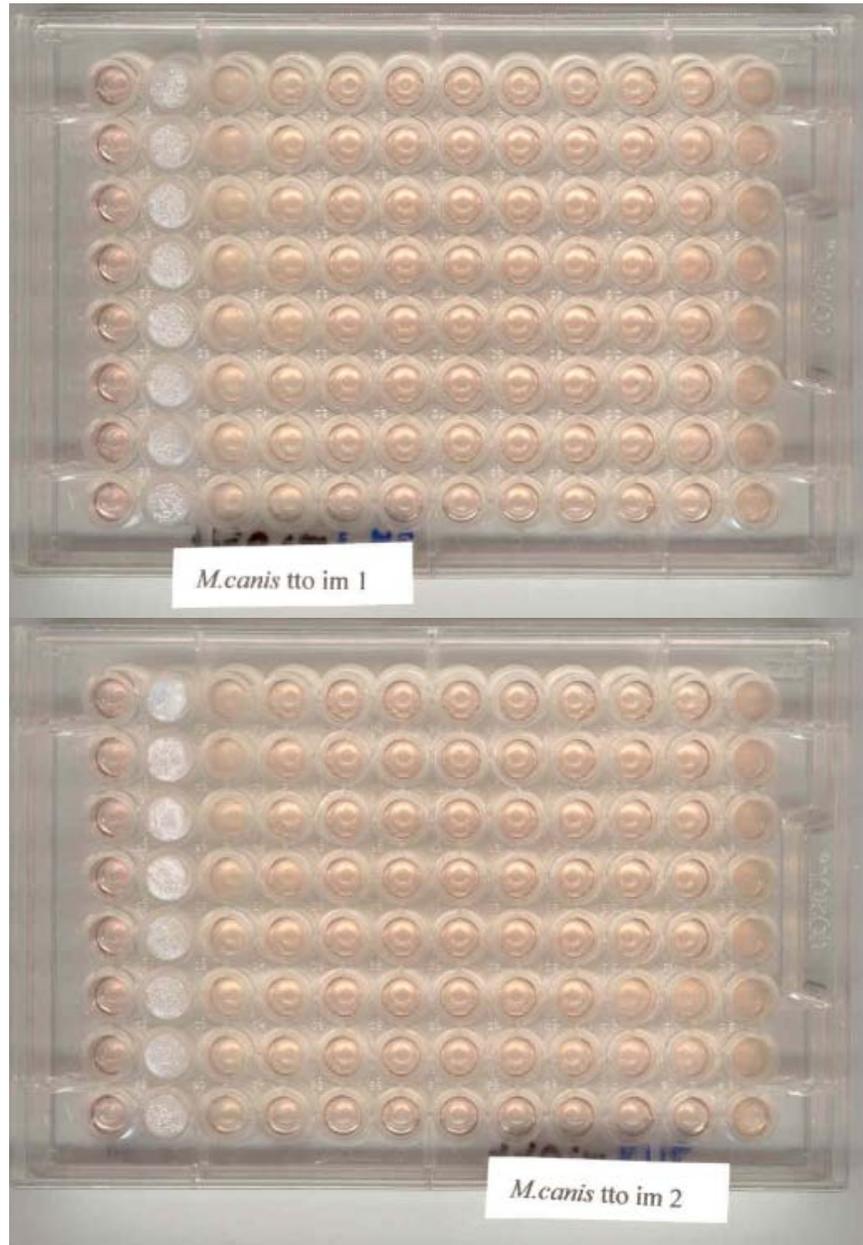




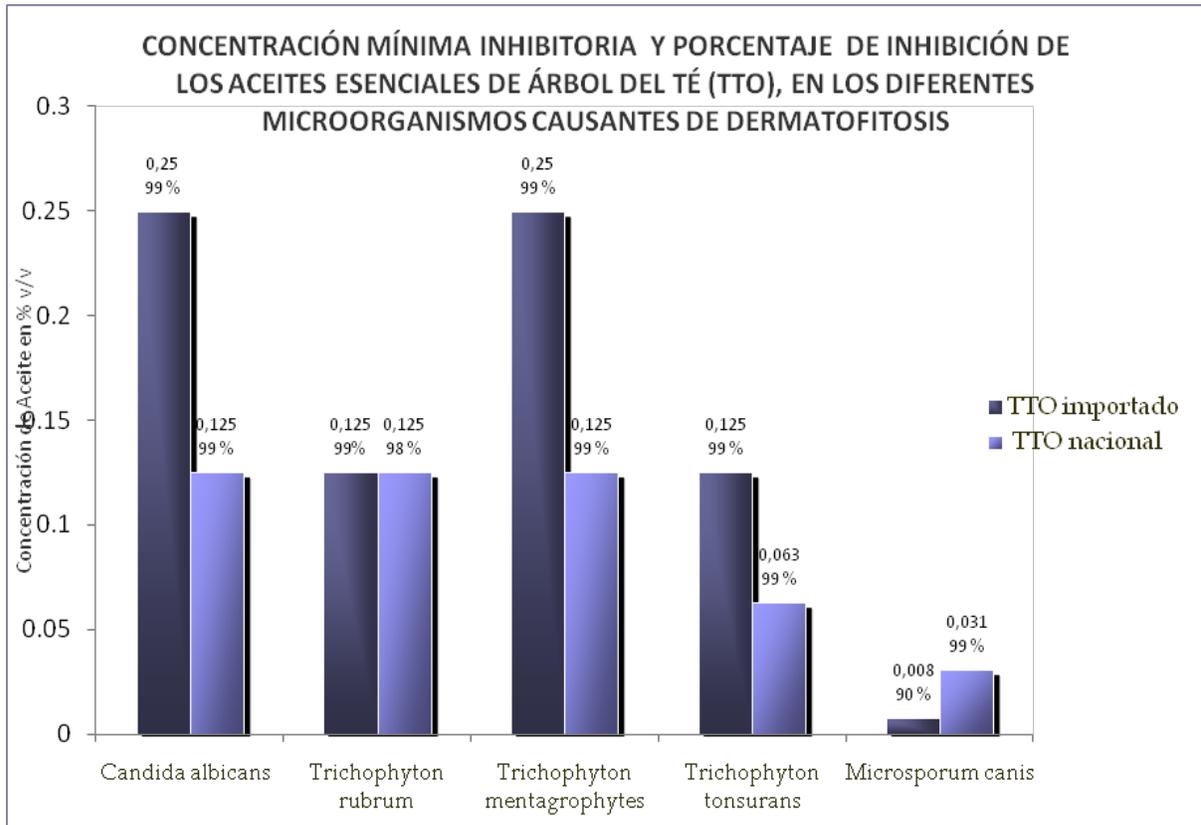
Tabla 30

Cuadro resumen de las CMI y Porcentajes de inhibición resultantes del tratamiento de los aceites esenciales del árbol del té (TTO) en las diferentes especies de microorganismos causantes de dermatofitosis

Microorganismo	Resultados	ACEITE ESENCIAL TTO	
		Nacional	Importado
<i>Candida albicans</i>	Abs control	0,60906863	0,6093611
	Abs Inhibición	0,00118964	0,00352404
	% Inhibición	99	99
	CMI (% v/v)	0,125	0,25
<i>Trichophyton rubrum</i>	Abs control	0,54390704	0,54763836
	Abs Inhibición	0.00918460	0,00071545
	% Inhibición	98	99
	CMI (% v/v)	0,125	0,125
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	Abs control	0,34610177	0,33790783
	Abs Inhibición	0.00108647	0,00148953
	% Inhibición	99	99
	CMI (% v/v)	0,125	0,25
<i>Trichophyton tonsurans</i>	Abs control	0,60693004	0,58480706
	Abs Inhibición	0,02936299	0,00036427
	% Inhibición	99	99
	CMI (% v/v)	0,063	0,125
<i>Microsporum canis</i>	Abs control	0,40711065	0,43607048
	Abs Inhibición	0.00000564	0,03948727
	% Inhibición	99	90
	CMI (% v/v)	0,031	0,008



Grafico 3



3.4.1 ANÁLISIS DEL TRATAMIENTO CON EL ACEITE ESENCIAL DEL ÁRBOL DEL TÉ (TTO)

Al tratar a los microorganismos con el aceite esencial del árbol del té, se presentó inhibición de crecimiento en todos ellos, pues las absorbancias producidas por los controles de crecimiento, resultaron ser significativamente diferentes a las absorbancias producidas por las distintas concentraciones de los antifúngicos ($p < 0.05$).

