

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**Actividad antimicótica del aceite esencial de las
hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" frente a
Candida albicans ATCC 10231. Ayacucho, 2015.**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL
DE QUÍMICO FARMACÉUTICA**

PRESENTADO POR LA:

Bach. CORDOVA HUAMANÍ, PAOLA SOFÍA

AYACUCHO – PERÚ

2016

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D.N° 076-2016-FCSA-UNSCH

Bach. Paola Sofía Córdova Huamaní

En la ciudad de Ayacucho, a los veintisiete días del mes de mayo del dos mil dieciséis, en el auditorio de la Biblioteca Central de la UNSCH, a las cuatro de la tarde, se reunieron los miembros del Jurado de Sustentación, presidida por el Dr. Emilio Ramírez Roca e integrado por Mg. Víctor Cárdenas López, Prof. Elbert Hermoza Valdivia, Mg. Enrique Aguilar Felices y Mg. Marco Aronés Jara, quien a su actúa como secretario docente. La tesis tiene por titulado "Actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* "oregano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2015"; presentado por Paola Sofía Córdova Huamaní.

Verificando la documentación, el presidente invitó al sustentante a exponer su trabajo.


Terminada la exposición, se invita a los jurados a realizar las preguntas y/u observaciones pertinentes.

Finalizada la etapa anterior, el Decano invita a la sustentante a abandonar el auditorio para que realicen la evaluación respectiva.


| JURADO CALIFICADOR | Texto | Exposición | Rptas | Promedio |
|----------------------------------|--------------|-------------------|--------------|-----------------|
| 1. Mg. Víctor Cárdenas López | 17,0 | 18,0 | 18,0 | 18,0 |
| 2. Prof. Elbert Hermoza Valdivia | 18,0 | 18,0 | 18,0 | 18,0 |
| 3. Mg. Enrique Aguilar Felices | 17,0 | 18,0 | 18,0 | 18,0 |
| 4. Mg. Marco Aronés Jara | 17,0 | 17,0 | 17,0 | 17,0 |

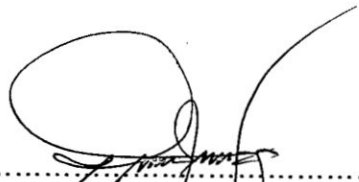
Promedio final: 18,0

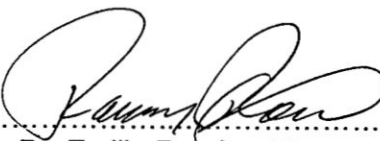
De la evaluación realizada la sustentante obtuvo una nota promedio de dieciocho (18,0), del cual dan fe los miembros del jurado firmando al pie de la presente acta. Siendo las 5:59 p.m. de la tarde finaliza el presente acto académico.


.....
Mg. Víctor Cárdenas López
Miembro - Jurado


.....
Prof. Elbert Fiermoza Valdivia
Miembro - Jurado


.....
Mg. Enrique Aguilar Felices
Miembro - Asesor


.....
Mg. Marco Aronés Jara
Miembro - Secretario Docente


.....
Dr. Emilio Ramírez Roca
Presidente

A mis padres, Alejandro y Paulina por darme la vida y el ejemplo del estudio, hermanos y a Richard por el apoyo incondicional en el desarrollo de este trabajo de investigación.

AGRADECIMIENTO

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, por haber contribuido en mi formación profesional y desarrollo personal.

A los docentes de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, quienes con sus amplios conocimientos me guiaron y apoyaron en mi carrera profesional.

Al Mg. Q.F. Enrique Javier Aguilar Felices, docente de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica y al Mg. Víctor Luis Cárdenas López, docente de la Escuela Profesional de Biología, asesores del presente trabajo de investigación, por el apoyo brindado.

A todas las personas que de alguna forma me apoyaron en la ejecución y finalización de mi trabajo de tesis.

ÍNDICE GENERAL

| | Pág. |
|---|------|
| DEDICATORIA | iii |
| AGRADECIMIENTO | v |
| ÍNDICE GENERAL | vii |
| ÍNDICE DE TABLAS | ix |
| ÍNDICE DE FIGURAS | xi |
| ÍNDICE DE ANEXOS | xiii |
| RESUMEN | xv |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. MARCO TEÓRICO | 3 |
| 2.1. ANTECEDENTES | 3 |
| 2.2. <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" | 5 |
| 2.3. ACEITE ESENCIAL | 6 |
| 2.4. <i>Candida albicans</i> | 10 |
| 2.5. ANTIMICÓTICOS | 11 |
| 2.6. NISTATINA | 12 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 15 |
| 3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN | 15 |
| 3.2. MATERIALES | 15 |
| 3.3. DISEÑO METODOLÓGICO | 16 |
| 3.3.1. Procedimiento para la recolección de muestra. | 16 |
| 3.3.2. Obtención del aceite esencial | 16 |
| 3.4. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICO-QUÍMICAS | 17 |
| 3.5. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL ACEITE ESENCIAL | 18 |
| 3.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" | 19 |
| 3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO | 22 |
| IV. RESULTADOS | 23 |
| V. DISCUSIÓN | 31 |
| VI. CONCLUSIONES | 35 |
| VII. RECOMENDACIONES | 37 |
| VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 39 |
| ANEXOS | 43 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1 Composición química de las diferentes variedades de aceites esenciales de "orégano". | 7 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1 Estructura química de los componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> "orégano". | 7 |
| Figura 2 Estructura química de la nistatina. | 12 |
| Figura 3 Extracción de aceites esenciales de orégano por arrastre de vapor. | 16 |
| Figura 4 Cromatografía en capa fina realizada al aceite esencial de las hojas de <i>Origanium vulgare</i> L. "orégano". Ayacucho, 2015. | 26 |

ÍNDICE DE ANEXOS

| | | Pág. |
|----------|--|------|
| Anexo 1 | Certificado de identificación taxonómica de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano". | 44 |
| Anexo 2 | <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" que fueron recolectadas de la provincia de Huanta, que se expenden en el mercado "Nery García Zarate". Ayacucho, 2015. | 45 |
| Anexo 3 | Secado de hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "Orégano". Ayacucho, 2015. | 46 |
| Anexo 4 | Esquema de extracción del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano", por arrastre de vapor en el laboratorio de Farmacognosia. Ayacucho, 2015. | 47 |
| Anexo 5 | Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano". Ayacucho, 2015. | 48 |
| Anexo 6 | Curva espectral del aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano". Ayacucho, 2015. | 49 |
| Anexo 7 | Cromatografía en capa fina del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano". Ayacucho. 2015. | 50 |
| Anexo 8 | Preparación de las diferentes concentraciones del aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano". Ayacucho, 2015. | 51 |
| Anexo 9 | Nistatina, utilizado como control. Ayacucho, 2015. | 52 |
| Anexo 10 | Cepas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2015. | 53 |
| Anexo 11 | Esquema de reconstitución de cepas estándar de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2015. | 54 |
| Anexo 12 | Esquema de la técnica de estría cruzada. Ayacucho, 2015. | 55 |
| Anexo 13 | Procedimiento del método de Kirby-Bauer. Ayacucho, 2015. | 56 |
| Anexo 14 | Halos de inhibición de las concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% del aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" y la nistatina, frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2015. | 57 |

| | | |
|----------|---|----|
| Anexo 15 | Halo de inhibición de la concentraciones de 100% del aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" y la nistatina, frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2015. | 58 |
| Anexo 16 | Protocolo de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la Concentración Fungicida Mínima (CMF). Ayacucho, 2015. | 59 |
| Anexo 17 | Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las concentraciones de 50%, 75% y 100% del aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano". Ayacucho, 2015. | 60 |
| Anexo 18 | Concentración Fungicida Mínima (CMF) de las concentraciones de 50%, 75% y 100%. Ayacucho, 2015. | 61 |
| Anexo 19 | Diámetro de los halos de Inhibición del aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano", frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 Ayacucho, 2015. | 62 |
| Anexo 20 | Análisis de varianza del número de halos de inhibición de las concentraciones del aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" y del control frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2015. | 63 |
| Anexo 21 | Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett de los halos de Inhibición del efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" y del control frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2015. | 64 |
| Anexo 22 | Prueba de comparaciones múltiples de Duncan de los porcentajes de Inhibición del efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2015. | 65 |
| Anexo 23 | Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de las concentraciones del aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2015. | 66 |
| Anexo 24 | MATRIZ DE CONSISTENCIA | 67 |

RESUMEN

El presente trabajo es una contribución a la búsqueda de nuevos agentes antimicóticos a partir de productos naturales que se han llevado a investigar. Los objetivos se orientaron a determinar las propiedades físico-químicas, además de evaluar la actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, El tipo de investigación fue experimental. Se desarrolló en los Laboratorios de Farmacognosia y Microbiología de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de junio a noviembre del 2015. La muestra de *Origanum vulgare* L. "orégano" que fue recolectada de la provincia de Huanta, que se expenden en el mercado "Nery García Zarate" de la ciudad de Ayacucho. El método de extracción del aceite esencial fue por arrastre de vapor de agua y la cepa de referencia fue *Candida albicans* ATCC 10231. La actividad antimicótico se evaluó por el método de disco difusión de kirby-Bauer. Se utilizaron discos de papel embebidos con el aceite esencial a 25%, 50%, 75 % y 100 % respectivamente y como control se utilizó un disco de nistatina. Los halos de inhibición fueron 0,90 cm; 2,30 cm; 3,63 cm y 4,10 cm y para la nistatina 3,38 cm respectivamente. Se hallaron diferencias estadísticas entre los porcentajes de los halos de inhibición (ANOVA, $p < 0,05$), en comparación con el estándar nistatina (Dunnett, $p < 0,05$) y el efecto de la concentración (Duncan, $p < 0,05$). Asimismo, la Concentración Mínima Inhibitoria fue 0,055 mg/ml y la Concentración Mínima Fungicida fue 0,11 mg/ml. Se concluye que el aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano" tiene actividad sobre *Candida albicans* ATCC 10231 y que el efecto es dependiente de la concentración.

Palabras clave: *Origanum vulgare* L. "orégano", *Candida albicans* ATCC 10231, actividad antimicótica.

I. INTRODUCCIÓN

Durante la última década se ha observado un incremento de las enfermedades micóticas, sobre todo las de tipo oportunista, ello ha significado la aparición de nuevas formas clínicas de micosis así como localizaciones o presentaciones no habituales.¹ Las infecciones fúngicas sistémicas y dérmicas son la causa de gran morbimortalidad en este tipo de pacientes.² Los fármacos disponibles actualmente, tiene una toxicidad importante, producen recurrencia o causan resistencia, razón por la cual se está procurando nuevos agentes antifúngicos más potentes pero sobretodo más seguros que los existentes actualmente.² Desafortunadamente, las células fúngicas y humanas no son muy diferentes, comparten gran parte de las vías del metabolismo intermediario, utilizan enzimas muy similares y no es fácil encontrar blancos que ofrezcan la selectividad requerida para obtener un antifúngico seguro.¹ La candidiasis, es la infección causada por levaduras del género *Candida*, siendo las más frecuentes las infecciones causadas por *Candida albicans*. Esta infección (la más frecuente de las micosis oportunistas) puede localizarse en la mucosa oral (muguet), vaginales, esofágicas, etc. Es frecuente en diabéticos, tras tratamientos con antibióticos o en pacientes inmunodeprimidos.³

Los compuestos derivados de plantas son de interés en este contexto porque ellos comprenden sustitutos más seguros o más eficaces como fuente de agentes antimicrobianos que los producidos en la industria.¹ En el mundo un gran número de especies a las que se designan con el nombre de orégano, el género más característico es el *Origanum*, teniendo múltiples usos: condimento en la industria de los alimentos, plantas decorativas, aromatizantes en la industria de perfumes o aromas, producción de aceites esenciales y oleorresinas.⁴ Actualmente muchas especias y hierbas, en particular de la familia *Lamiaceae*, a la que pertenece el orégano, han sido evaluadas como

antimicrobianas.⁴ El timol y el carvacrol son los compuestos principales.¹ La actividad antimicótica también es afectada por el tipo, composición y concentración del aceite esencial, el tipo y concentración del microorganismo seleccionado, la composición del sustrato, y las condiciones de procesamiento y conservación.⁵

Los aceites esenciales fueron conocidos desde la antigüedad por sus cualidades microbidas (capacidad de matar microorganismos) y regeneradoras entre otras propiedades. Su nombre proviene de la *quinta essentia* (quinta esencia) ya que era considerada un elemento de vida después del agua, la tierra, el fuego y el viento.⁵

Teniendo en cuenta la incidencia de micosis que existe en nuestra población, por ello se realizó la presente investigación con el propósito de determinar la actividad antimicótica del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano"; de tal manera que se pueda ofrecer como alternativa a cepas de *Candida albicans* resistentes a los antimicóticos, por lo cual los objetivos fueron:

1. Determinar las propiedades físico-químicas del aceite esencial extraído de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano".
2. Comparar la efectividad antimicótica de las diferentes concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%) del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" frente a la nistatina 100 000 U.I. sobre cepas de *Candida albicans*.
3. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano".
4. Determinar la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano".

II. MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES

Origanum vulgare "orégano", es una planta con diversos estudios por diferentes actividades, en base a esto surge la necesidad de ésta investigación de evaluar el efecto antifúngico que poseen plantas medicinales como el orégano sobre cepas de *Candida albicans*.

El aceite de orégano es quizás el más poderoso agente anti-fungal herbal conocido. Su eficacia es aumentada por su seguridad, desde que es enteramente no tóxico. Esto es de importancia crucial con infecciones de hongos tales como la Candidiasis, donde dosis grandes pueden ser necesarias para establecer la curación. La resistencia fungal al orégano es muy rara. De hecho, el orégano es un agente anti-fungal tan poderoso que es capaz de destruir hongos que han sido mutados en el laboratorio como resistentes y formas resistentes de hongos que resultan de la terapia antibiótica.⁶

En la Universidad Autónoma de Nuevo León, Departamento de Microbiología el trabajo realizado por Robledo (2014) fue evaluar la actividad antifúngica de 9 productos vegetales (extractos, aceites y/u oleorresinas) obtenidos de dos especies del Semidesierto Mexicano: orégano (*Lippia graveolens*) y gobernadora (*Larrea tridentata*), frente a cepas del género *Trichophyton sp.*, *Microsporum sp.* y *Epidermophyton sp.* Comparando su actividad con la terbinafina. Se determinó la actividad antifúngica por el método de difusión en disco en medio sólido. De los 9 productos evaluados, cuatro mostraron tener actividad inhibitoria en las cepas estudiadas. El producto que presentó la mayor actividad fue el aceite de orégano, inhibiendo el 100% del crecimiento de las cepas en sus concentraciones 100% (v/v).⁷

Palomino M. *et.al.* (2007), realizó el trabajo de investigación para determinar la actividad antimicrobiana de las semillas de *Carica papaya* L. "papaya". Se

obtuvieron por percolación los extractos etanólico e hidroalcohólico de semillas secas y semillas secas desengrasadas, y se determinó su actividad antimicrobiana mediante el método de difusión por excavación frente a los siguientes microorganismos: *Candida albicans* ATCC 10231, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Así mismo se realizó un "screening" fitoquímico de las muestras. Tanto en las semillas secas y semillas secas desengrasadas, se detectaron: taninos, triterpenoides y/o esteroides y flavonoides. Los extractos hidroalcohólicos de las semillas secas y semillas secas desengrasadas evidenciaron actividad antimicrobiana frente a los 5 microorganismos confrontados, mientras que los etanólicos de las semillas secas y semillas secas desengrasadas mostraron actividad frente a *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*.⁸