Al evaluar al aceite de TTO, proveedor nacional en *Candida albicans*, se obtuvo una CMI de 0.125 %, con una inhibición del 99 %, en cambio con el aceite de TTO de importación, la CMI fue de 0.25 %, con una inhibición del 99 %. Ambos aceites mostraron tener una alta



actividad antimicótica, sin embargo se requirió menor concentración del aceite que se comercializa en México para inhibir a *Candida albicans*. (Ver tabla 30, gráfico 3)

En la literatura se reporta que la CMI₉₀ para *Candida albicans* se encuentra a concentraciones menores a 0.5 %, lo cual coincide con lo obtenido en esta investigación. ⁽²⁶⁾

La CMI determinada para *Trichophyton rubrum* con el tratamiento TTO proveedor nacional y TTO de importación fue de 0.125 %, con una inhibición del 99% y 98 % respectivamente, de manera que para este microorganismos, los dos aceites actuaron con la misma actividad.

Al tratar a *Trichophyton mentagrophytes* con el aceite esencial del árbol de té proveedor nacional el valor de CMI fue de 0.125 % con una inhibición de 99 %, mientras que con el tratamiento del aceite esencial de importación la CMI resultante fue de 0.25 % con una inhibición de 99 %. Como se observa ambos aceites presentaron una alta actividad antimicótica, pero el aceite de proveedor nacional, requirió menor concentración para lograr el mismo efecto.

Para *Trichophyton tonsurans*, la CMI obtenida con el tratamiento del aceite esencial del árbol del té proveedor nacional fue de 0.063 %, con una inhibición del 99%, y para el aceite de importación la CMI fue de 0.125 %, con el mismo porcentaje de inhibición, por lo que se el aceite nacional, mostró tener mejor actividad a una menor concentración.

En el tratamiento de *Microsporum canis* con el aceite esencial de TTO nacional, se obtuvo un CMI de 0.031%, con una inhibición del 99%, y del tratamiento con el aceite de importación CMI fue de 0.008 % al mostrar una inhibición del 90%, en este caso el aceite de importación mostró tener buena actividad antimicótica a una menor concentración.

En la bibliografía se reportan valores de CMI al 90 %, para *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. tonsurans* y *M. canis* menores a 0.5 % de aceite, ⁽²⁸⁾ y en nuestros resultados se obtuvieron concentraciones menores a esta concentración.



De manera general se observó que para la mayoría de los microorganismos, el aceite esencial proveedor nacional fue el que presentó mayor actividad antimicótica, pues se requirió menos concentración de este aceite, en comparación con el aceite de importación para lograr una inhibición de más del 90 %. (Ver gráfica 3)

De acuerdo a los resultados obtenidos, la concentración de 0.125 % del aceite esencial de TTO, proveedor nacional, presentaría actividad antimicótica hacia todos los microorganismos probados en este estudio.

Con respecto a los aceites esenciales, se encontró que el aceite del árbol del té, fue más sencillo de trabajar, ya que al momento de preparar la serie de diluciones, se requirió menos agente tensoactivo para que el aceite se incorporara al medio de cultivo RPMI. Esto fue debido a que en su composición, aproximadamente un 50% ⁽³⁰⁾ de los componentes son terpenos oxigenados, lo que les da la propiedad, de que en su estructura tengan una parte soluble en agua y otra insoluble en agua, que son el caso de 1,8 cineol y terpipen 4-ol, que también son los principales componentes que tienen actividad antimicrobiana. El aceite de lavanda fue un poco más complicado de trabajar, pues en su composición existen componentes que son más hidrofóbicos, lo que dificultó su incorporación al medio acuoso, y al preparar la serie de diluciones se observó una emulsión más notoria a medida que se presentaba mayor concentración de aceite esencial. (Ver figura 42)

Figura 42

Emulsión formada por al adición del tween 80 en las diluciones de mayor concentración de aceite esencial de lavanda.

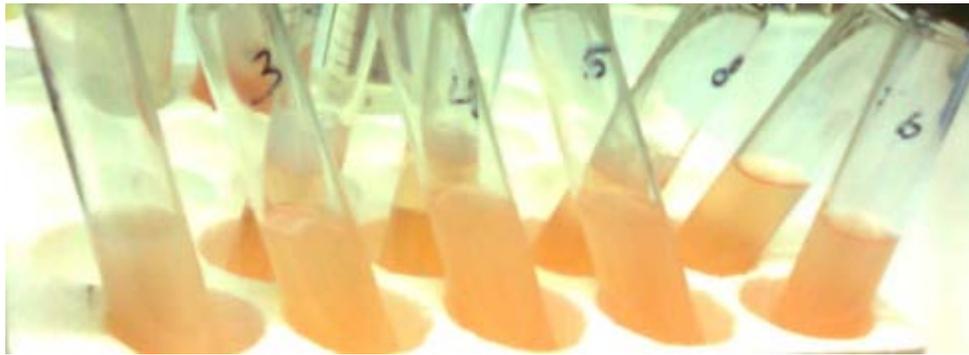




La interferencia de la turbidez, sólo se observó en los carriles 3 y 4 (concentración final de 2 y 1 %) pues en las demás concentraciones requirieron menos cantidad de emulsificante. (Ver figura 43)

Figura 43

Distintas diluciones preparadas para el llenado de placas del antifúngico aceite esencial de lavanda



Cabe mencionar que en nuestro estudio los microorganismos de mayor interés fueron los dermatofitos (hongos filamentosos), sin embargo, se trabajó con *Candida albicans*, ya que ocupa un lugar importante dentro de los agentes causales de dermatofitosis; así como en las consultas dermatológicas que asisten al INP, en casos de onicomicosis en adolescentes, para lo cual proponemos el uso de los aceites esenciales en otros padecimientos causados por este levaduriforme.



CONCLUSIONES



- Se determinaron las Concentraciones Mínimas Inhibitorias de los dos tipos de aceites esenciales de lavanda y árbol del té, en cada uno de los principales agentes etiológicos causantes de dermatofitosis, lo que permitió demostrar su actividad antimicótica ante dichos agentes etiológicos.
- Los aceites con mayor actividad antimicótica fueron: aceite esencial de lavanda de importación y el aceite esencial del árbol del té (TTO) proveedor nacional. Esto debido a que mostraron tener una mayor actividad a una menor concentración, ante todos los microorganismos.
- Se propone que la concentración final de los aceites que formarán parte de una forma farmacéutica de administración tópica sea de 0.125 %, pues de acuerdo a los resultados obtenidos, a esta concentración se inhibe a más de un 90 % a los agentes etiológicos estudiados.
- Para estudios posteriores sería necesario realizar pruebas de irritabilidad en piel, en donde se compruebe que las concentraciones propuestas en este estudio, no causan algún evento adverso, y de esta manera puedan ser utilizados como una alternativa en el tratamiento de las dermatofitosis.



- 1.- Padilla M. C. Micosis Superficiales. Rev. Fac. Med. UNAM. 2003; 46: 134-137.
- 2.- Bonifaz A. Micología Médica Básica. 3 Ed. México: McGraw Hill; 2010: 59-97.
- 3.- Bonifaz A., López R., Padilla M.C. 1er Consenso Micosis Superficiales. Dermatología Rev. Mex. 1999; 43: 80-88.
- 4.- Fernández B. Sensibilidad antifúngica de los dermatofitos. [tesis doctoral]. España: Universidad de Rovira i Virgili; 2005, [Citada 2009 Noviembre 05]; Disponible en: www.tdr.cesca.es/...//TesisdoctoralporBelkysFernandez-Torres.pdf
- 5.- Emmons C.W. Dermatophytes: Natural grouping based on the form of the spores and accessory organs. Arch. Derm. Syphilol.. 1934; 30: 337-362.
- 6.- Arenas R., Bonifaz A., López Martínez. Dermatofitosis en México. Rev. Iberoam. Micol. 2002; 19: 63-67.
- 7.- Hernández A., Carvajal P., Fernández R., Arenas R. Dermatofitos por *Trichophyton rubrum*. Experiencia de 10 años (1996-2005) en un servicio de dermatología de un hospital general de la Ciudad de México. Rev. Iberoam. Micol. 2007; 24: 122-124.
- 8.- García A., Carrillo F.G., Chávez S., Mayorga J. Micosis más frecuentes en pediatría. Dermatología Rev. Mex. 1999; 43(supl): 6-9.
- 9.- Arenas R., Bonifaz A., López R. 1er Consenso Micosis Superficiales. 1999 Dermatología Rev, Mex. 1999; 43: 80-88.
- 10.- Arenas R., Bonifaz A., López R., Estrada R., Revisión del 1er Consenso Nacional de Prevención, diagnóstico, y tratamiento de micosis superficiales. Fac.Med. UNAM, 2001: 1 - 64.
- 11.- Vázquez E., Arenas R. Onicomycosis en niños. Estudio retrospectivo de 233 casos mexicanos. Gac. Med. Mex. 2008; 144: 7-10.
- 12.- Villanueva J., Arenas R. Onicomycosis en niños: estudio en una población mexicana. Dermatol. Pediatr. Lat. 2006; 4: 197-203.
- 13.- Bonifaz A., Saul A., Mena C., Valencia A., Paredes V., et al. Dermatophyte onychomycosis in children under 2 years of age: experience of 16 cases. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. 2007; 21: 115-117.
- 14.- Rosentein S.E. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. 52ª Ed. Ediciones PLM, México D.F., 2006
- 15.- Gupta A.K. Therapies for onychomycosis. Dermtol. Clin. 2006; 24: 375-379.



- 16.- Méndez L., Manzano P., Velásquez V., Millan B., Hernández F., Mondragón R., et al. Resistencia a compuestos azólicos de aislamientos clínicos de *Trichophyton* spp. *Rev Iberoam Micol.* 2007; 24, pp. 120-123.
- 17.- Pfaller M., Chaturvedi V., Espinel A., Ghannoum M., Gosey L., Odds F., et al. M38-A: Referente Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi ; Approved Standard. NCCLS; 2002
- 18.- Gupta A.K, Cooper E.A., Ginter G. Efficacy and safety of itraconazole use in children. *Dermtol. Clin.* 2003; 21: 521-535.
- 19.- Gupta A.K, Skinner A.R., Baran R. Onychomycosis in children: an overview. *J. Drugs Dermatol.* 2003; 2: 31-34.
- 20.- Altman P. Australia tea tree oil. *Aust. J. of Pharm.* 1988; 69: 276-278.
- 21.- Carson C.F., Hammer K.A., Riley T.V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006; 19: 50-62.
- 22.- Cawley L., Phillips C. *in vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against bacterial and *Candida* spp. isolates from clinical specimens. *Br. J. Biomed. Sci.* 2001; 58: 139-145.
- 23.- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. Susceptibility of transient and commensal skin flora to the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *AJIC.* 1996; 24: 186-189.
- 24.- Carson C.F., Hammer K.A., Riley T.V. Susceptibility of *Propionibacterium acnes* to the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. *Letters Appl. Microbiol.* 1994; 19: 24-25.
- 25.- Carson C.F., Hammer K.A., Riley T.V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil: a Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. . 2006; 19: 50-62.
- 26.- Hammer K.A, Carson C.F., Riley T.V. *In vitro* activity of essential oil, in particular *Melaleuca alternifolia* (tea-tree) oil and tea tree oil products, against *Candida* spp. *J. Antimicrob. Chemother.* 1998; 42: 591-595.
- 27.- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. *In vitro* Activities of Ketoconazol, Econazol, Miconazol, and *Melaleuca alternifolia* (tea-tree oil) against *Malassezia* Species. *Anticrop. Agents Chemother.* 2000: 467-469.
- 28.- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. *In vitro* Activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) against dermatophytes and other filamentous fungi. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002; 50: 195-199.
- 29.- Home L., Leach D., Lea D., Lee L. Natural Variation in the essential oil content of *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae). *Biochem. Sistem. Ecol.* 2000; 28: 367-382.



- 30.- Cox S., Mann C., Markham J. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. J. Appl. Microbiol. 2001; 9: 492-497.
- 31.- Cox S., Mann C., Markham J., Gustafson J., Warmington J., Grant S. Determining the Antimicrobial Actions of Tea Tree Oil. Molecules. 2001; 6: 87-91.
- 32.- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V. Antifungal effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and its components on *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Saccharomyces cerevisiae*. J. Antimicrob. Chemother. 2004; 53: 1081-1085
- 33.- Burke J., Lee N., Shapiro I. Respiratory inhibition of isolated rat liver mitochondria by eugenol. Arch. Oral Biol. 1979; 24: 565-568.
- 34.- Auria D., Laino L., Strippoli V., Tecca M., Salvatore G., Battinelli L., et al. *In vitro* activity of tea tree oil against *Candida albicans* mycelial conversion and other pathogenic fungi. J. Chemother. 2001; 13: 377-383.
- 35.- Hammer K.A., Carson C.F., Riley T.V.. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. Rev. Med. Micol. 2000; 38: 355-362.
- 36.- Buck D., Nidorf D., Addino J. Comparison of two topical preparations for the treatment of onychomycosis: *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and clotrimazole. J. Fam. Pract. 1994; 38: 601-605.
- 37.- Satchell A., Saurajen A., Bell C., Barnetson R. Treatment of interdigital tinea pedis with 25% and 50% tea tree oil solution: a randomized, placebo controlled, blinded study. Australian J. Dermatol. 2002; 43: 175-178.
- 38.- Hausen B., Evaluation of the main contact allergens in oxidized tea tree oil. Dermatitis. 2004; 15: 213-215.
- 39.- Brophy J., Davies N., Southwell I., Stiff I., Williams L. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). Journal Agric. Food Chem. 1989; 37: 1330-1335.
- 40.- Terzi V., Morcia C., Faccioli P., Valé G., Tacconi G., Malnati M. *In vitro* antifungal activity of tea tree (*Melaleuca alternifolia*) essential oil and its major components against plant pathogens. The society Appl. Microbiol. 2007; 44: 613-618.
- 41.- Cavanagh H., Wilkinson J. Biological activities of lavender essential oil. Phytother. Res 2002; 16: 301-308.
- 42.- Auria D., Tecca M., Strippoli V. Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans* yeast and mycelia form. Med Micol. 2005; 43: 391-396.