Los estudios realizados en la Universidad Peruana Cayetano Heredia por Fernández. G. *et al.* (2010). Evaluación de la actividad de aceites esenciales de eucalipto, orégano, limón y mandarina frente a *Candida albicans*, el estudio sobre la actividad antifúngica, la extracción del aceite esencial tuvo el siguiente rendimiento: orégano (599 g) 2 ml, eucalipto (2526 g) 10 ml, mandarina (2400 g) 2 ml, limón (2600 g) 4 ml. Los diámetros promedio de los halos de inhibición fueron: orégano 4,2 cm; eucalipto 1,3 cm; mandarina 0,9 cm; limón 2 cm. En conclusión, el aceite esencial de orégano es el que presentó la mayor actividad antifúngica frente a la cepa *Cándida albicans* ATCC 10231 seguido de los aceites de eucalipto, mandarina y limón. Los componentes químicos de timol y carvacrol presentes en el aceite esencial de orégano serían los responsables de la actividad antifúngica.⁹

Estudios en la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga evaluó la actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, realizados por Acharte D. (2010). El aceite esencial al 10%, 20% y 30%, presentaron mayor actividad antimicótica, respecto a las demás concentraciones, con halos de inhibición de 20,50 mm; 21,00 mm y 22,50 mm; respectivamente; superior a la nistatina que presentó 19.67 mm, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$). Los porcentajes de inhibición de las concentraciones del 10%, 20% y 30%, resultaron estadísticamente similares ($p < 0,05$). La CMI y CMF del aceite esencial fue 0,122 mg/ml y 0,244 mg/ml; respectivamente.¹⁰

En la Universidad Autónoma Chapingo se realizaron estudios frente a la actividad antimicótica in vitro de tres aceites esenciales contra hongos xilófagos, realizados por Contreras C. *et al.* (2012). El aceite esencial de romero tuvo un índice antimicótico (IA) del 0% en las 6 concentraciones probadas, en todos los hongos. El aceite esencial (AE) de orégano tuvo un IA del 0% en las concentraciones de 20 y 100 ppm, pero el efecto antimicótico fue aumentando al incrementarse la concentración del AE, de tal forma que para la concentración a 400 ppm el IA fue el 100% para el hongo de la pudrición café *C.puteana*.¹¹

2.2. *Origanum vulgare* L. “orégano”

2.2.1. Clasificación taxonómica

| | |
|-----------|------------------------------|
| DIVISIÓN | : MAGNOLIOPHYTA |
| CLASE | : MAGNOLIOPSIDA |
| SUB CLASE | : ASTERIDAE |
| ORDEN | : LAMIALES |
| FAMILIA | : LAMIACEAE |
| GÉNERO | : <i>Origanum</i> |
| ESPECIE | : <i>Origanum vulgare</i> L. |
| N. V. | : “orégano” |

Fuente. Certificado expedido por la Jefe del *Herbarium Huamangensis* de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. (Anexo 1).

2.2.2. Descripción botánica

El “orégano” es una planta vivaz de **tallo** recto, el cual alcanza entre 30 y 80 centímetros, curiosamente cuadrado y ramificado en la parte ms alta, totalmente cubierto de pelusilla blanca y que pone un rizoma rastrero. Las **hojas** brotan de dos en dos en cada nudo, enfrentadas, son enteras, ovaladas, acabadas en punta, también se recubren de pelusilla por ambas caras y su longitud es de hasta 4 centímetros. Posee peciolo y aparecen cubiertas también de glándulas. Las **flores** se disponen en verticilastros que forman espiguillas de hasta 3 centímetros; son muy pequeñas (los pétalos no sobrepasan los 2 o 3 milímetros de longitud). También pueden formar corimbos terminales. Están protegidas por bractéolas de hasta 5 milímetros, de contorno oval y color verdoso o purpureo. Las cálices son gamosépalas y de color verde-amarillento. Las corolas son bilabiadas de color blanco, rojizo u purpúreo. **Florece** en verano. Su **fruto** es un tetraquenio con cada parte ovoidea y lisa, es seco y globoso. Las **partes medicinales utilizadas** son los tallos y las hojas. Toda la planta desprende un agradable y particular aroma. Su sabor es amargo. Entre sus sinónimos de uso

frecuente destacan: "díctamo crético", "orégano" y "mejorana bastarda" o "silvestre".¹²

2.2.3. Distribución geográfica

El orégano se pueden cultivar hasta los 3000 m.s.n.m, así podemos encontrar en el Departamento de Ayacucho.

El "orégano" es originario de la región mediterránea de Asia Occidental y del Sur Mediterráneo de Europa. Esta se ha distribuido por todo el mundo por ser rustica y no necesitar de grandes cuidados.¹²

2.2.4. Composición química

Existen diversos estudios sobre la composición química del orégano, usando extractos acuosos y sus aceites esenciales. Se han identificado flavonoides como la apigenina y la luteolina, agliconas, alcoholes alifáticos, compuestos terpénicos y derivados del fenilpropano. En *Origanum vulgare* contiene ácidos fenólicos (caféico, clorogénico, rosmarínico).¹³ Los monoterpenoides, compuestos volátiles con olores intensamente pungentes, son los responsables de las fragancias y las sensaciones de olor-sabor de muchas plantas. Los principales quimiotipos de la especie *Origanum vulgare* son el carvacrol y el timol cada una con enzimas específicas que dirigen su biosíntesis.¹³

2.2.5. Usos medicinales

- El orégano es utilizado para trastornos digestivos por ejemplo dispepsia de origen nervioso, flatulencia, espasmos o cólicos de los órganos digestivos.¹⁴
- Por su acción carminativa es un buen condimento para legumbres, potajes y pizzas.¹⁴
- Afecciones respiratorias que cursan tos seca o irritativa, como la laringitis.
- El orégano tiene también acción expectorante y antitusígena, tanto como en uso interno y como externo.¹⁴
- Dolores musculares, tortícolis y lumbago, aplicando externamente tanto en cataplasma como en fricciones sobre la piel.¹⁴

2.3. ACEITE ESENCIAL

Los aceites esenciales son productos generalmente olorosos, obtenidos bien por arrastre de vapor de agua de vegetales o de partes de vegetales.¹⁵ Los aceites esenciales son únicos, volátiles, insolubles en agua y poseen muchas propiedades terapéuticas; tienen gran aplicación en aromaterapia, el área farmacéutica y en la industria cosmética, entre otras.¹⁵

2.3.1. Composición química

El aceite esencial de orégano presenta 60 componentes, de los cuales los clasificaron en grupos: "Monoterpenos, sesquiterpenos y fenólicos". De manera que siendo los principales componentes el "timol, carvacrol, cimeno y terpenos". Se han realizado estudios acerca de la composición química de las diferentes variedades de aceites esenciales "orégano".¹⁶

Tabla 1. Composición química de las diferentes variedades de aceites esenciales de "orégano".¹⁶

| Nombre Científico | Principales componentes |
|-----------------------|--|
| <i>O. vulgare</i> | Ácido o-cumárico, ácido ferúlico, ácido cafeico, ácido r-hidroxibenzoico, ácido vainillínico, ácido rosmarínico. Mirceno, γ -terpineno r-cimeno, g-terpineno, timol, carvacrol, β -cariofileno. |
| <i>O. dictamnus</i> | R-cimeno, timoquinona, carvacrol Ácido ferúlico, |
| <i>O. onites</i> | ácido cafeico, r-hidroxibenzoico ácido vainillínico. |
| <i>O. glandulosum</i> | R-cimeno, γ -terpineno, timol, carvacrol, 1 8-cineol, |
| <i>L. multiflora</i> | linalool, β -cariofileno, (Z) b-farneseno, germacreno D, (Z)-nerolidol. |

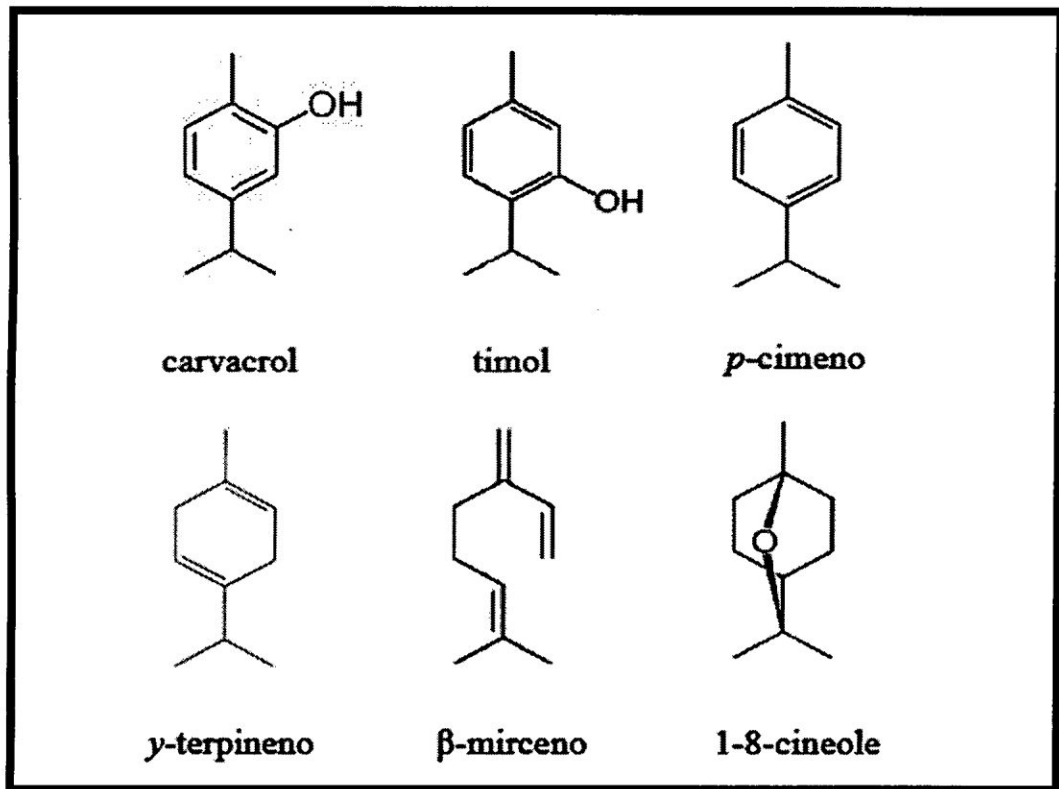


Figura 1. Estructura química de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Origanum vulgare* "orégano".¹⁷

2.3.2. Usos medicinales

La planta de *Origanum vulgare* "orégano", posee muchos usos medicinales y aplicaciones curativas, los cuales están dados por las propiedades medicinales que presenta. A su vez éstas están dadas por sus componentes del orégano, los cuales pueden ser aprovechados de mejor manera, al extraer los aceites esenciales.¹⁴

- El consumo de los aceites esenciales del orégano facilita la eliminación de los gases acumulados en el tubo digestivo. Debido a esto es muy recomendado para aquellas personas que presenten meteorismo y flatulencia.¹⁴
- Se recomienda consumir los aceites esenciales del orégano a las personas que tengan problemas de estreñimiento, digestión lenta y problemas digestivos en general, ya que debido a sus propiedades medicinales favorece la función biliar mejorando la digestión. Debido a lo anterior se recomienda ingerir posterior a las comidas.¹⁴
- La tos excesiva producto de resfriados o catarros, así como también los problemas bronquiales pueden tratarse mediante el consumo de los aceites esenciales del orégano.¹⁴
- Los aceites esenciales del orégano están muy recomendados para aquellas mujeres que sufren de fuertes dolores durante la menstruación, ya que debido a sus propiedades medicinales el consumo de estos aceites alivia dichos dolores.¹⁴
- **Antimicrobiana:** Se ha encontrado que los aceites esenciales de las especies del género *Origanum* presentan actividad contra bacterias. **Gram negativas:** *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter*. **Gram positivas:** *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis*.¹⁸
- **Antifungicida:** contra *Cándida albicans*, *C.tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus níger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*; pero no contra *Pseudomona aeruginosa*. Los fenoles carvacrol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos Gram negativos, excepto para *P. aeruginosa*, siendo el timol más activo.¹⁹
- **Antiparasitaria:** Los componentes mayoritarios en su aceite son el cimeno (8%), limoneno (15%), linalol (34%), geraniol (20%) y timol (4%). Entre los compuestos monoterpénicos volátiles presentes comúnmente en aceites

esenciales, es conocida la capacidad del terpineol y la α - y β -pineno para matar piojos, aunque estos compuestos sólo se encuentran en bajas cantidades en dicho aceite esencial (3%, 1% y 4% respectivamente).¹⁹

- **Insecticida:** El aceite esencial de *O. syriacum* contiene un alto nivel de carvacrol (61%), el cual posee una concentración letal media (CL_{50}) = 37,6 mg/L, seguido del timol (21,8%) con un CL_{50} = 36 mg/L contra larvas del mosquito *Culex pipiens molestus*. Entre otros compuestos activos se tiene a la mentona, el 1,8-cineol, el linalol y el terpineol. Los aceites esenciales de *O. majorana* y *O. compactum* poseen una alta actividad insecticida contra huevos y adultos de *Mayetiola destructor*.¹⁹

2.3.3. Toxicidad

El orégano no posee efectos tóxicos si se consume en su estado natural en dosis adecuadas y durante un tiempo prudente. Sin embargo, los aceites esenciales de la planta de orégano pueden ser catalogados como tóxicos, ya que al ser ingeridos en dosis elevadas puede ocasionar efectos narcóticos, evidenciados en síntomas como sueño excesivo (somnolencia) o adormecimiento de ciertas partes del cuerpo.²⁰

No se recomienda la ingesta de los aceites esenciales del orégano en mujeres que se encuentran embarazadas, ya que sus componentes podrían ocasionar problemas durante este periodo, incluso puede provocar abortos.²⁰

Debido a que no existe evidencia que asevere que el consumo de los aceites esenciales del orégano no resultan ser perjudiciales para los lactantes, no se recomienda su consumo a las mujeres que se encuentren durante la etapa de lactancia.²⁰

Los aceites esenciales del orégano pueden ocasionar un aumento de los síntomas en personas que presenten gastritis, colon irritable o úlceras, por lo cual no se recomienda su consumo a personas que padezcan de estas enfermedades.²⁰

2.4. *Candida albicans*

2.4.1. Ubicación taxonómica²¹

| | |
|-------------------|---------------------------|
| REINO | : FUNGI |
| DIVISIÓN | : MYCOTA |
| SUBDIVISIÓN | : DEUTEROMYCOTINA |
| CLASE | : DEUTEROMYCETES |
| SUBCLASE | : BLASTOMYCETIDAE |
| FAMILIA | : CRYPTOCOCACEAE |
| GÉNERO | : <i>Candida</i> |
| ESPECIE | : <i>albicans</i> |
| NOMBRE CIENTÍFICO | : <i>Candida albicans</i> |
| SINÓNIMOS | : Monilia, Oidium |

Candida albicans, es el más patógeno de este género, es habitualmente de procedencia endógena. En el ser humano, *Candida albicans* forma parte de la flora microbiana de la boca y el tubo digestivo.²¹

Candida albicans es una levadura oval gemante que produce un pseudomicelio en cultivo, en los tejidos y exudados.²¹

2.4.2. Morfología

Los miembros del género *Candida* se desarrollan característicamente como células de levadura o como pseudohifas. *Candida albicans*, el principal miembro patógeno del género, también produce hifas verdaderas. Las pseudohifas son cadenas de células en gemación que no se desprenden y por eso forman una red ramificada parecida a las hifas verdaderas. Las colonias compuestas por pseudohifas tienen el aspecto blando y blanco de las levaduras, en contraste con el crecimiento algodonoso o lanoso del micelio verdadero. Las células de levadura de *Candida albicans* son ovaladas y grampositivas.²²

Macroscópicamente, los hongos levaduriformes dan lugar a colonias semejantes a las bacterias, cremosas con un diámetro de 3 a 7 mm, y en general de crecimiento relativamente rápido (24 – 72 horas).²³