- 43.- Tulio V., Nostro A., Mandras N., Dugo P., Banche G. Antifungal activity of essential oils against filamentous fungi determined by broth microdilution and vapour contact methods. *J. Appl Microbiol.* 2007; 102: 1544-1550.
- 44.- Sköld M., Hagvall L., Karlberg A. Autoxidation of linalyl acetate, the main component of lavender oil, creates potent contact allergens. *Contact Dermatitis.* 2007; 58: 9-14.
- 45.- Sheehan D., Brown S., Pfaller M., Warnock D., Rex J., Chaturvedi V., et al. M44-A: Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeast; Approved Guideline. NCCLS, 2004; 24.
- 46.- Cermeño J., Torres J. Sensibilidad de hongos miceliares dermatofílicos a diez antifúngicos empleando un método de difusión en agar. *Rev. Iberoam. Micol.* 2001; 18: 113-117.
- 47.- Bonifaz A., Muñoz MJ., Monge B. Estudio de la Actividad “*in vitro*” de la alicina (principio activo del ajo) en el tratamiento de tiñas del cuerpo e inguinal. *Dermatología Rev. Med.* 1999; 34: 199-204.
- 48.- Pfaller M.A., Chaturvedi A., Espinel A., Ghannoum M.A., Gosey L.L., Odds F.C. M27-A2: Referente Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. NCCLS. 2002; 22.
- 49.- Loop C., Pujol I., Aguilar C., Salas J., Riba D., Guarro J. Comparison of Three Methods of Determining MICs for Filamentous Fungi Using Different End Point Criteria and Incubation Periods. *Antimicrob. Agent. Chemother.* 2000; 44: 239-242.
- 50.- Díaz M.C. Antifungigrama: Detección e interpretación de resistencia [presentación en internet]. Chile. ICBM, Facultad de Medicina Universidad de Chile. 2008. [citada 2009 Nov 25]. Disponible desde: www.sochinf.cl/documentos/micro2008/ATF_08_Sochinf.pdf?...
- 51.- Fernandez B., Cabañes F.J., Carrillo A.J., Esteban A., Inza I., Abarca L., et al. Collaborative Evaluation of Optimal Antifungal Susceptibility Testing Conditions for Dermatophytes. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 3999-4003.
- 52.- Santos D.A., Hamdan J.S. Evaluation of Broth Microdilution Antifungal Susceptibility Testing Conditions for *Trichophyton rubrum*. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43: 1917-1920.
- 53.- Guarro J., Llop C., Aguilar C., Pujol I. Comparison of *in vitro* Antifungal Susceptibilities of Conidia and Hyphae of Filamentous Fungi. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 1997; 41: 2760-2762.
- 54.- Santos D.A., Barros M.E.S., Hamdan J.S. Establishing a Method of Inoculum Preparation for Susceptibility Testing of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 98-101.



- 55.- Espinel A., Kerkering T.M. Spectrophotometric method of Inoculum Preparation for the *in vitro* Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. J. Clin. Microbiol. 1991; 29: 393-394.
- 56.- Simas F., Gomes P.F., Lyra L. Zaninelli A. Preanalytical conditions for broth microdilution antifungal susceptibility of *Microsporum* spp. Journal Compilation. 2008; 51: 313-317.
- 57.- Norris H., Elewski E., Ghannoum M. Optimal growth conditions for the determination of the antifungal susceptibility of three species of dermatophytes with the use of a microdilution method. J. Am. Acad. Dermatol. 1999; 40: S9-S13.
- 58.- Griffin S.G., Markham J.L., Leach D.L. An agar dilution method for the determination of the minimum inhibitory concentration of essential oils. J. Essent. Oil Res. 2000; 12: 249-250.
- 59.- Cantón E., Martín E., Espinel A., Pruebas estandarizadas para el estudio de la sensibilidad a los antifungicos. Método de microdilución para hongos filamentosos (M27-A) y (M38-P). Rev. Iberoam. Micol. 2001; 84-607 - 3050-6.
- 60.- Perea S, Annette W., Deanna A. Comparasion of *in vitro* Activities of Voriconazole and five Established Antifungal Agents against Differents species of Dermatophytes Using a Broth Macrodilution Method. J. Clin. Microbiol. 2001; 385-388.



APÉNDICES



APÉNDICE 1. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO Y SOLUCIONES.

1.1.- AGAR DEXTROSA PAPA (AGAR PAPA GLUCOSADO)

Composición:

Infusión de patata.....4.0g (Infusión de 200g de papa)

D(+) glucosa..... 20.0g

Agar-agar15.0g

Agua1 L

Disolver 39g de medio en 1L de agua destilada, calentar en un baño de agua hasta observar la completa disolución, y esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121°C.

1.2.- AGAR DEXTROSA SABOURAUD

Composición:

Concentrado enzimático de caseína..... 10.0g

Dextrosa..... 40.0g

Agar.....15.0g

Agua.....1 L

Suspender 65g del polvo en 1L de agua destilada. Mezcle bien, caliente sobre la flama del mechero directamente y agite frecuentemente para favorecer la disolución del medio. Una vez disuelto el medio, mantenga a ebullición constante durante un minuto para disolver el polvo. Esterilizar por autoclave a 121°C durante 15 minutos.

1.3.- AGAR MYCOSEL

Composición:

Dextrosa.....10.0g

Agar..... 10.0g

Ciclohexamida.....0.4g

Cloranfenicol.....0.05g

Agua.....1 L

Suspender 36g del polvo en 1L de agua destilada. Mezclar bien para permitir la humectación del polvo. Calentar de manera directa sobre la flama del mechero, y agitar frecuentemente hasta disolver completamente el polvo. Esterilizar por autoclave a 118°C por 15 minutos.



1.4.- AGAR PAPA-ZANAHORIA

Composición:

Pulpa de zanahoria.....	20g
Pulpa de papa.....	15g
Agar.....	20g
Agua destilada.....	1L

Pelar y pesar las papas y zanahorias, sumergirlas en un recipiente con agua por una hora, triturar estas en un mortero y calentar la mezcla obtenida por cinco minutos, dejar enfriar y filtrar por una gasa, adicionar al filtrado el agar y aforar a un litro con agua destilada. Esterilizar por autoclave por 15 minutos a 121 °C.

1.5.- MEDIO BIRELLI

Composición:

Harina de trigo.....	14g
Leche en polvo.....	14g
Miel.....	7g
Agar.....	20g
Agua destilada.....	1L

Adicionar la leche en polvo a una porción del agua destilada y agitar hasta homogenizar, después adicionar la harina de trigo y al final la miel, calentar por 5 minutos con agitación constante para tratar de incorporar todos los ingredientes, dejar enfriar y después filtrar la mezcla a través de una gasa. Agregar al filtrado el agar y realizar el aforo con agua destilada. Esterilizar por autoclave a 110 °C por 10 min.



1.6.- MEDIO RPMI 1640 (Con glutamina, sin bicarbonato y con indicador rojo de fenol)

Composición:

MOPS (3-(N-morfolino) ácido propanelsulfónico) en una concentración final de 0.165ml/L.....34.5g
Glucosa.....20g
RPMI.....10.5g
Agua destilada.....1L
pH: 7.0 ± 0.1 a 25°C

Para 1.5L de medio:

Composición:

MOPS (3-(N-morfolino) ácido propanelsulfónico) en una concentración final de 0.165ml/L..... 51.75g
Glucosa.....30g
RPMI.....15.75g
Agua destilada.....1.5L
pH: 7.0 ± 0.1 a 25°C

Agregar poco a poco el medio RPMI en polvo en 500mL de agua destilada en agitación, una vez adicionado el medio, agregar la glucosa y por último el MOPS. Una vez disueltos los tres polvos adicionar 125mL de agua destilada y mantener en agitación por algunos minutos. Medir pH potenciometricamente y llevar a pH 7.0 con hidróxido de sodio 7N. Añadir los 125 mL de agua restantes y medir nuevamente el pH y llevar nuevamente a pH 7.0. Esterilizar por filtración con membrana de 0.22µ de poro y depositar el medio en frascos de plástico estériles y envolver estos con papel aluminio, mantienen el medio a 4°C.

Para asegurar la esterilidad del medio, tomar una alícuota y depositarla en un tubo con tapa estériles, e incubarlo a 37 °C por 24 h, y monitorear por dos días más a temperatura ambiente.