Las características morfológicas de *C. albicans* son: colonias blancas, lisas y brillantes.²⁴

2.4.3. Cultivo e identificación de los hongos

En micología se utilizan medios específicos, como el Sabouraud, muy rico en glucosa y cuyo pH bajo (pH=5-5,6) dificulta el crecimiento de las bacterias facilitando el crecimiento de los hongos. El crecimiento de levaduras (muguet y

vaginitis), en cuyo caso suele ser suficiente incubar a 37°C los cultivos durante un período máximo de dos a tres días.²³

2.4.4. Patogenia y Patología

Se ha determinado que las especies del género *Candida* conforman el grupo más importante de hongos patógenos oportunistas. Entre 1980 y la actualidad, la frecuencia de infección por *Candida* se ha incrementado a un ritmo constante en hospitales de cualquier tamaño y en todos los grupos de edades.²⁵

La forma más común de candidiasis es la infección de la piel y de las mucosas. En los tejidos afectados, el hongo se detecta en su forma levaduriforme y micelial. El carácter invasivo de este último viene dado por la mayor facilidad de las hifas para penetrar en los tejidos y su mayor resistencia a la fagocitosis. El fenómeno de la adherencia, fase previa de la colonización e invasión, parece de suma importancia, habiéndose demostrado la capacidad de adherencia de *C. albicans* a las células epiteliales de la boca y de la vagina.²⁶

- Cuando este organismo afecta la boca, provoca una infección conocida como candidiasis oral, la cual es común en los recién nacidos y los pacientes inmunosuprimidos.²⁷
- Afecta la vagina conocida como la candidiasis vaginal casi siempre afecta a las mujeres embarazadas, las diabéticas, las que toman antibióticos o anticonceptivos orales.²⁷
- Afecta la piel conocida como la candidiasis superficial (cutánea o mucosa), se establece a consecuencia de un incremento en la población local de *Candida* y del daño a la piel o el epitelio, que permite la invasión local por la levadura y pseudohifas.²⁷

Después de la administración de antimicrobianos por vía oral, con frecuencia ocurre un gran incremento de la *Candida* en el intestino y puede penetrar a la circulación a través de la mucosa intestinal.²²

2.5. ANTIMICÓTICOS

Las infecciones micóticas humanas se han incrementado de manera drástica en frecuencia y gravedad en años recientes, debido principalmente a los avances en cirugía, el tratamiento del cáncer y el cuidado intensivo que acompaña al aumento del uso de antimicrobianos de amplio espectro y en la epidemia del VIH. Estos cambios resultaron en un incremento en la cantidad de pacientes con riesgo de infecciones micóticas.²⁸

La actividad antifúngica o antimicótica, es la propiedad que tiene una sustancia activa que en pequeñas cantidad detienen el crecimiento y desarrollo o producen la muerte de hongos, pudiendo ser fungicidas o fungistáticos, pueden ser estos de origen natural o sintético.²⁹

Los antimicóticos locales casi siempre se usan en el tratamiento de la candidiasis oral, cutánea y vaginal.²⁸

2.6. NISTATINA

Nistatina es un antibiótico antimicótico producido por el actinomiceto *Streptomyces noursei*. Nistatina ejerce su actividad antimicótica uniéndose a los esteroides de la membrana celular de los hongos. El fármaco no es activo frente a células bacterianas y de mamíferos porque no contiene esteroides en su membrana celular. La nistatina tiene una actividad fungistática o fungicida frente a varias cepas de levaduras y hongos. *In vitro*, las concentraciones de nistatina de aproximadamente 3ug/ml, inhiben el crecimiento de *C. albicans*. Este antibiótico antimicótico no se absorbe en el tubo digestivo y se utiliza sobre todo en forma local para tratar la candidiasis oral o vulvovaginitis. Su toxicidad impide el uso parenteral.³⁰

La nistatina es activa contra la mayoría de las especies de *Candida* y puede utilizarse para el tratamiento de muguet oral y la candidiasis vaginal.³¹

2.6.1. Química de la nistatina

La nistatina es un antibiótico poliénico, un sistema cíclico muy grande unido a la micosamina, un aminoazúcar. La fórmula empírica es $C_{46}H_{77}NO_{19}$.

La nistatina es muy ligeramente soluble en agua, pero se descompone rápidamente en presencia de agua o de plasma. Es estable en forma seca.³²

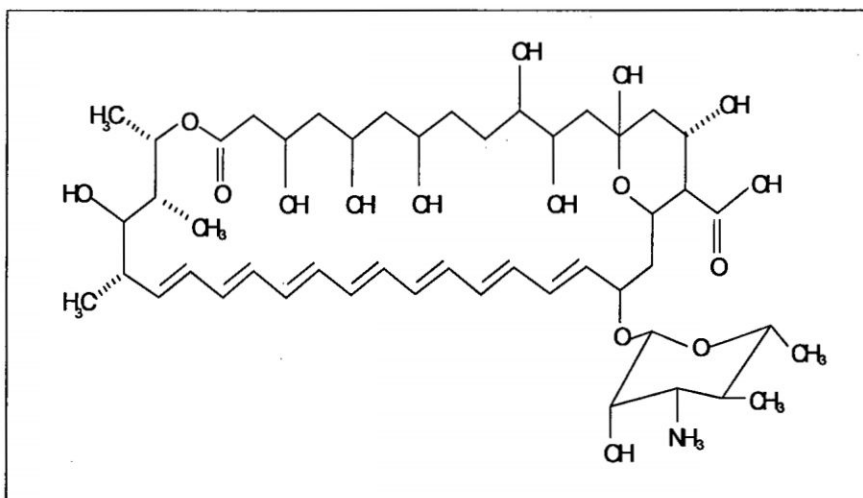


Figura 2. Estructura química de la nistatina.³³

2.6.2. Actividad antimicótica

La nistatina no tiene efecto sobre las bacterias ni sobre los protozoarios, pero *in vitro* inhibe muchos hongos, incluyendo especies de *Candida*, dermatófitos y organismos productores de micosis profundas en el hombre. *In vivo* su actividad está restringida a las superficies donde el medicamento no absorbido puede estar en contacto directo con la levadura o el hongo.³²

El modo de acción implica la unión de la nistatina con la membrana celular en presencia de un esteroles específico. Esto da por resultado cambios drásticos en la permeabilidad de la membrana celular y pérdida de cationes de la célula. Las células que pierden los esteroides de las membranas son resistentes.³²

2.6.3. Mecanismo de acción

Como todos los polienos, la nistatina se une de manera irreversible a los esteroides de la membrana presentes en las especies susceptibles de *Candida*. Las moléculas de polienos presentan mayor afinidad por los esteroides fúngicos, incluyendo el ergosterol, que por los esteroides humanos, lo que permite una toxicidad selectiva relativa. Esta unión irreversible altera aumentando la permeabilidad de la membrana y posibilita la salida de componentes intracelulares esenciales, le hace perder sustancias vitales para su metabolismo y funciones celulares, como potasio, aminoácidos y purinas y, como consecuencia, la muerte celular. En bajas concentraciones la nistatina es fungistática, mientras que en concentraciones más elevadas tiene actividad fungicida.³⁴

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en los Laboratorios de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud. Específicamente en el laboratorio de Farmacognosia y en el laboratorio de Microbiología de la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas, Facultad de Biología de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de junio a noviembre del 2015.

3.2. MATERIALES

3.2.1. Población

Las plantas en buen estado de *Origanum vulgare* L. "orégano" que fueron recolectadas de la provincia de Huanta, que se expenden en el mercado "Nery García Zarate" del distrito de Ayacucho, de la provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho.

3.2.2. Muestra

5 Kg de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano". Tipo de muestreo no probabilístico por conveniencia. (Anexo 2 y 3)

La identificación taxonómica de la especie fue emitida por el Jefe del *Herbarium Huamangensis* de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

(Anexo 1)

3.2.3. Microorganismo de ensayo

Cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 proporcionadas por el Área de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga.

3.3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.3.1. Procedimiento para la recolección de muestra

Las plantas en buen estado de *Origanum vulgare* L. "orégano" que fueron recolectadas de la provincia de Huanta, que se expenden en el mercado "Nery García Zarate" del distrito de Ayacucho, de la provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho. Las hojas fueron lavadas con agua fría para luego, ser secada en un medio ambiente fresco fuera del alcance de la contaminación, durante un período de 8 días hasta obtener el producto completamente seco y homogéneo.¹²

Las muestras fueron transportadas a los laboratorios de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Salud.

3.3.2. Obtención del aceite esencial

El aceite esencial de "orégano" (AEO) fue extraído de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" a través del método de arrastre de vapor de agua a partir de muestra seca, utilizando un equipo especialmente diseñado y adaptado.³⁵

(Anexo 4)

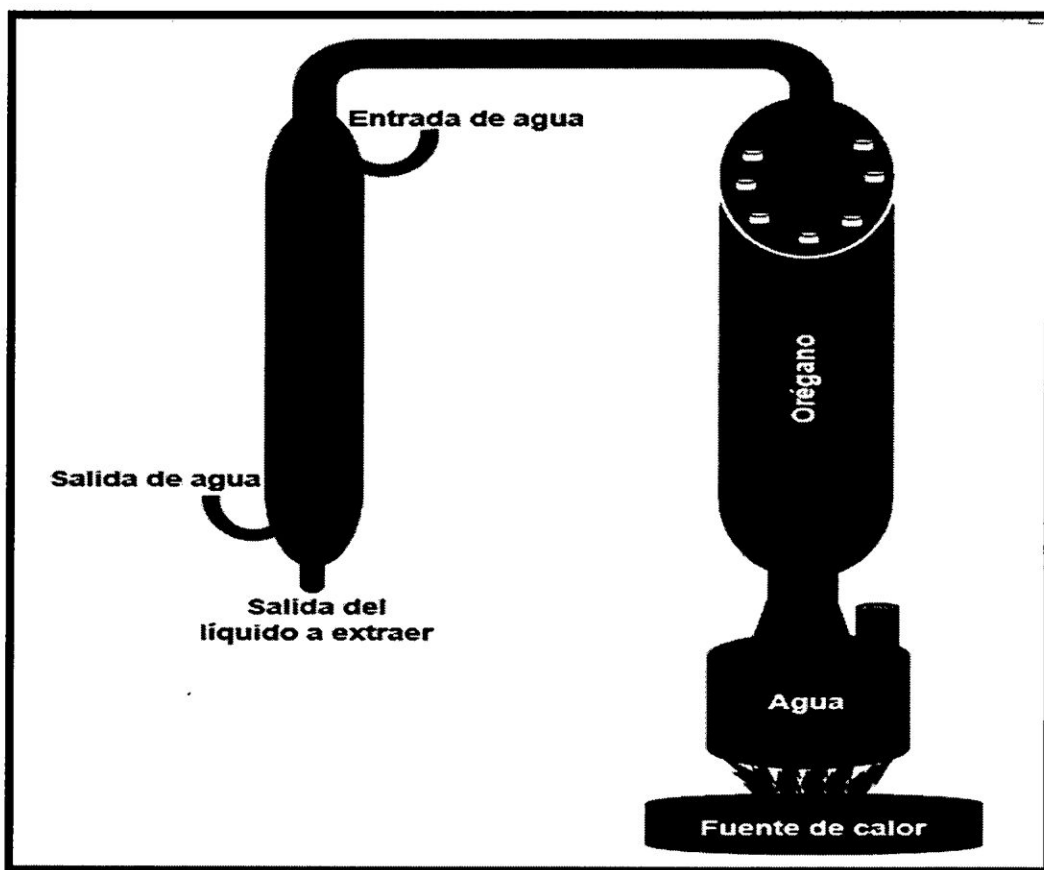


Figura 3. Esquema de la extracción de aceites esenciales de orégano por arrastre de vapor.

3.4. DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICO-QUÍMICAS

3.4.1. Características Organolépticas

Características propias del aceite esencial en cuanto a su aspecto, color, sabor y olor.²

3.4.2. Determinación de densidad

Se determinó la densidad por el método del picnómetro. Se pesó el picnómetro vacío y seco para posteriormente ser llenado con agua destilada y ser vuelto a pesar. Seguidamente, luego de ser vaciado y secado, se le llenará con el aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano" y se volverá a pesar. Todo este procedimiento se llevara a cabo a 20 °C.¹⁶

$$p = \frac{(mp + d) - mp}{(mp + w) - mp} \times pw$$

Dónde:

La masa del picnómetro vacío (mp)

La masa del picnómetro enrasado con agua ($mp + w$)

La masa del picnómetro enrasado con disolución o muestra problema ($mp + d$)

Densidad del agua (pw) = 1

3.4.3. Determinación del índice de refracción

Índice de refracción (n) de una sustancia es el cociente entre la velocidad de la luz en el aire y la velocidad de la luz en la sustancia. Es importante para la identificación de sustancias y la detección de impurezas. Se determinará haciendo uso del refractómetro, este a su vez dará el contenido de aceite esencial de orégano en la muestra.¹⁶

3.4.4. Índice de éster

Se fundamenta en la neutralización, por una base, de los ácidos liberados en la hidrólisis de los ésteres contenidos en 1g de aceite esencial. La técnica seguida, según su recomendación, fue la siguiente: A un volumen equivalente a 1g de AEO se le agregó 25mL de KOH etanólico al 0,5N y 5 gotas del indicador fenoltaleína para luego ser reflujado por 1 hora, al término del cual se dejó enfriar. Se tituló con HCl 0,5N hasta la aparición de un coloración persistente. Paralelamente se hizo un blanco.²

Índice de éster = Í. saponificación – Í. de acidez

$$\text{Í. saponificación} = \frac{(v1 - v2) \times 0,5N \times 56,1}{P}$$

Dónde:

HCl utilizado en el blanco (v_1)

HCl utilizado con la muestra (v_2)

Peso de la muestra en gramos (P)

3.4.5. Índice de acidez

Se fundamenta en la neutralización de ácidos libres contenidos en 1g de aceite esencial. La técnica seguida y recomendada por la misma fue la siguiente: A un volumen equivalente a 1g de aceite esencial de orégano se le agregó 5mL de alcohol medicinal y 5 gotas de indicador fenolftaleína. Posteriormente se tituló con KOH etanólico al 0,1N hasta que apareció una coloración persistente por 30 segundos. Se hizo paralelamente un blanco.²

$$\text{Í. acidez} = \frac{G \times N \times 56.1}{P}$$

Dónde:

Gasto de KOH (G)

Normalidad de KOH (N)

Peso de la muestra en gramos (P)

3.5. CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL ACEITE ESENCIAL

Identificación de los componentes del aceite por cromatografía de capa fina.

Se detectarán los componentes de los aceites por la coloración que presenten las manchas generales luego de ser rociada por un detector químico.

- Muestra: aceite obtenido por arrastre por vapor
- Estándar: muestra comercial de aceite de Orégano
- Fase estacionaria: cromatografía de sílica Gel y placas cromatografías de sílica gel.
- Fase móvil: Tolueno – Acetato de Etilo (93:7)
- Soluciones reveladoras:
 - A. Ácido sulfúrico 5% en etanol
 - B. Vainillina 1% en etanol

Preparación de las soluciones reveladoras:

- Solución A: ácido sulfúrico al 5%

Colocar 5mL de ácido sulfúrico en un balón de 100ml

Diluir con etanol 95°

Llevar a volumen

- Solución B: vainillina al 1%

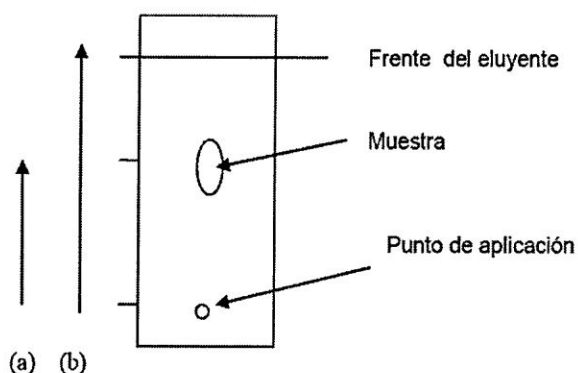
Pesar 1,0g de vainillina

Disolverla en Etanol a 95°

Rociar las placas primero con la solución A y luego con la solución B. colocar las placas en una estufa a 105 °C por 5 minutos y observar las coloraciones formadas.