Tabla 1
Composición del medio en polvo RPMI 1640 (Con glutamina, sin bicarbonato y con indicador rojo de fenol)

Constituyente	g/L Agua	Constituyente	g/L Agua
L-arginina (base libre)	0.200	Biotina	0.0002
L-asparagina anhidra	0.050	D- pantonetico	0.00025
L- ácido aspartico	0.020	Colina Clorhidrato	0.003
L- cistina • 2HCl	0.0625	Ácido fólico	0.001
L- ácido glutámico	0.020	Mioinositol	0.035
L- glutamina	0.300	Niacinamida	0.001
Glucina	0.010	PABA	0.001
L-histidina(base libre)	0.015	Piridoxina HCl	0.001
L- hidroxiprolina	0.020	Riboflavina	0.0002
L- isoleucina	0.050	Tiamina HCl	0.001
L- leucina	0.050	Vitamina B ₁₂	0.000005
L-lisina •HCl	0.040	Nitrato de calcio H ₂ O	0.100
L- metionina	0.015	Cloruro de potasio	0.400
L - felinalanina	0.015	Sulfato de magnesio anhidro	0.04884
L- prolina	0.020	Cloruro de sodio	6.000
L- serina	0.030	Fosfato dibásico de sodio anhidro	0.800
L- tirosina	0.020	D- glucosa	2.000
L- triptófano	0.005	Glutation reducido	0.001
L- tirosina •2Na	0.02883	Rojo de fenol, Na	0.0053
L- valina	0.020		

1.7.- PREPARACIÓN DEL ESTÁNDAR DE Mc FARLAND 0.5.

Estándar preparado a partir de la reacción de precipitación entre cloruro de bario 0.048 M (BaCl_2) y ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 1% v/v para producir sulfato de bario. (BaSO_4).

Preparación de BaCl_2 0.048 M:

$$5\text{mL} (0.048\text{moles BaCl}_2 / 1000\text{mL}) * (244.28 \text{ g} / 1\text{mol BaCl}_2) = 0.059 \text{ g BaCl}_2$$

Preparación de H_2SO_4 al 1% v/v

$$1\text{mL} / 100\text{mL agua} = 1\%$$



Se adicionaron 0.5 mL de BaCl_2 0.048M y 9.5mL de H_2SO_4 al 1% aun tubo de ensaye, se agitó con un Vortex y se verificó su densidad óptica a una longitud de onda de 625 nm que se debía encontrar entre el rango de 0.08-0.10, y se mantuvo protegido al paso de la luz.



APÉNDICE 2. FORMAS MACROCOSCÓPICA Y MICROSCÓPICAS DE LOS DERMATOFITOS Y LEVADURAS.

2.1.- *Trichophyton rubrum*



Figura 1

Trichophyton rubrum variante vellosa, en medio de cultivo agar dextrosa papa.

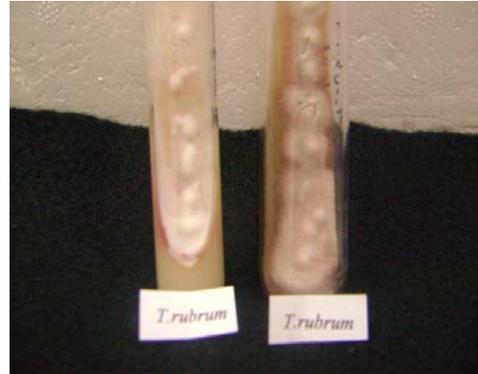


Figura 2

Trichophyton rubrum variante vellosa, en medio de cultivo Borelli (izquierda) y en agar dextrosa papa (derecha).

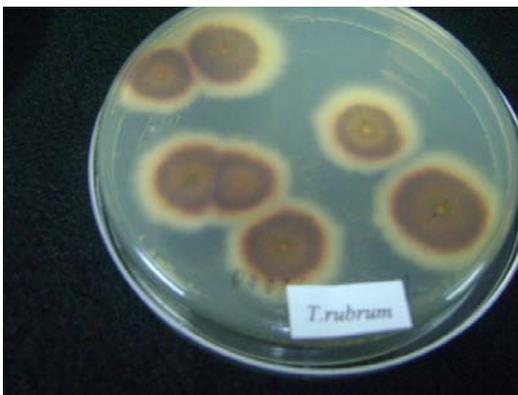


Figura 3

Trichophyton rubrum variante vellosa, en medio de cultivo agar dextrosa Sabouraud.

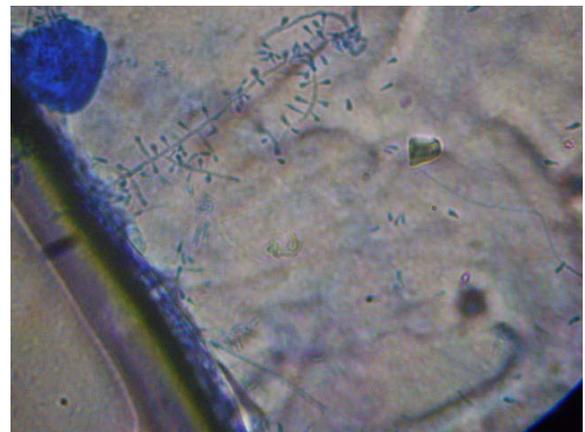


Figura 4

Trichophyton rubrum variante, vellosa. Microconidios alternados (40x).



2.2.- *Trichophyton tonsurans*

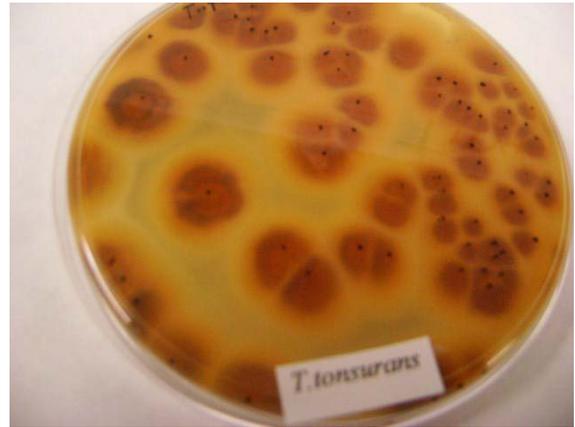
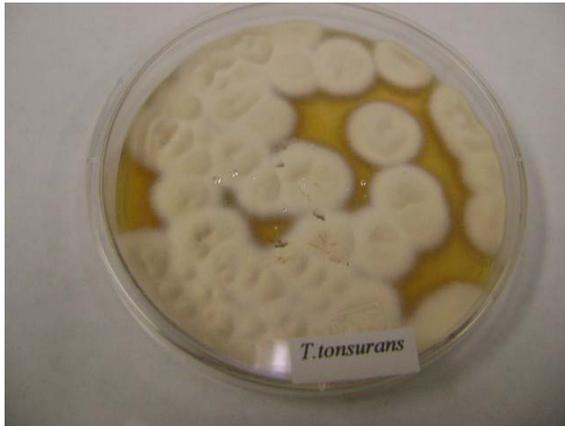


Figura 5 y 6
Trichophyton tonsurans en medio de cultivo
agar dextrosa Saburaud.

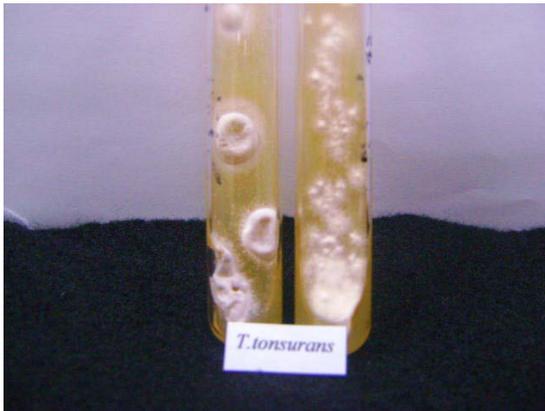


Figura 7
Trichophyton tonsurans en medio
de cultivo agar dextrosa papa.

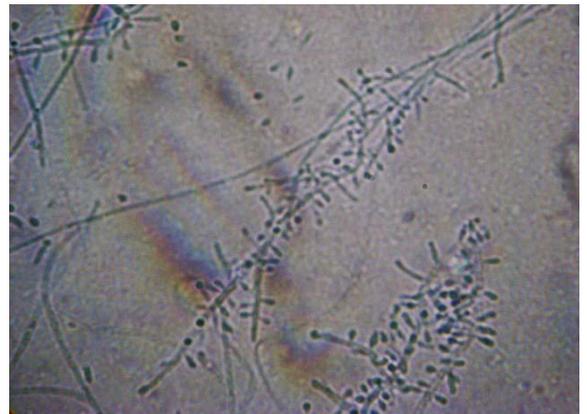


Figura 8
Trichophyton tonsuran. Micoconidios
en forma de cruz de Lorena. (40x).