Resultado positivo: manchas de color Azul-Violeta.^{36, 37}

$$R_f = \frac{(a)\text{distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación}}{(b)\text{distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente}}$$



3.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* L. "orégano"

Según la metodología de Lozina et al (2005)³⁸, para la determinación de los halos de inhibición: Palomino y Uribe (2007)⁸, para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida (CMF).

3.6.1. PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES

Para la muestra

Para la determinación de la actividad antimicótica se prepararon concentraciones al 25%, 50%, 75% y 100% peso sobre volumen (v/v) del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano" diluidos en Tween 80 al 2% como solvente y emulsificante.²

Para la determinación de la CMI y CMF, las diluciones hechas para el aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano" se realizó de acuerdo al requerimiento del microorganismo control.²

3.6.2. Preparación del inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231

Se procedió a seleccionar las colonias del agar de cultivo, se tocó la colonia *Candida albicans* ATCC 10231 por arriba con una asa y el crecimiento se

transfirió a un tubo con 4 a 5 ml de caldo nutritivo, se incubó a 37 °C por 24 horas. La turbidez del caldo se ajustó con el caldo nutritivo obteniéndose así una turbidez ópticamente similar al estándar de 0,5 de la escala de McFarland. Se realizó este paso visualmente, teniendo en cuenta la luz adecuada, comparando así el inóculo con el estándar de 0,5 de la escala de McFarland contra un fondo blanco.¹⁰

(Anexo 12)

3.6.3. Determinación del halo de inhibición

En cada una de las placas petri se colocaron 20 ml de agar Sabouraud, por medio de estría cruzada se agregó la suspensión de *Candida albicans* ATCC 10231. Se embebió los discos de papel filtro con las concentraciones del aceite esencial de 25%, 50%, 75% y 100% y con el control positivo que fue la nistatina 100 U.I. Se realizó la incubación a 37 °C y se realizó la observación de los halos de inhibición a las 48 horas (Anexos del 12 al 15), luego se procedió a la medición del diámetro del halo formado. Aquellos que tuvieron halos de inhibición similar o superior a la nistatina, se utilizará para determinación de la CMI y CMF.³⁸

3.6.4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

CMI es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación. La concentración mínima inhibitoria es importante en diagnósticos de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y además para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos.³⁹

El cultivo de *Candida albicans* ATCC 10231 fue ajustado al estándar de 0,5 de la escala de McFarland. Para hallar la CMI se prepararon 15 tubos previamente esterilizados y rotulados del número 1 al número 15. A continuación se detalla el procedimiento:

- A partir del tubo N° 1 hasta el tubo N° 15 se agregó 1 ml del Caldo Nutritivo
- Posteriormente se agregó 1 ml de la concentración del aceite esencial al tubo N° 1, a partir del cual se traspasó 1 ml al tubo N° 2 y así sucesivamente hasta el tubo N° 14, del tubo N° 14 se extrajo 1 ml y se descartó. El tubo N° 15 no recibió aceite esencial siendo éste el control.
- Luego se agregó 1 ml del inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231 a todos los tubos y se llevó a incubación a 37°C por 24 horas.³⁹

(Anexos 17 y 18).

Cuadro 1. Concentraciones decrecientes de las diluciones del aceite esencial.³⁸

| Tubos | Aceite esencial (mg/ml) | | |
|-------|-------------------------|---------|---------|
| | 50% | 75% | 100% |
| 1 | 50,000 | 100,000 | 150,000 |
| 2 | 25,000 | 50,000 | 75,000 |
| 3 | 12,500 | 25,000 | 37,500 |
| 4 | 6,250 | 12,500 | 18,750 |
| 5 | 3,125 | 6,250 | 9,375 |
| 6 | 1,563 | 3,125 | 4,688 |
| 7 | 0,781 | 1,563 | 2,344 |
| 8 | 0,391 | 0,781 | 1,172 |
| 9 | 0,195 | 0,391 | 0,586 |
| 10 | 0,098 | 0,195 | 0,293 |
| 11 | 0,049 | 0,098 | 0,146 |
| 12 | 0,024 | 0,049 | 0,073 |
| 13 | 0,012 | 0,024 | 0,037 |
| 14 | 0,006 | 0,012 | 0,018 |

3.6.5. Determinación de la Concentración Fungicida Mínima (CMF)³⁸

CMF es la reducción de 99,9% en las unidades formadoras de colonia. Este es el criterio que se usa para bacterias y algunos lo utilizan para los hongos.³⁸

Para determinar la Concentración Mínima Fungicida (CMF) se procedió a partir de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), realizándose de la siguiente manera:

- Luego de haber observado la turbidez a simple vista, se procedió a sembrar con la ayuda del asa, los caldos no turbios en las placas con agar Sabraud.
- Posteriormente se incubó a 37°C por 24 horas.³⁹ (Anexos 18 y 19).

3.6.6. Diseño experimental

Para el presente trabajo, se formó cinco grupos y cada grupo de seis repeticiones con *Candida albicans* ATCC 10231, distribuido de la siguiente manera:

- Grupo I : Control positivo tratado con nistatina
- Grupo II : Aceite esencial a 25% de concentración
- Grupo III : Aceite esencial a 50% de concentración

Grupo IV : Aceite esencial a 75% de concentración

Grupo V : Aceite esencial a 100% de concentración

Para determinar el efecto antimicótico se procedió a medir el diámetro de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones de la muestra y del control positivo, los que nos permitió determinar la concentración ideal que muestre una mayor eficacia antimicótica en relación a la nistatina tomado como patrón.³⁸

Para el cálculo de porcentaje de inhibición se usó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Diámetro del halo de inhibición de la muestra}}{\text{Diámetro del halo de control}} \times 100$$

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del porcentaje de los halos de inhibición se determinó la media y la desviación estándar, media \pm desviación estándar. La diferencia entre la media se contrastó con el análisis de varianza al 95% de confianza. La comparación de los halos de inhibición con el estándar de referencia se realizó con la estadística Dunnett. La diferencia de la concentración en los halos de inhibición se evaluó con el estadístico de Duncan.

IV. RESULTADOS

Cuadro 2. Características organolépticas del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano". Ayacucho, 2015.

| Características | Descripción |
|------------------------|--------------------------|
| Aspecto | Líquido y viscoso |
| Color | Amarillo claro |
| Olor | Característico (especie) |
| Sabor | Característico (amargo) |

Cuadro 3. Constantes físico-químico del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano". Ayacucho, 2015.

| Características | Resultados |
|-----------------------------|----------------------|
| Densidad | 0,873 g/ml |
| Índice de Refracción | 1,502 |
| Índice de Acidez | 5,498 mg KOH/g AEO |
| Índice de Éster | 175,320 mg KOH/g AEO |

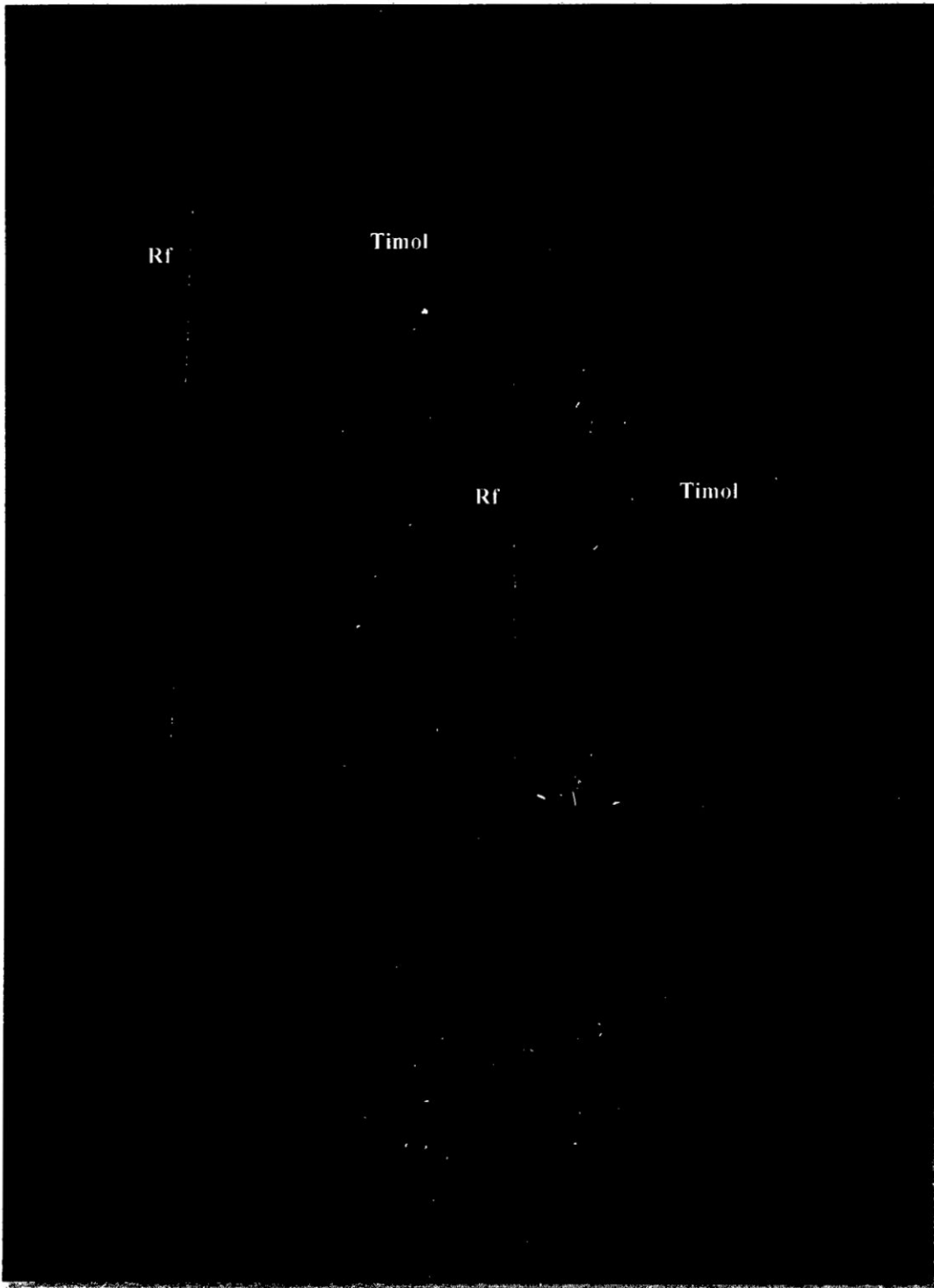


Figura 4. Cromatografía en capa fina realizada al aceite esencial de las hojas de *Origanium vulgare* L. "orégano". Ayacucho, 2015

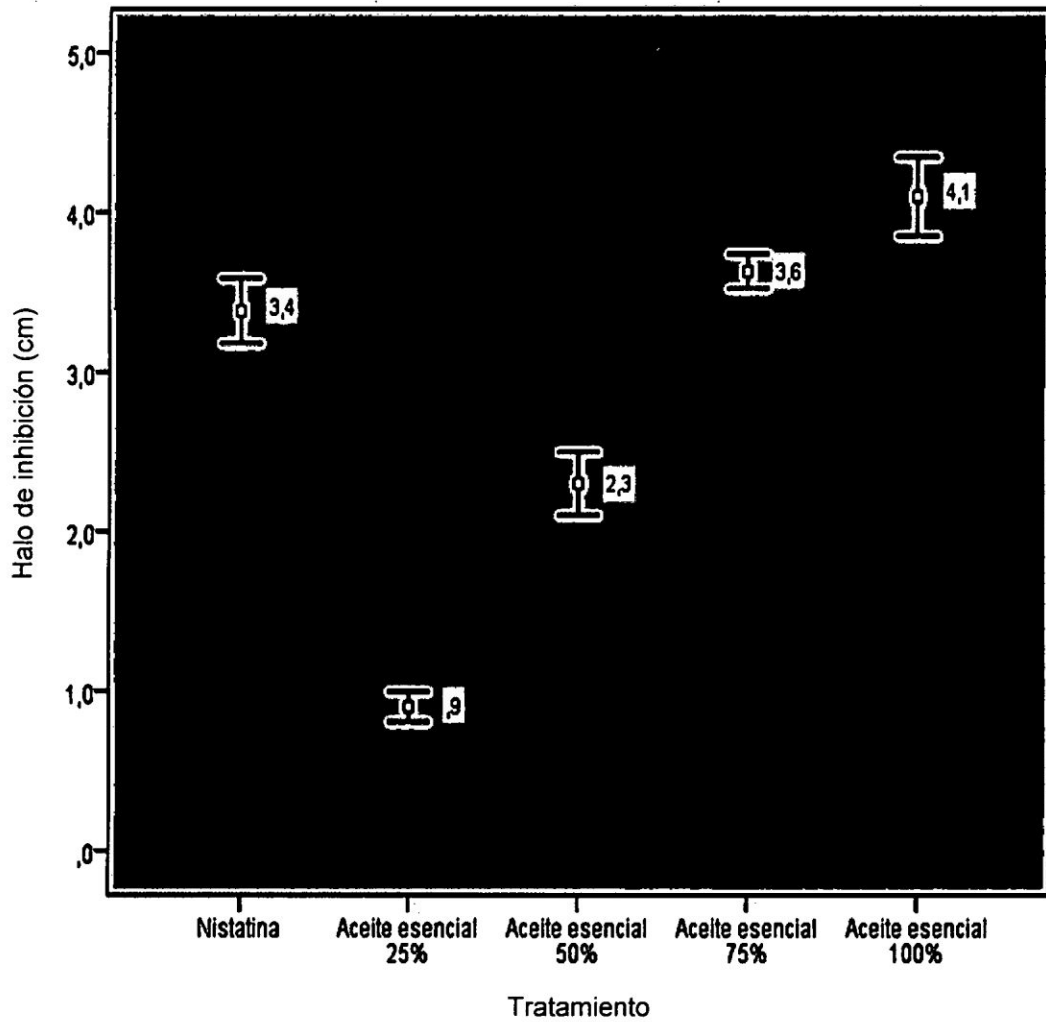


Gráfico 1. Promedio de los halos de inhibición por efecto del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2015.