2.3. *Trichophyton mentagrophytes*



Figura 9
Trichophyton mentagrophytes en medio
agar dextrosa papa.



Figura 10
Trichophyton mentagrophytes en medio
dextrosa Sabouraud.

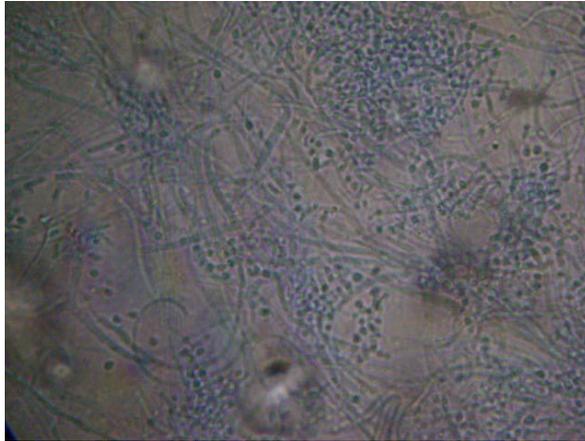


Figura 11
Trichophyton mentagrophytes. Abundantes
microconidios libres redondeados (40x).

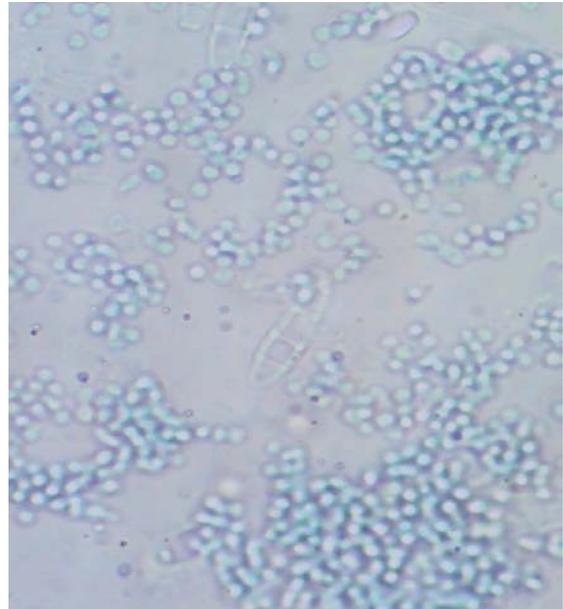


Figura 12
Trichophyton mentagrophytes. Abundantes
microconidios redondeados y sueltos (100x).



2.4.- *Microsporium canis*



Figura 13
Microsporium canis. En medio de cultivo Borelli.

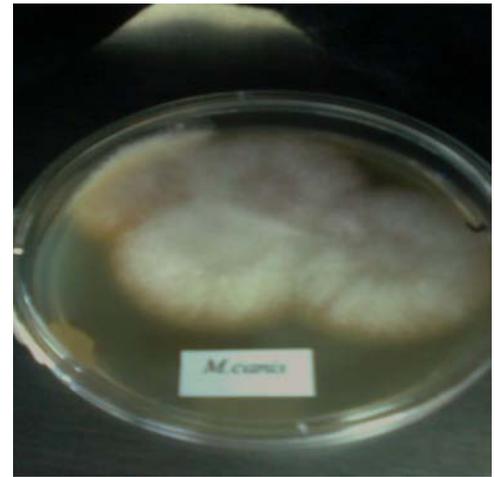


Figura 14
Microsporium canis. En medio agar dextrosa Sabouraud.

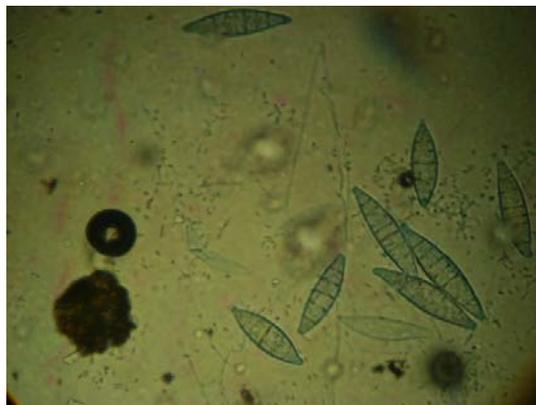


Figura 15
Microsporium canis. Macroconidios con más de 6 septos (40x).

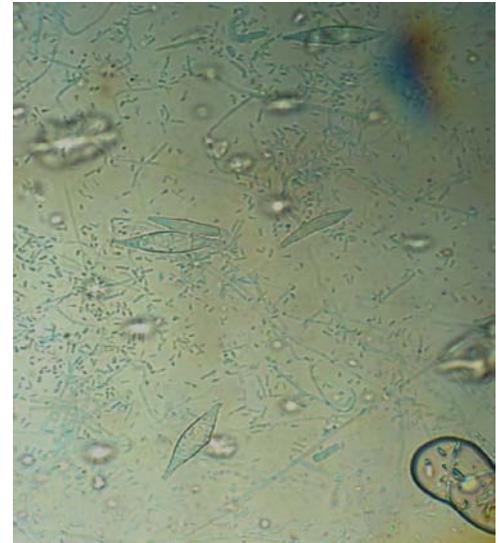


Figura 16
Microsporium canis. Macroconidios y microconidios (40x).



2.5.- *Microsporium gypseum*



Figura 17
Microsporium gypseum.



Figura 18
Macroconidios de *Microsporium gypseum*.

2.6.- *Epidermophyton floccosum*



Figura 19
Epidermophyton floccosum.

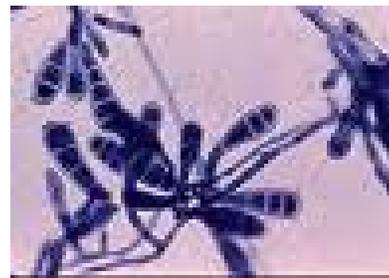


Figura 20
Macroconidios de *Epidermophyton floccosum*.

2.7.- *Candida albicans*



Fig. 21
Candida albicans en medio de cultivo
agar dextrosa Sabouraud.



2.8.- *Candida krusei* ATCC 6258



Fig. 22
Candida krusei ATCC 6258 en medio de cultivo agar dextrosa Sabouraud.



APÉNDICE 3. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DE LOS ACEITES ESENCIALES Y ESENCIAS DE LAVANDA Y ÁRBOL DEL TÉ CONTRA *Trichophyton rubrum*.

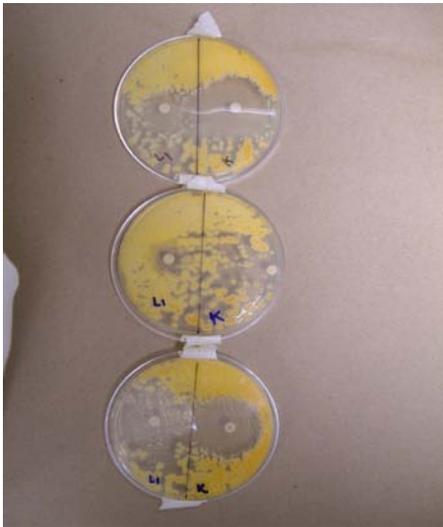


Figura 1

Halos de inhibición de crecimiento de *Trichophyton rubrum* por el aceite esencial de lavanda de importación y ketoconazol.