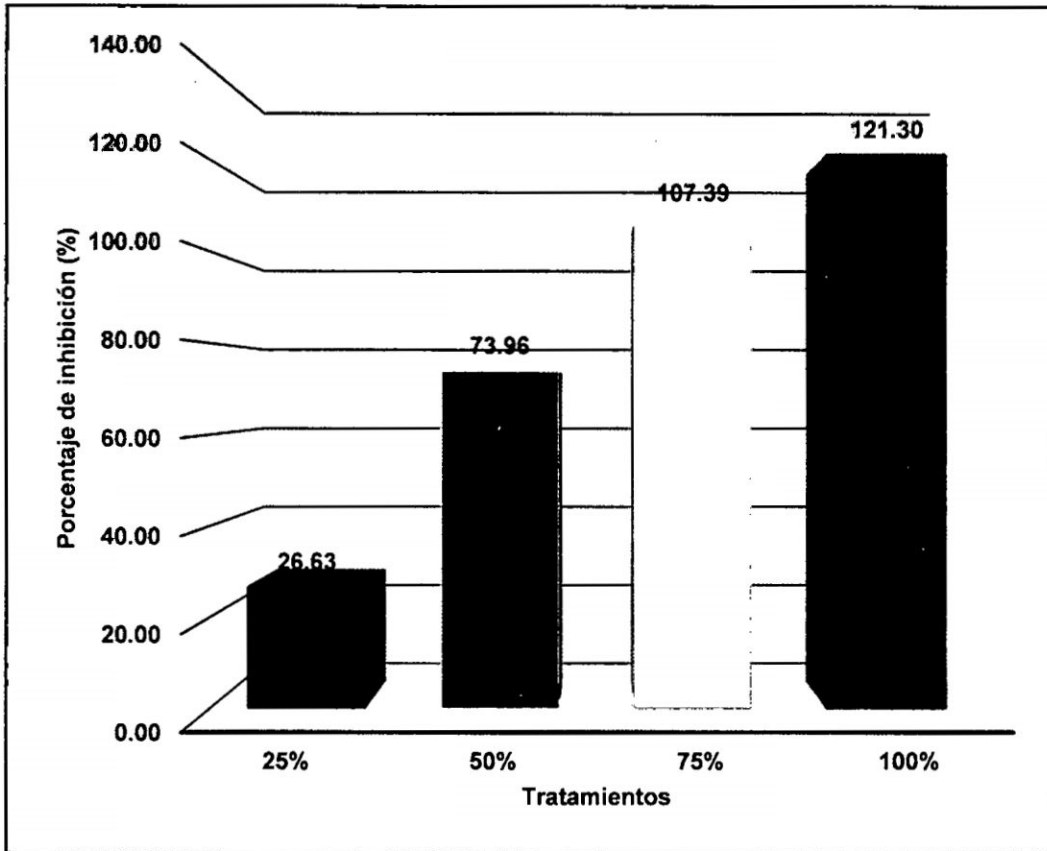


Gráfico 2. Porcentaje de inhibición del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2015.

Cuadro 4. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Fungicida del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2015.

| Tubos | Aceite Esencial (mg/ml) | | | | | |
|-------|-------------------------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|
| | 50% | | 75% | | 100% | |
| 1 | 50,000 | S | 100,000 | S | 150,000 | S |
| 2 | 25,000 | S | 50,000 | S | 75,000 | S |
| 3 | 12,500 | S | 25,000 | S | 37,500 | S |
| 4 | 6,250 | S | 12,500 | S | 18,750 | S |
| 5 | 3,125 | S | 6,250 | S | 9,375 | S |
| 6 | 1,563 | S | 3,125 | S | 4,688 | S |
| 7 | 0,781 | S | 1,563 | S | 2,344 | S |
| 8 | 0,391 | S | 0,781 | S | 1,172 | S |
| 9 | 0,195 | S (CMF) | 0,391 | S | 0,586 | S |
| 10 | 0,098 | R (CMI) | 0,195 | S | 0,293 | S |
| 11 | 0,049 | R | 0,098 | S (CMF) | 0,146 | S |
| 12 | 0,024 | R | 0,049 | R (CMI) | 0,073 | S |
| 13 | 0,012 | R | 0,024 | R | 0,037 | S (CMF) |
| 14 | 0,006 | R | 0,012 | R | 0,018 | R (CMI) |

S: Sensible

R: Resistente

V. DISCUSIÓN

Un estudio realizado sobre el aceite esencial de la orégano, recuperado las hojas, reporta un mayor rendimiento de aceite mediante la extracción por arrastre con vapor, especialmente a medida que se aumenta el flujo y la presión. El aceite esencial de orégano presenta 60 componentes, de los cuales los clasificaron en grupos: "Monoterpenos, sesquiterpenos y fenólicos". De manera que siendo los principales componentes el "timol, carvacrol, cimeno y terpenos".¹⁶

En el estudio realizado se recolectó la muestra de *Origanum vulgare* L. "orégano" que fue recolectada de la provincia de Huanta, que se expenden en el mercado "Nery García Zarate" de la ciudad de Ayacucho se tomó en cuenta estudios de Solís⁶ por poseer mejores propiedades físico-químicas, lo que nos indicará que el aceite esencial presenta mejores condiciones para este estudio.

En el Cuadro 2, se presentan los resultados de las características organolépticas del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano". Bartels¹⁸ señala que el aceite esencial de orégano es amarillo claro, se pone oscuro con el tiempo, olor a especie, sabor amargo producto de la destilación de la planta (hojas secas) mediante el método arrastre de vapor. Los valores obtenidos experimentalmente estuvieron dentro de las características reportadas.

En el Cuadro 3, se presenta los resultados de las determinaciones físico-químicas del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano". Bruneton J.¹⁶ señala que la densidad 0,870-0,910, índice de refracción 1,5020-1,5080; rotación óptica específica -2 a + 3°; ligeramente soluble en agua, soluble en alcohol (2/70%) y aceites; contiene carvacrol (3-17%), germacreno D (6-21%), γ -cadineno 83 - 6%), terpenos, cimeno, *d*-linalool, timol (7%), alcoholes libres (13%) y otros compuestos. Asimismo, señala que los valores del índice de refracción para el aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano",

se encuentran en el rango de 1,5020 – 1,5080. Sin embargo, los valores obtenidos para el mismo están por debajo de los valores reportados, esto se puede deber a una mala deshidratación lo que pudo interferir en la medición del índice de refracción. Las impurezas pudieron ser principalmente remanentes de agua.

Morrison R.⁴⁰, por su parte refiere que los fenoles son ácidos por la capacidad del anillo aromático a estabilizarse por resonancia al anión fenóxido. Precisamente esto se corrobora por que el AEO obtenido tuvo un mayor índice de acidez y una mayor cantidad de compuestos fenólicos como se observa en el cuadro 3.

Dorman y Deans⁴¹, reportan que el aceite esencial de *Origanum vulgare* variedad *hirtum* presenta un compuesto esterificado del carvacrol llamado carvacrol metil éster. Es probable que exista una mayor incidencia de este éster en la composición química del aceite esencial de orégano. El índice de éster obtenido es mayor con resultado de 175,32 mg KOH/g AEO.

En la figura 4, se observa la cromatografía en capa fina realizada al aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano”, revelado con ácido sulfúrico 5% en etanol y vainillina 1% en etanol con resultado positivo manchas de color Azul-Violeta. En comparación con el Rf obtenido se puede determinar que hay presencia de timol.^{35,36}

Robledo E.⁷, evaluó la actividad antifúngica de 9 productos vegetales (extractos, aceites y/u oleorresinas) obtenidos de dos especies del Semidesierto Mexicano: orégano (*Lippia graveolens*) y gobernadora (*Larrea tridentata*), frente a cepas del género *Trichophyton sp.*, *Microsporum sp.* y *Epidermophyton sp.* Comparando su actividad con la terbinafina. El producto que presentó la mayor actividad fue el aceite de orégano, inhibiendo el 100% del crecimiento de las cepas en sus concentraciones 100% (v/v). En nuestro estudio; el aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” en su dilución al 100%, enfrentado con cepas de *Candida albicans* presentó halos de inhibición promedio 4,10 cm de mayor diámetro en comparación con las diferentes diluciones.

El efecto antimicótico del aceite esencial de orégano, coincide con estudios de Saavedra R.² quien concluyo que a partir del 25% del aceite esencial de *Origanum vulgare* “orégano”, produce un porcentaje de inhibición mayor al 50%.

Fernández G.⁹ Evaluación de la actividad de aceites esenciales de eucalipto, orégano, limón y mandarina frente a *Candida albicans*, el estudio sobre la

actividad antifúngica. Los diámetros promedio de los halos de inhibición fueron: orégano 4,2 cm; eucalipto 1,3 cm; mandarina 0,9 cm; limón 2 cm. En conclusión, el aceite esencial de orégano es el que presentó la mayor actividad antifúngica frente a la cepa *Candida albicans* ATCC 10231 seguido de los aceites de eucalipto, mandarina y limón. Este estudio corrobora los resultados obtenidos en el estudio.

Contreras¹⁰ realizó el estudio frente a la actividad antimicótica *in vitro* de tres aceites esenciales contra hongos xilófagos. El aceite esencial (AE) de orégano tuvo un Índice Antimicótico (IA) del 0% en las concentraciones de 20 y 100 ppm, pero el efecto antimicótico fue aumentando al incrementarse la concentración del AE, de tal forma que para la concentración a 400 ppm el IA fue el 100% para el hongo de la pudrición café *C.puteana*. Con este estudio confirmamos que a mayor concentración de aceite esencial mayor efecto antimicótico.

En la Gráfico 2, las medidas de los halos de inhibición de las concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" del 25% (0,9 cm) y 50% (2,3 cm); son menores a la nistatina que presentó 3,38 cm; las concentraciones de 75%(3,6 cm) y 100% (4,1 cm) respectivamente; superior a la nistatina, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$).

En el Gráfico 3, los porcentajes de inhibición del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" correspondientes a las concentraciones 25%, 50%, 75% y 100%, respecto a la nistatina, fueron el 26,63%; 73,96%; 107,39%; 121,30%. Los resultados de los halos de inhibición se determinó la media y la desviación estándar, media \pm desviación estándar. La diferencia entre la media se contrastó con el análisis de varianza al 95% de confianza. La comparación de los halos de inhibición con el estándar de referencia se realizó con la estadística Dunnett (anexo 21). La inferencia de la concentración en los halos de inhibición se evaluó con el estadístico de Duncan.

Respectivamente, determinando que estas concentraciones tienen efecto antimicótico. Sostiene que el tubo transparente que contenga la concentración de droga más baja (máxima dilución) corresponderá a la CMI de la droga. Si los organismos no crecen en las placas querrá decir que han muerto. Esta concentración de la droga será fungicida. El tubo con la concentración fungicida más baja (máxima dilución) corresponderá a la CMF de la droga.

Acharte D.¹⁰ en estudio referente a la actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC

10231, El aceite esencial al 10%, 20% y 30%, presentaron mayor actividad antimicótica, respecto a las demás concentraciones, con halos de inhibición de 20,50 mm; 21,00 mm y 22,50 mm, respectivamente; superior a la nistatina que presentó 19,67 mm, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$). La CMI y CMF del aceite esencial fue 0,122 mg/ml y 0,244 mg/ml, respectivamente.

Los resultados de este procedimiento muestra que en el Cuadro 4 la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Fungicida del el aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231, presentó 0,055 mg/ml y 0,11 mg/ml respectivamente.

VI. CONCLUSIONES

1. El aceite esencial extraído de las hojas de *Origanum vulgare* L. demostró tener actividad antimicótica frente a *Candida albicans* ATCC 10231 y fue dependiente de la concentración ($p < 0,05$).
2. El aceite esencial extraído de las hojas de *Origanum vulgare* L. cumple con las características físico-químicas precisadas en las referencias bibliográficas.
3. El aceite esencial a las concentraciones de 75% y 100% mostraron mayor efecto antimicótico en relación con la nistatina ($p < 0,05$).
4. La Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencia de *Origanum vulgare* L. frente a *Candida albicans* ATCC 10231 fue de 0,055 mg/ml.
5. La Concentración Mínima Fungicida del aceite esencia de *Origanum vulgare* L. frente a *Candida albicans* ATCC 10231 fue de 0,11mg/ml.

VII. RECOMENDACIONES

1. Estudiar en un futuro otras aplicaciones respecto al uso del aceite Orégano, así como las ventajas y desventajas económicas del uso en nuestro país como antimicótico.
2. Realizar estudios de comparación efecto antimicótico del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano" con cepas de *Candida albicans* resistentes a los antimicóticos comerciales.
3. Obtener los aceites esenciales por diferentes métodos de extracción y purificación para optimizar la concentración de compuestos activos y metabolitos responsables de la actividad antimicótica, conocer su lugar de origen, su cultivo, la cosecha, la extracción y su purificación para tener buenos resultados.
4. Realizar estudios de composición química del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano" de diferentes regiones del Perú para determinar el componente que produzca mejor efecto antimicótico.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. Aguilar M., De la Cruz M., Gastélum F., Silva R. y Nevárez G. Efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*Lippia berlandieri Schauer*) y de su aceite esencial sobre cinco especies del género *Vibrio*. [Revista en internet]. 2007 julio-setiembre. [Acceso 25 de julio del 2015]; 30(3). Pág. 261-267. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/610/61003008.pdf>.
2. Saavedra R. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Origanum vulgare* "orégano", Ayacucho 2002. [Tesis para optar Título Profesional]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú 2002.
3. De La Rosa, M. y Prieto, J. Microbiología en Ciencias de la Salud. 2ª ed. Madrid: Elsevier; 2003.
4. Cueto M. Determinación del efecto in inhibitorio del aceite esencial y diferentes extractos de orégano (*Lippia berlandieri shauer*) sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* tanto *en vitro* como en plántulas de tomate. [Tesis para optar el Grado Académico de Doctor]. Universidad Autónoma de Nuevo León. México 2010. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/2099/1/1080177206.pdf>.
5. García F. Cultivo de uso recreativo adaptado de *origanum vulgare* "orégano". Universidad Politécnica De Valencia Escuela Politécnica de Gandia. Valencia 2011.
6. Solís P. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*) y tomillo (*Thymus vulgaris* L.) como potenciales bioconservadores en carne de pollo. [Tesis de Pre Grado]. Escuela Superior de Chimborazo. Ecuador. 2011. Disponible en: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:4euVt8LWGi4J:dsp ace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/1992/1/56T00300.pdf+&cd=3&hl=es-419&ct=clnk&gl=pe>.
7. Robledo E., González M., Elizondo M., Adame J. M.1, y Morales D. Actividad antifúngica *in vitro* de productos vegetales frente a hongos dermatofitos. [Tesis para optar Título Profesional]. Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, Nuevo León. México. 2014. disponible en: http://riit.com.mx/apps/site/files/actividad_antifngica_in_vitro_de_productos_vegetales_frente_a_hongos_dermatofitos_v1.pdf.
8. Palomino, M. y Uribe, C. Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos etanólico e hidroalcohólico de las semillas de *Carica papaya* L. "papaya". [Tesis para optar Título Profesional]. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica. Perú 2007. Disponible en: <http://documents.mx/documents/tesis4.html>.
9. Fernández G., Maurtua D., Aguilar L., Delgado C. y Díaz R. Evaluación de la actividad de aceites esenciales de eucalipto, orégano, limón y mandarina frente a *Candida albicans*. [Tesis para optar Título Profesional]. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Universidad en Lima, Perú 2010. Disponible en: <http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/REH/article/viewFile/1731/1758>.
10. Acharte D. Actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2010. [Tesis para optar Título Profesional]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho. Perú 2010.

11. Contreras C., Gonzáles P. Actividad antimicótica in vitro de tres aceites esenciales contra hongos xilófagos. [Tesis para optar Título Profesional]. Universidad Autónoma Chapingo. México. 2012. Disponible en: http://www.google.com.pe/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj6tvKB2fvLAhVK4SYKHxNOBooQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Ffiles.departamento-de-productos-forest.webnode.es%2F2000014995d7645e706%2FMemoria%2520XIV%2520congreso%2520Chapingo.pdf&usg=AFQjCNGOsHysNq1Zf7WOkFQ0pMZJR_EqhQ&bvm=bv.118817766,d.eWE.
12. Ruiz J. Actividad antifúngica in vitro y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales [Tesis para optar el Grado Académico de Magíster]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos Facultad de Farmacia y Bioquímica Unidad De Post-Grado. Lima, Perú 2013. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/2590>.
13. Gutiérrez, J., Barry, R., BoukE, P., Antimicrobial Activity of Plant Essential Oils using Food model media Efficacy synergistic potential and interaction with food components. [Revista en internet]. 2009 setiembre-octubre. [acceso 19 de octubre de 2015]; 26(1). Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/9149/1/43013611.2012.pdf>.
14. Olaya, J. y Méndez, J. Guía de Plantas y Productos Medicinales. 1ª ed. Colombia: Convenio Andrés Bello; 2003.
15. Kubeczka K. H. Essential Oils Analysis by Capillary Gas Chromatography and Carbon-13 nmr Spectroscopy. 2ª ed. Nueva York: John Wiley; 2002.
16. Bruneton, J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. 1ª ed. España: Acribia. S.A; 1991.
17. Silva VR, Dunford NT. Bioactive components of Mexican Oregano oil as affected by moisture and plant growth. Journal of Essential Oil Research. Mexico. 2005. Disponible en: http://www.archivos.ujat.mx/2016/Divulgacion_cientifica/Perspectiv_UJAT_2015.pdf.
18. Bartels. H. Inspección Veterinaria de la Carne. Zaragoza. 1ª ed. España: Acribia; 1980.
19. Flores J. Farmacología humana. 3ª ed. Madrid: Masson S.A.; 1997.
20. Usos medicinales y aplicaciones curativas del orégano [Página principal en internet]. Plantas para curar; 2015 [Acceso 13 de agosto 2015]. Disponible en: <http://www.plantasparacurar.com/toxicidad-del-oregano/>.
21. Mural, R. El Manual de Microbiología Clínica. 6ª ed. Washington: La Biblioteca de Congreso. Editor Ellen J; 1995.
22. Pumarola, A. Microbiología y Parasitología Médica. 2ª ed. España: MASSON; 1995.
23. Brooks, G., Butel, J. y Morse, S. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 17ª ed. México: El Manual Moderno; 2002.
24. Braude, A. Microbiología Clínica. 1ª ed. Argentina: Médica Panamericana; 1984.
25. Prats, G. Microbiología Clínica. 1era ed. España: Médica Panamericana S.A.; 2006.
26. Camazo, C., López, I. y Díaz, R. Manual Práctico de Microbiología. 3ª ed. España: MASSON S.A.; 2005.
27. Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller M, Microbiología Médica. 6ª Ed. España: Elsevier; 2009.
28. Katzung, B. Farmacología básicos y clínicos. Tomo II. 10ª ed. México: Manual Moderno; 2007.

29. Cotillo, P. Farmacología. Mecanismo de Acción Glosario. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho-Perú. 1998.
30. Forbes, B. Diagnóstico Microbiológico. 12^a ed. Argentina: Médica Panamericana; 2009.
31. Rémington, G. Farmacia. Tomo I y II. 20^a ed. Argentina: Médica Panamericana; 2003.
32. Meyers, F., Jawetz, E. y Goldfien, A. Farmacología clínica. 5^a ed. México: El Manual Moderno, 1982.
33. Velázquez, B. Farmacología Básica y Clínica. 18^a ed. Argentina: Médica Panamericana; 2008.
34. Fitzpatrick. Dermatología en Medicina General. Tomo IV. 7^a ed. Argentina: Médica Panamericana, 2010.
35. Look. Investigación Fitoquímico. 2da ed. Perú: Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
36. Flores A. Hernández A. y Valladares R. Determinación de la actividad antifúngica de aceites esenciales extraídos de *lippia graveolens* (orégano), *rosmarinus officinalis* (romero) y *eucalyptus globulus* (eucalipto) en *microsporum canis trichophyton rubrum* y *epidermophyton floccosum*. [Grado para optar Licenciatura en Química y Farmacia] Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia San salvador. El salvador -centro américa 2004. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/3147/1/16100703.pdf>.
37. Durst. H. D. y otros. Química Orgánica Experimental. 1^a ed. Barcelona: Reverté, S.A.; 1985.
38. Lozina, L., Boehringer, S. y Acosta, O. Extrapolación en una Forma Posológica de valores obtenidos *in Vitro* sobre actividad antifúngica del propóleo. Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. [Revista en internet] 2005 setiembre-diciembre. [Acceso 19 de octubre de 2015]; v-018. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2005/4-Veterinaria/V-018.pdf>.
39. Andrews, J. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy [Revista en internet] 2001 octubre- diciembre. [Acceso 27 de octubre 2015]; 49(6). Disponible en: (Suppl. 1):5-16. 2001. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11420333>.
40. Morrison R. Química orgánica. 4^a ed. México: Del Fondo Educativo Interno americano; 1998.
41. Dormán y Deans. Journal Of Applied Microbiology 8. Antimicrobial Agents From Plants: Antibacterial Activity Of Plant Volatile Oils. Estados Unidos. 1999. Pág. 308-316.

ANEXOS

Anexo 1. Certificado de identificación taxonómica de *Origanum vulgare* L. "orégano".



**EL JEFE DEL HERBARIUM HUAMANGENSIS DE LA FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE
" SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA "**

C E R T I F I C A

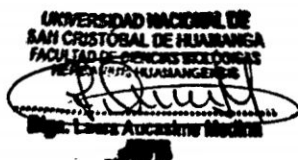
Que, la Bach. en Farmacia y Bioquímica, Srta. Paola Sofia, CÓRDOVA HUAMANÍ, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988. y es como sigue:

| | | |
|-----------|---|----------------------------|
| DIVISIÓN | : | MAGNOLIOPHYTA |
| CLASE | : | MAGNOLIOPSIDA |
| SUB CLASE | : | ASTERIDAE |
| ORDEN | : | LAMIALES |
| FAMILIA | : | LAMIACEAE |
| GENERO | : | Origanum |
| ESPECIE | : | <i>Origanum vulgare</i> L. |
| N.V. | : | "orégano" |

Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

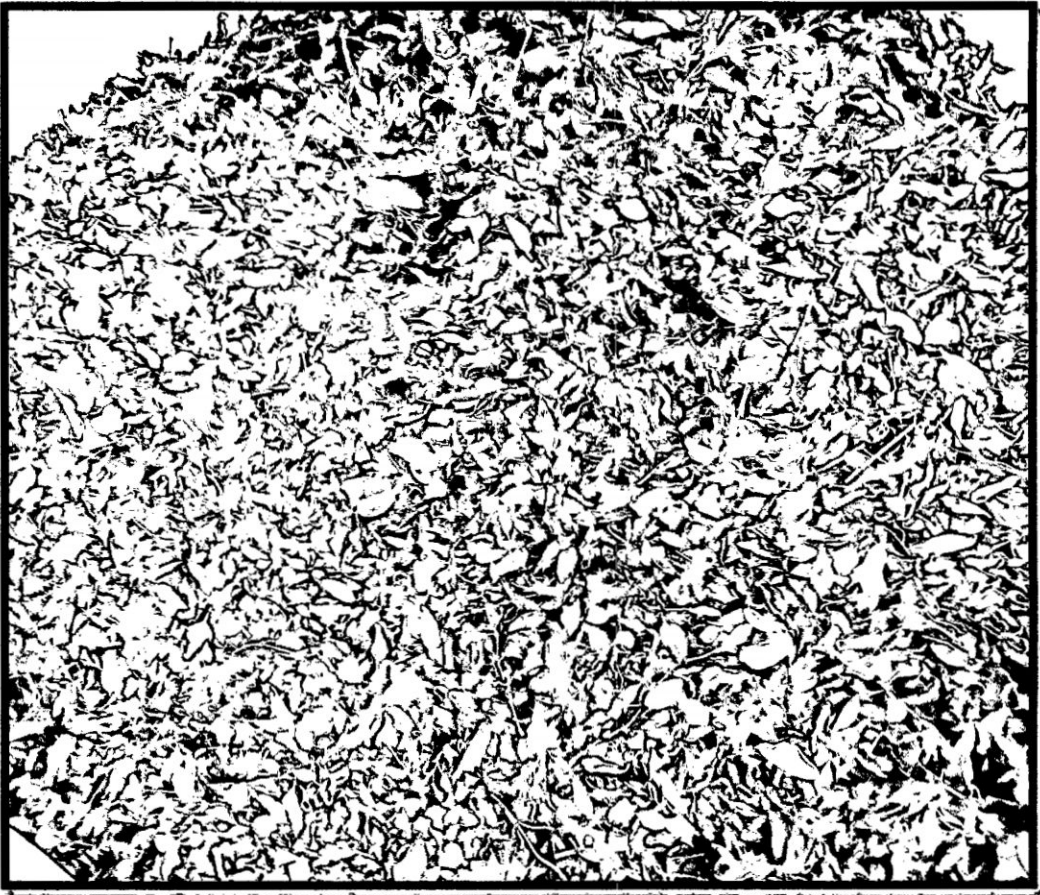
Ayacucho, 10 de Noviembre del 2015



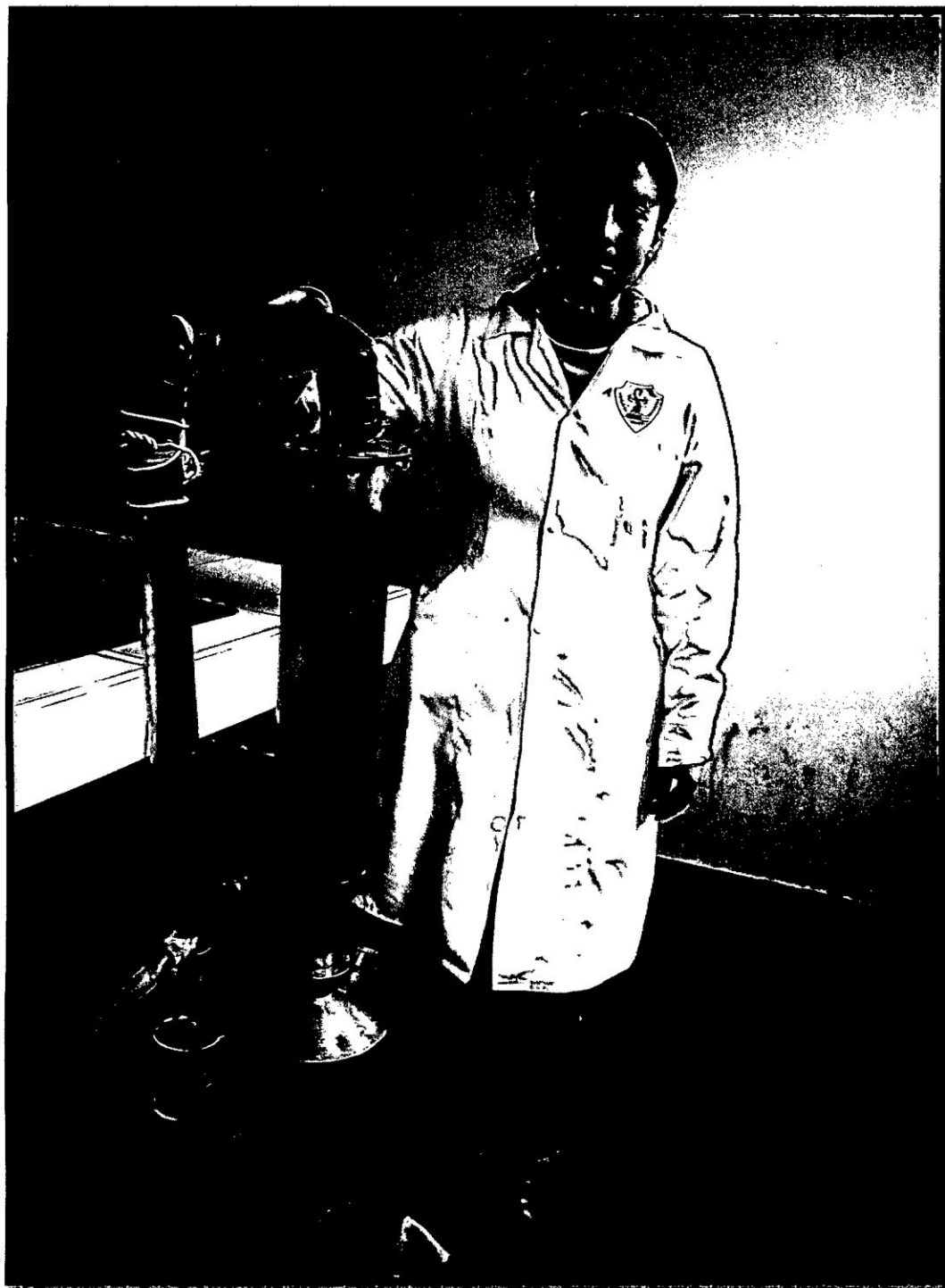
Anexo 2. *Origanum vulgare* L. "orégano" que fueron recolectadas de la provincia de Huanta, que se expenden en el mercado "Nery García Zarate".Ayacucho, 2015.



Anexo 3. Secado de hojas de *Origanum vulgare* L. "Orégano". Ayacucho, 2015.



Anexo 4. Esquema de extracción del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano", por arrastre de vapor en el laboratorio de Farmacognosia. Ayacucho, 2015.

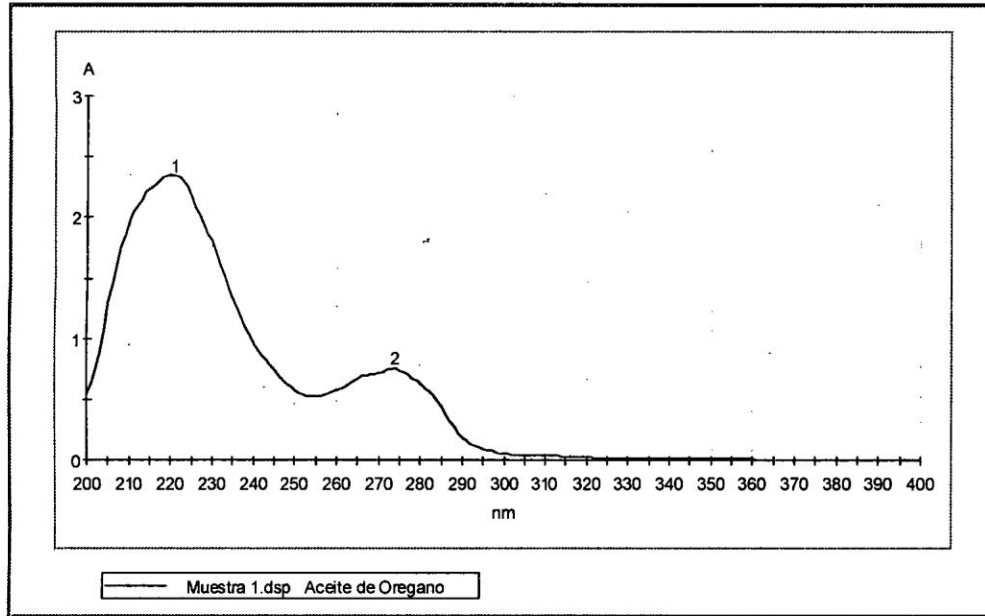


Anexo 5. Aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano". Ayacucho, 2015.