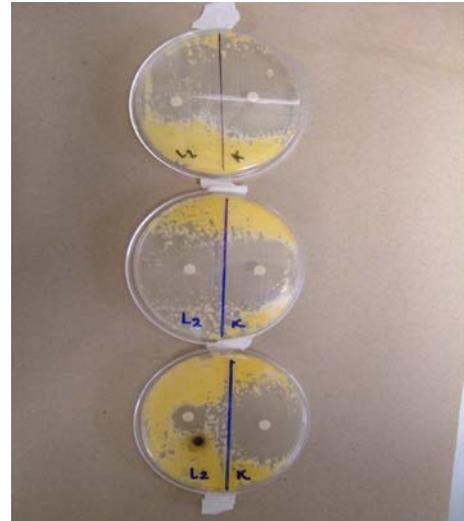


Figura 2

Halos de inhibición de crecimiento de *Trichophyton rubrum* por el aceite esencial de lavanda proveedor nacional y ketoconazol.

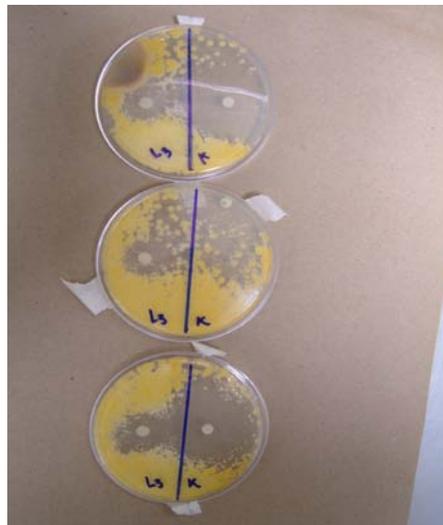


Figura 3

Halos de inhibición de crecimiento de *Trichophyton rubrum* por la esencia de lavanda y ketoconazol.



Tabla 1
Diamétros de halos de inhibición de crecimiento de *Trichophyton rubrum* por los diferentes aceites de lavanda.

	Placa 1 halos (mm)	Placa 2 halos (mm)	Placa3 halos (mm)
Aceite esencial lavanda (importado)	11	19	10
Ketoconazol	37	35	38
Aceite esencial lavanda (proveedor nacional)	12	15	14
Ketoconazol	41	Sin lectura*	40
Esencia lavanda	8	17	12
Ketoconazol	Sin lectura*	33	30

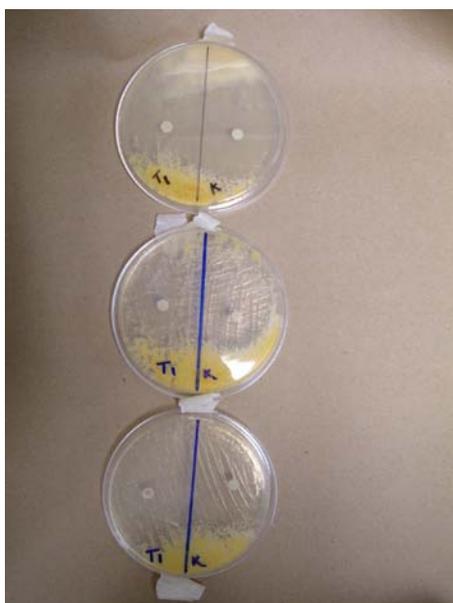


Figura 4

Halos de inhibición de crecimiento de *Trichophyton rubrum* por el aceite esencial de árbol del té (TTO) de importación y ketoconazol.

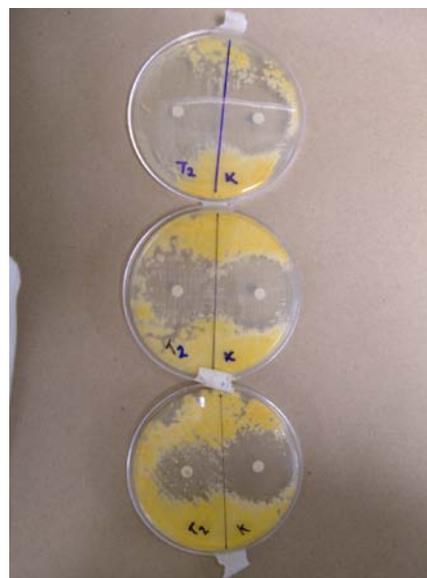


Figura 5

Halos de inhibición de crecimiento de *Trichophyton rubrum* por el aceite esencial del árbol del té proveedor nacional y ketoconazol.

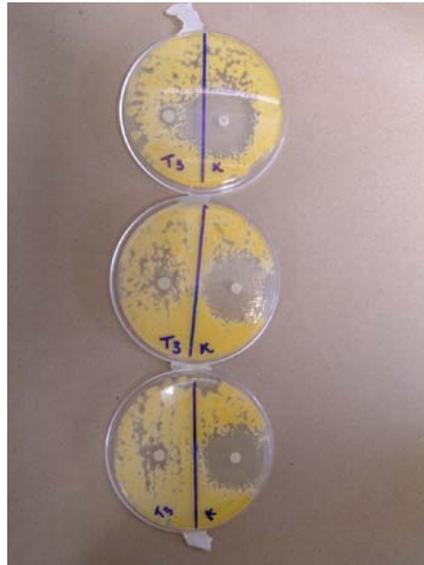


Figura 6

Halos de inhibición de crecimiento de *Trichophyton rubrum* por la esencia del árbol del té (TTO) y ketoconazol.

Tabla 2

Diámetros de halos de inhibición de crecimiento de *Trichophyton rubrum* por los diferentes aceites de árbol del té.

	Placa 1 halos (mm)	Placa 2 halos (mm)	Placa3 halos (mm)
Aceite esencial árbol del té (importado)	13	13	15
Ketoconazol	25	22	28
Aceite esencial árbol del té (proveedor nacional)	5	5	6
Ketoconazol	26	25	29
Esencia árbol del té	5	10	5
Ketoconazol	18	17	24

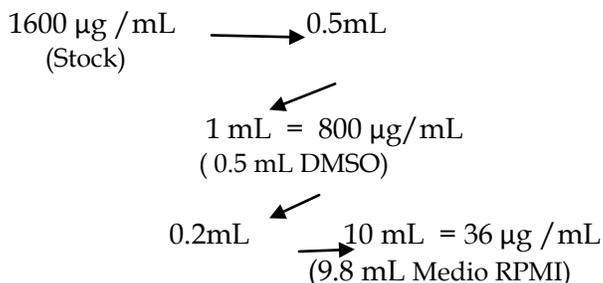


APÉNDICE 4. CÁLCULOS

4.1.- Preparación de la solución stock de Ketoconazol

$$(16 \text{ mg ketoconazol} / 10 \text{ mL de DMSO}) * (1000 \mu\text{g} / 1\text{mg}) = 1600 \mu\text{g} / \text{mL}$$

4.2.- Cálculo de la primer dilución de ketoconazol



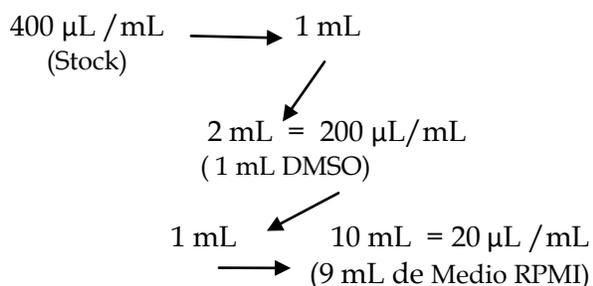
Este cálculo aplica para las demás diluciones.

4.3.- Preparación de la solución stock de los aceites esenciales de lavanda y árbol del té proveedor nacional y de importación para ser utilizados en *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* y *Microsporum canis*.

$$(2.4 \text{ mL de aceite} / 6\text{mL}) * (1000 \mu\text{L} / \text{mL}) = 400 \mu\text{L} / \text{mL}$$

(3.6 mL de DMSO)

4.4.- Cálculo de las diluciones de aceites esenciales de lavanda y árbol del té proveedor nacional y de importación para ser utilizados en *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton tonsurans* y *Microsporum canis*.



$$(20 \mu\text{L} / \text{mL}) * (1 \text{ mL} / 1000 \mu\text{L}) * 100\% = 2\% \text{ v/v}$$

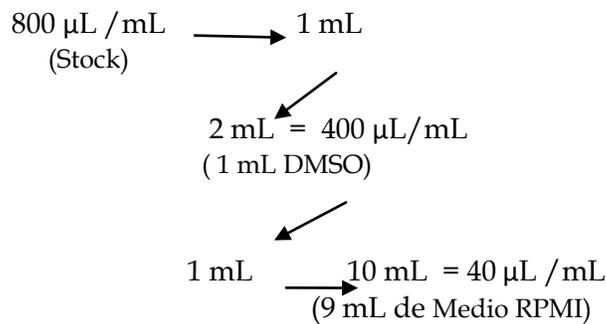


Los mismos cálculos aplican para las demás soluciones.

4.5- Preparación de la solución stock de los aceites esenciales de lavanda y árbol del té proveedor nacional y de importación para ser utilizados en las especies de *Candida*.

$(3.2 \text{ mL de aceite} / 4 \text{ mL}) * (1000 \text{ } \mu\text{L} / 1\text{mL}) = 800 \text{ } \mu\text{L} / \text{mL}$
(0.8 mL de DMSO)

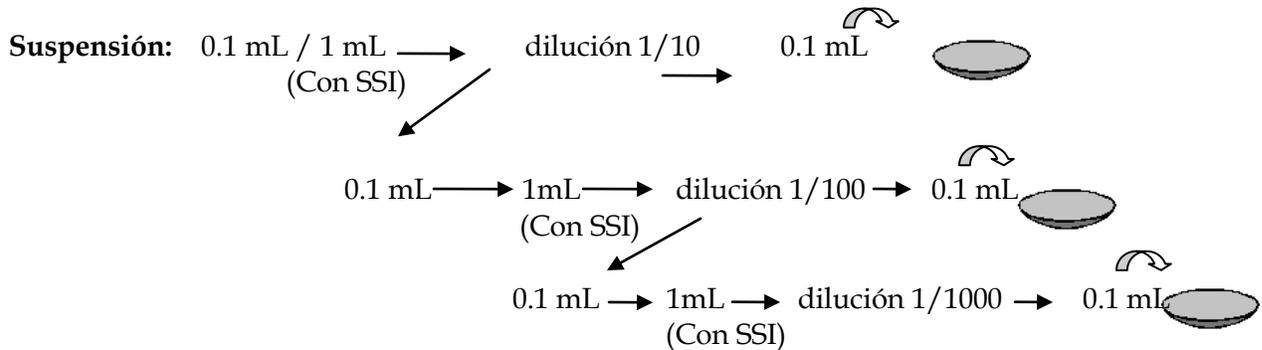
4.6.- Cálculos de las diferentes diluciones de aceites esenciales de lavanda y árbol del Té proveedor nacional y de importación para ser utilizados en *Candida albicans*.



$(40 \text{ } \mu\text{L} / \text{mL}) * (1 \text{ mL} / 1000 \text{ } \mu\text{L}) * 100\% = 4 \text{ } \% \text{ v/v}$

Estos cálculos aplican para las demás soluciones.

4.7.- Cálculo de la concentración inicial de UFC/mL en las suspensiones de microconidios.



Concentración de UFC/mL en la suspensión de microconidios = UFC * Factor de dilución (FD)

FD = aforos / alícuotas

UFC / mL en la dilución 1/10 = UFC * (1 mL) / (0.1mL * 0.1 mL)

UFC / mL en la dilución 1/100 = UFC * (1 mL * 1mL) / (0.1mL * 0.1 mL * 0.1 mL)



UFC /mL en la dilución 1/1000 = UFC * (1 mL * 1mL* 1mL) / 0.1mL * 0.1 mL* 0.1 mL * 0.1 mL)

Ejemplo:

Concentración de UFC/mL obtenida en la suspensión de microconidios en *Trichophyton rubrum*.

Dilución 1/ 100 las UFC en placa fueron 68
 $68 \text{ UFC} \times ((1 \text{ mL} * 1 \text{ mL}) / (0.1\text{mL} * 0.1 \text{ mL} * 0.1 \text{ mL})) = 6.8 \times 10^4 \text{ UFC/mL}$

4.8. Preparación de suspensión de microconidios para ser inoculas en las placas de microtiter.

Suspensión de microconidios → 1/ 10 con RPMI → 0.1 mL → 0.2 mL
 (El inoculo se diluye a la mitad)

4.9. Corrección de absorbancias en las placas de microtiter .

Tabla 1

ABSORBANCIAS PRODUCIDAS EN PLACA 1 DEL TRATAMIENTO CON KETOCONAZOL EN <i>Candida albicans</i>												
COLUMNAS FILAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.069	0.100	0.281	0.436	0.426	0.429	0.445	0.453	0.492	0.426	0.466	0.346
B	0.081	0.098	0.371	0.342	0.388	0.402	0.401	0.395	0.416	0.379	0.419	0.482
C	0.082	0.106	0.338	0.323	0.367	0.372	0.345	0.314	0.366	0.359	0.404	0.498
D	0.083	0.096	0.343	0.309	0.371	0.368	0.350	0.352	0.362	0.344	0.413	0.503
E	0.081	0.101	0.390	0.350	0.353	0.364	0.341	0.362	0.342	0.375	0.405	0.497
F	0.080	0.112	0.415	0.343	0.368	0.371	0.354	0.383	0.376	0.350	0.388	0.476
G	0.080	0.100	0.443	0.356	0.424	0.439	0.433	0.385	0.394	0.390	0.433	0.498
H	0.066	0.096	0.391	0.414	0.484	0.479	0.481	0.463	0.544	0.474	0.524	0.571

Columna 1, lecturas de absorbancia del control de esterilidad (medio RPMI)

Ejemplo: 0.100 - 0.069 = 0.031

Tabla 2

ABSORBANCIAS CORREGIDAS PLACA 1, KETOCONAZOL EN <i>Candida albicans</i>											
COLUMNAS FILAS	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.031	0.211	0.366	0.357	0.360	0.376	0.383	0.423	0.357	0.397	0.276
B	0.016	0.289	0.261	0.306	0.321	0.319	0.314	0.335	0.297	0.337	0.400
C	0.024	0.257	0.241	0.285	0.290	0.263	0.232	0.284	0.277	0.323	0.416
D	0.013	0.260	0.226	0.288	0.284	0.266	0.269	0.279	0.261	0.329	0.420
E	0.021	0.310	0.269	0.273	0.284	0.260	0.281	0.262	0.294	0.325	0.416
F	0.032	0.334	0.262	0.288	0.291	0.274	0.303	0.296	0.270	0.308	0.396
G	0.020	0.362	0.276	0.344	0.359	0.352	0.305	0.314	0.310	0.353	0.418
H	0.030	0.325	0.347	0.418	0.412	0.415	0.396	0.478	0.408	0.457	0.504
PROMEDIO	0.023	0.294	0.281	0.320	0.325	0.316	0.310	0.334	0.309	0.354	0.406
DÉS. ESTANDAR	0.007	0.049	0.050	0.050	0.047	0.060	0.056	0.077	0.050	0.050	0.062



APÉNDICE 5. FOTOS METODOLOGÍA



Figura 1

Ajuste del inóculo de *Candida albicans* con el estándar de McFarland de 0.5 por comparación de turbidez. Tubo izquierdo estándar y tubo derecho Inóculo.



Figura 2

Ajuste del inóculo de *Candida krusei* ATCC 6258 con el estándar de McFarland de 0.5 por comparación de turbidez. Tubo izquierdo inóculo y tubo derecho estándar.

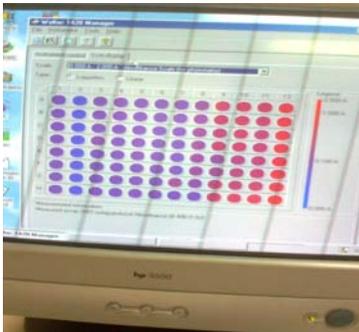


Figura 3

Muestra de los resultados obtenidos con el Software 1420 Multilaber Counter en donde se observan por medio de colores las lecturas de absorbancias en una placa.