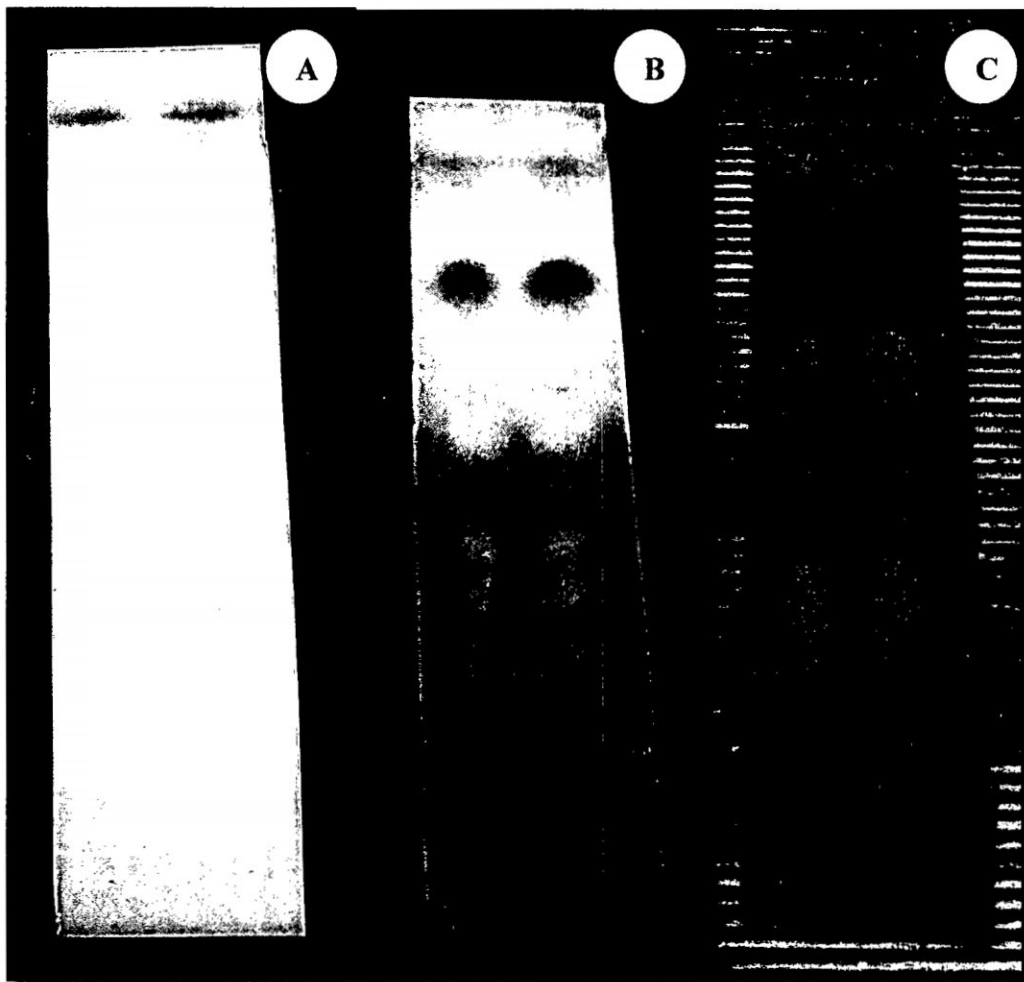
Anexo 6. Curva espectral del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano". Ayacucho, 2015.

Spectrum: Muestra 1.dsp
Description: Aceite de Oregano
Operator: user/FARMACOGNOSIA
Created: 04/11/2015 07:28:08 p.m.
Spectrophotometer: GENESYS 6
Serial number: 2M6H070001
Firmware: 1.200



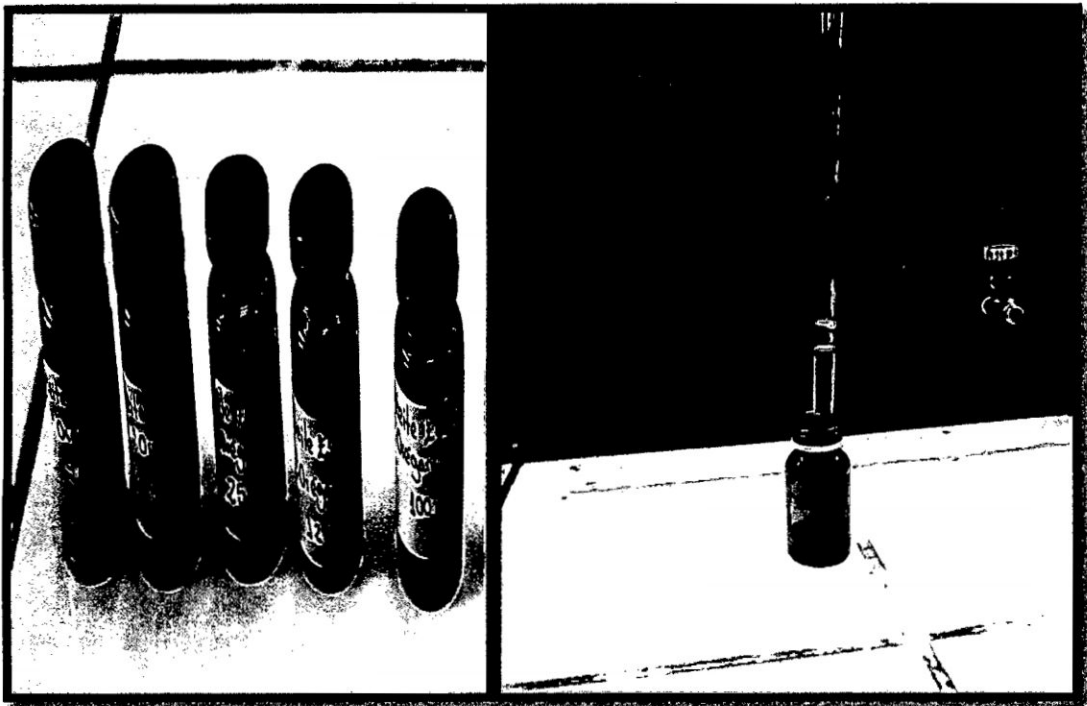
Muestra 1.dsp Aceite de Oregano
Maxima Threshold: 0.01 A
1 221 nm; 2.351 A 2 274 nm; 0.754 A

Anexo 7. Cromatografía en capa fina del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano".

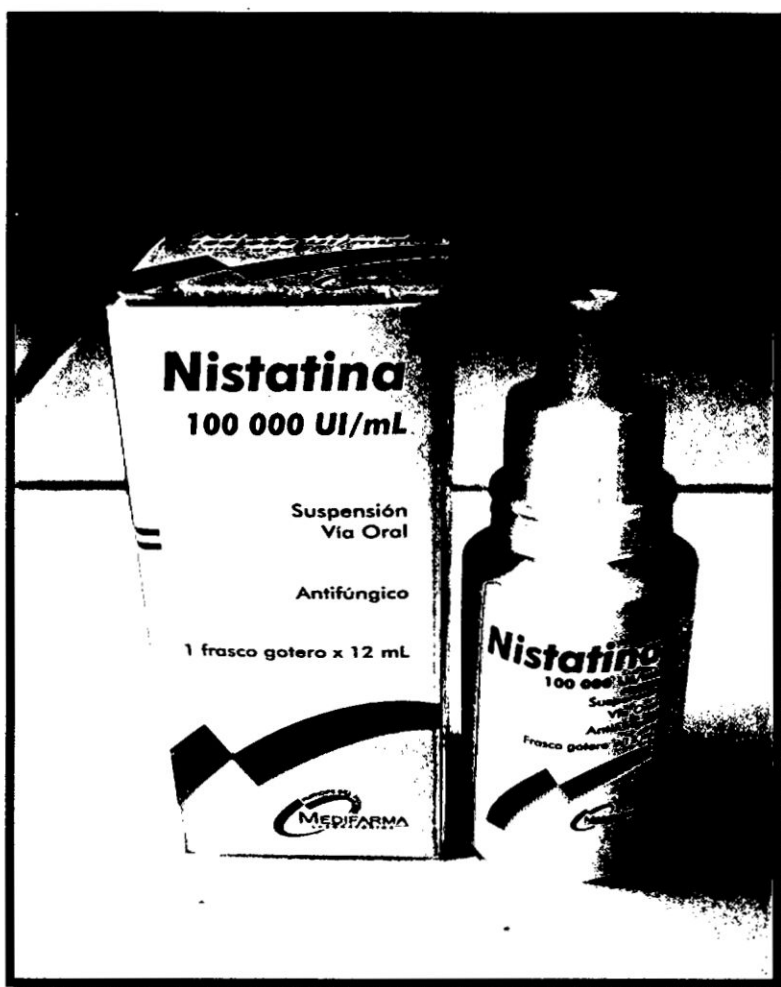


(A) Cromatografía de capa fina revelado con ácido sulfúrico 5% en etanol y vainillina 1% en etanol con resultado positivo manchas de color Azul-Violeta. (B) Cromatografía de capa fina con inflorescencia que permite la visualización de los componentes activos a la luz ultravioleta UV- 254 nm. (C) Cromatografía de capa fina con luz ultra violeta UV-366nm. Ayacucho, 2015.

Anexo 8. Preparación de las diferentes concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano". Ayacucho, 2015.



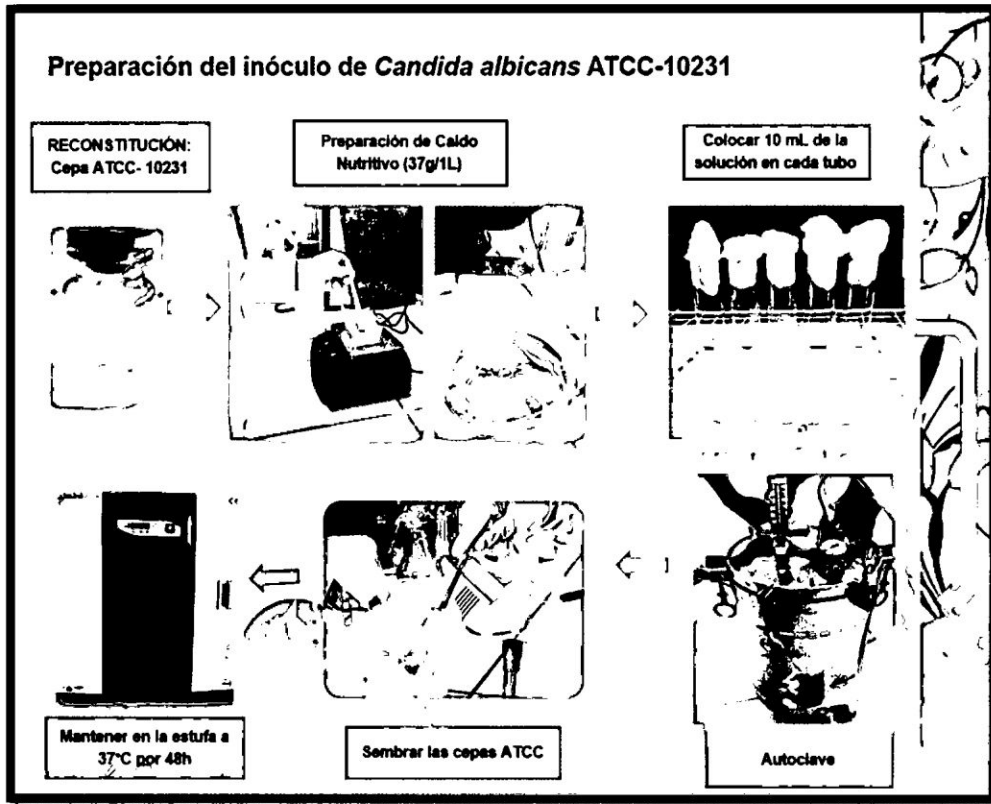
Anexo 9. Nistatina, utilizado como control. Ayacucho, 2015.



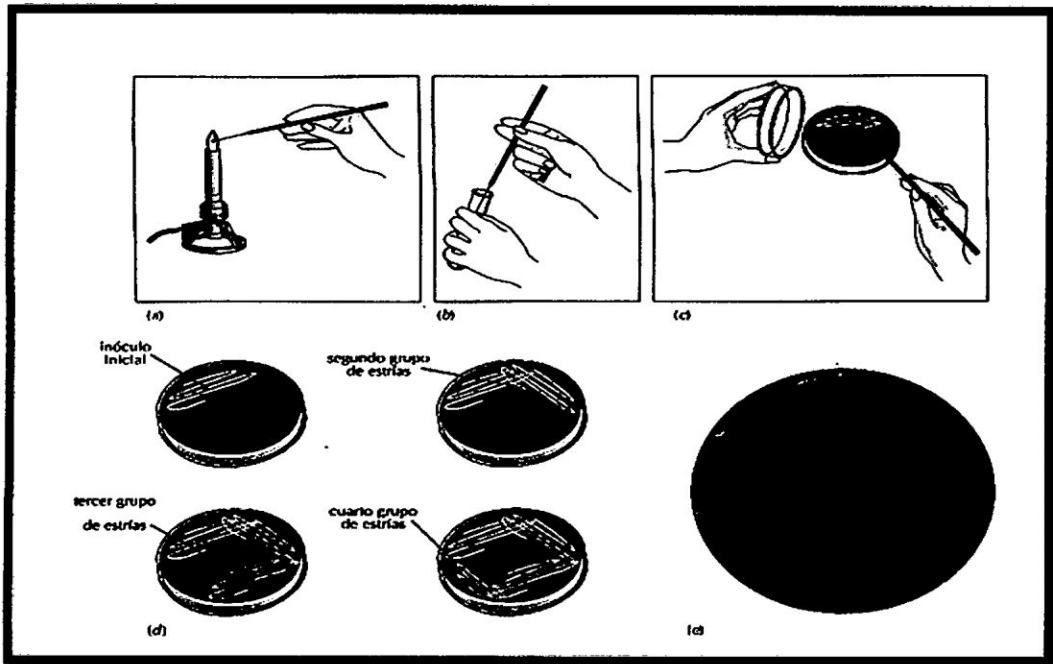
Anexo 10: Cepas de *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2015.



Anexo 11. Esquema de reconstitución de cepas estándar de *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2015.



Anexo 12. Esquema de la técnica de estría cruzada. Ayacucho, 2015.



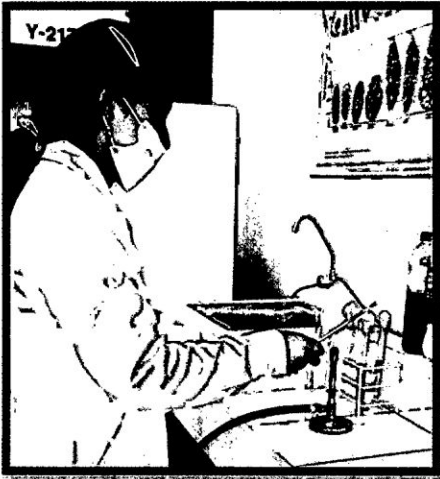
Agar Sabouraud pesar 66g en 1L

La solución colocar en las placas Petri

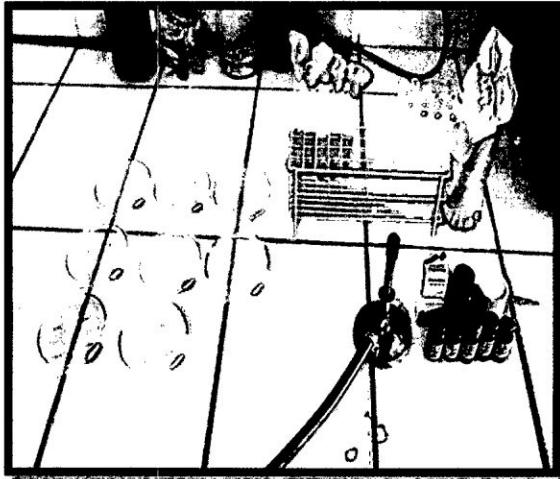
Técnica del sembrado por estrías cruzadas

Placas con sembrado de *Candida albicans*

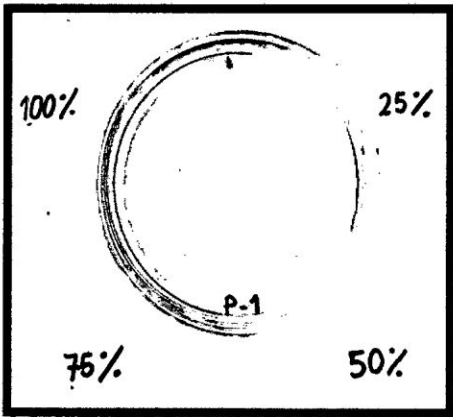
Anexo 13. Procedimiento del método de Kirby-Bauer. Ayacucho, 2015.



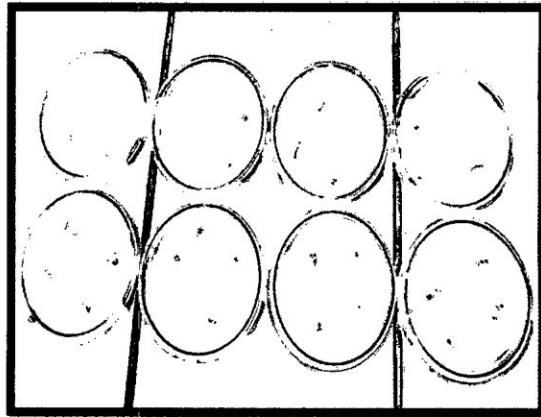
Vertiendo el inóculo por el método del hisopado.



Placas listas para agregar el aceite a diferentes concentraciones.

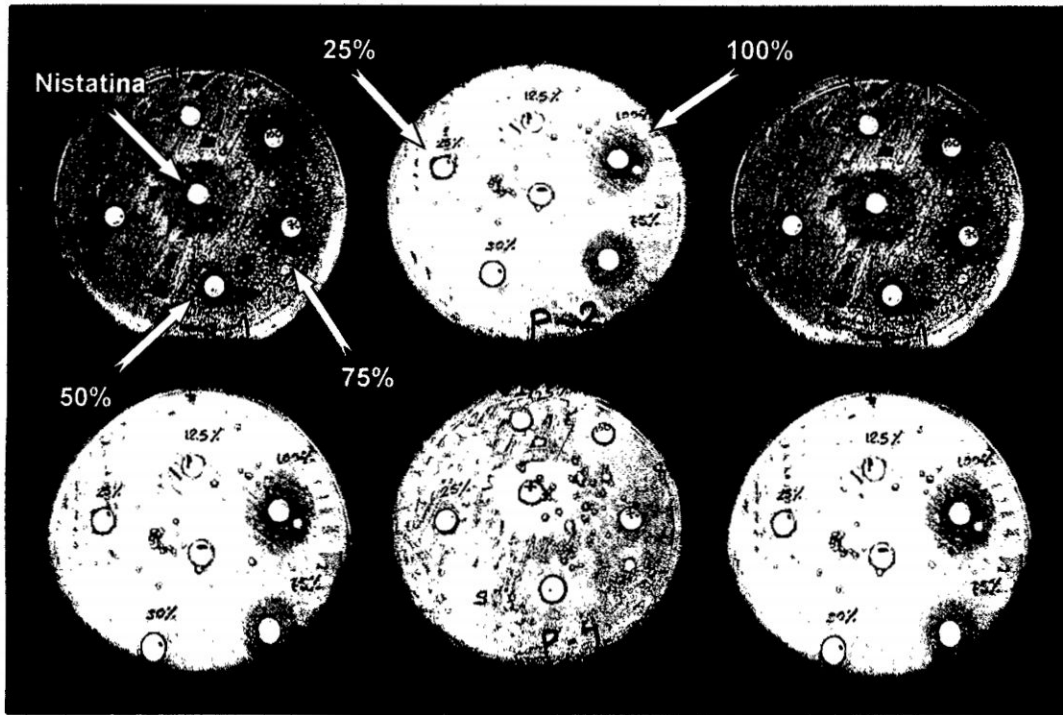


Placas respectivamente identificadas.

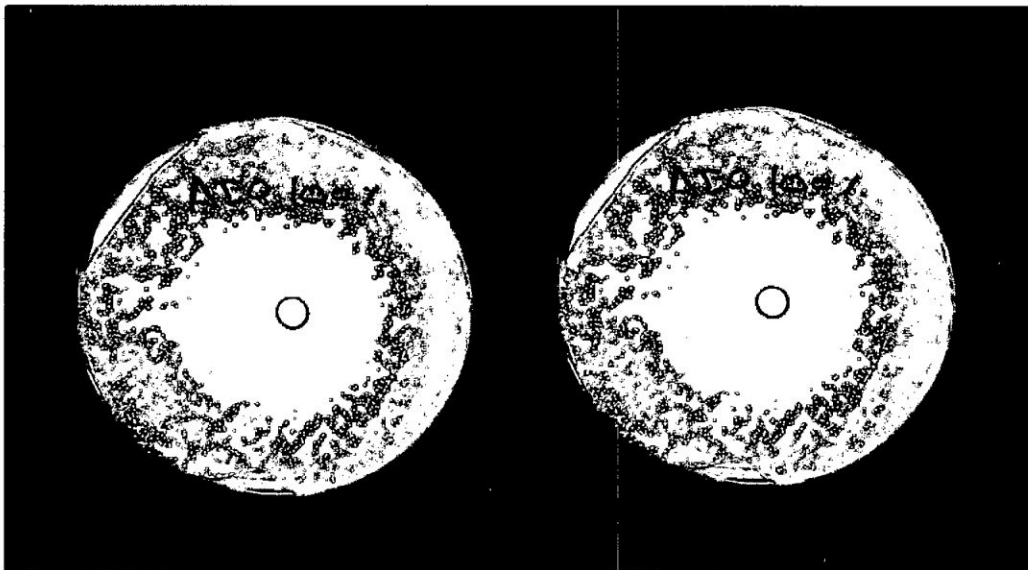


Placas listas para la incubación.

Anexo 14. Halos de inhibición de las concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" y la nistatina, frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2015.

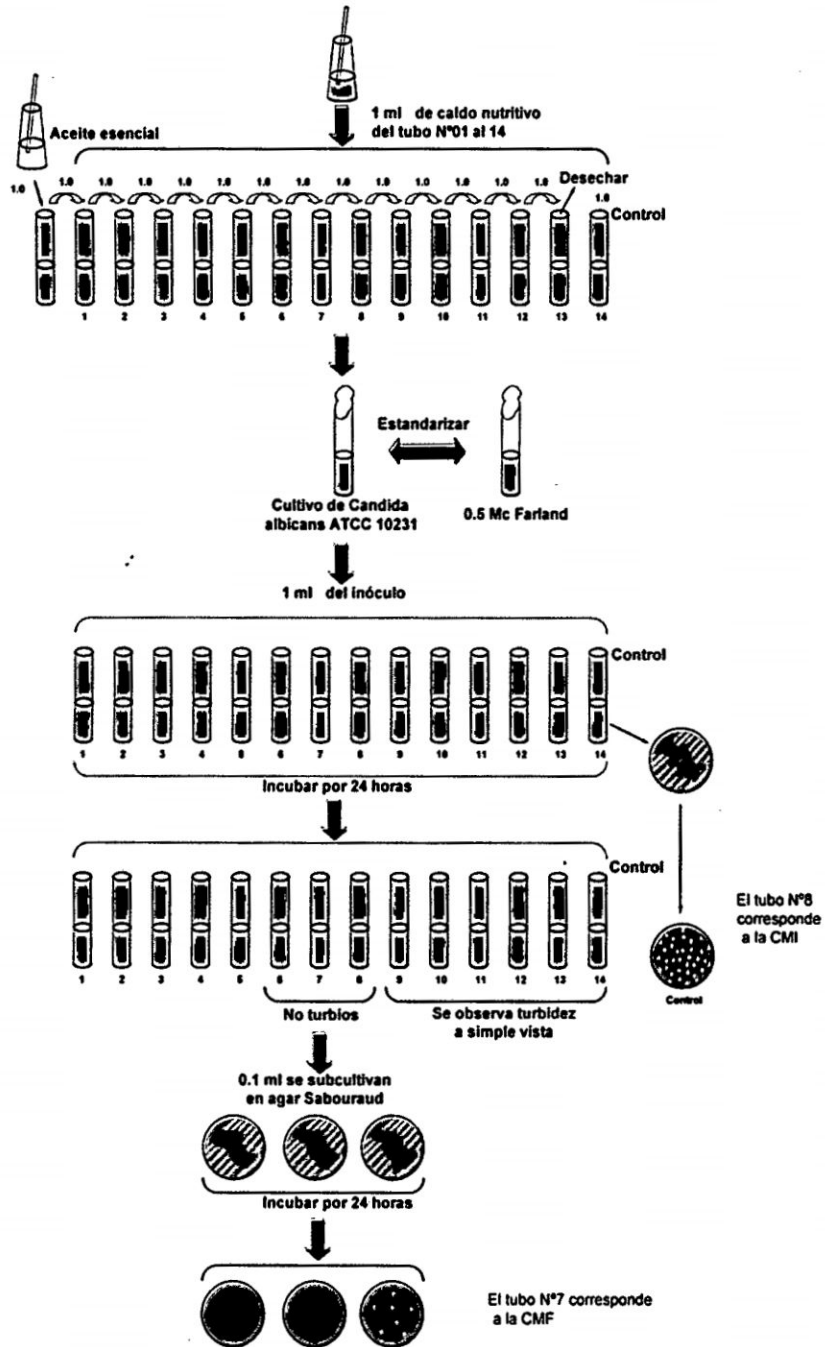


Anexo 15. Halo de inhibición de la concentraciones de 100% del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" y la nistatina, frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2015.

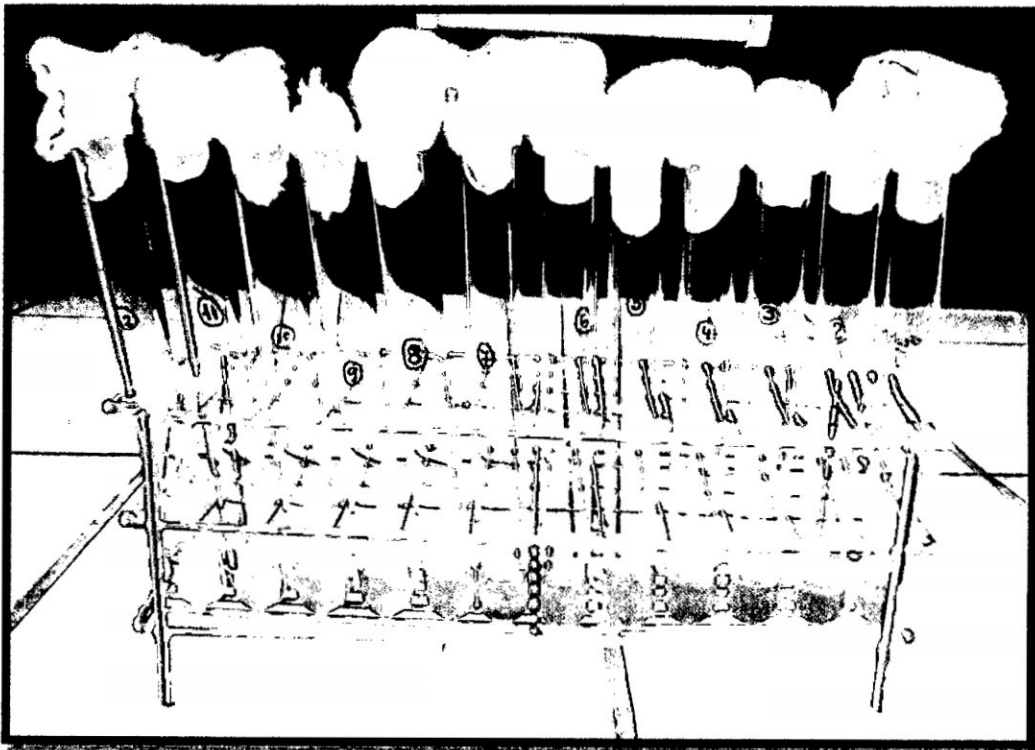


Anexo 16. Protocolo de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la Concentración Fungicida Mínima (CMF). Ayacucho, 2015.

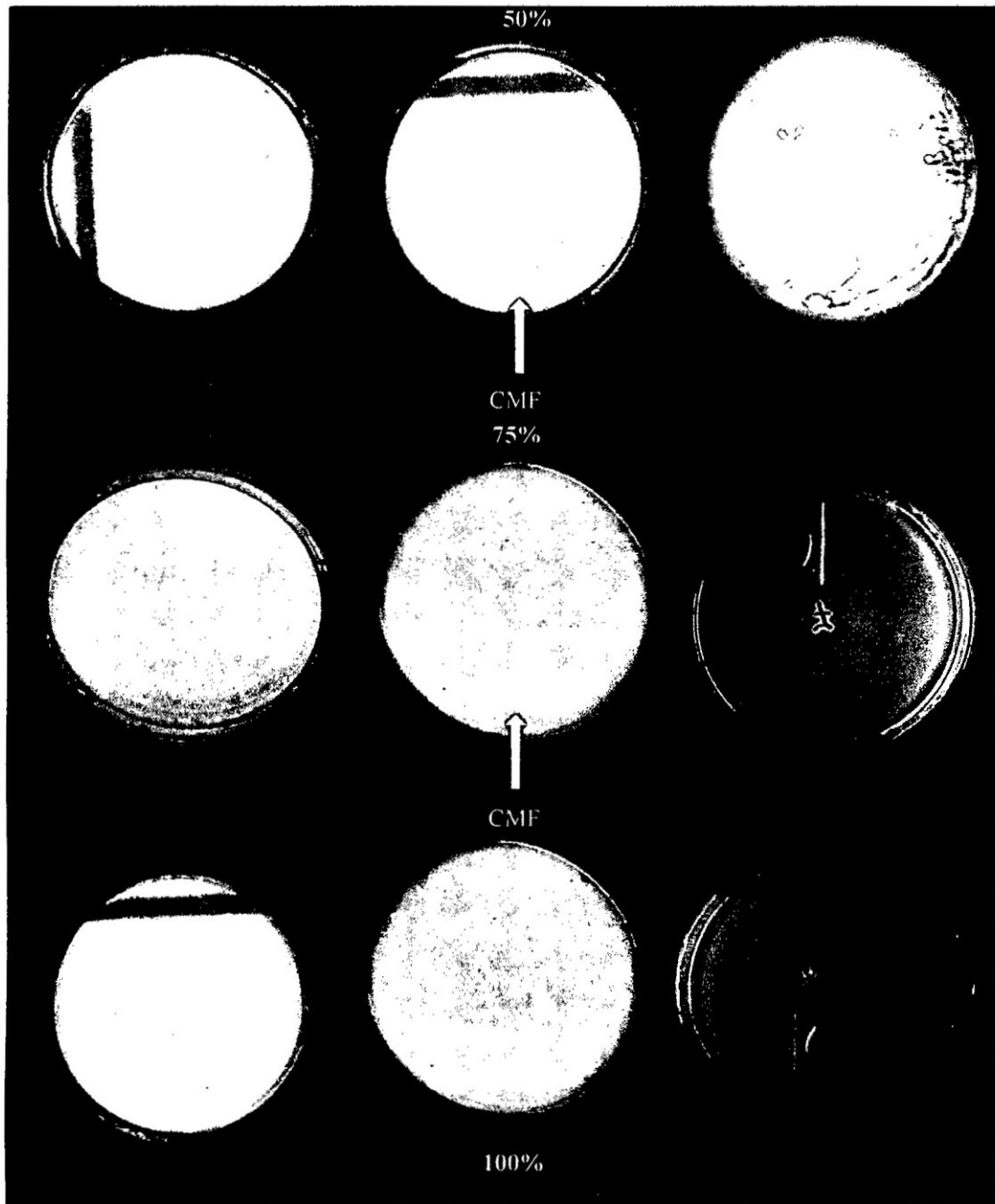
Esquema del procedimiento de la determinación de la CMI y CMF



Anexo 17. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las concentraciones de 50%, 75% y 100% del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano". Ayacucho, 2015.



Anexo 18. Concentración Mínima Fungicida (CMF) de las concentraciones de 50%, 75% y 100%. Ayacucho, 2015.



Anexo 19. Diámetro de los halos de Inhibición del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano", frente a *Candida albicans* ATCC 10231 Ayacucho, 2015.

| Repeticiones | Control (Nistatina) | Concentraciones | | | |
|-----------------------|------------------------|-----------------|------|------|------|
| | | 25% | 50% | 75% | 100% |
| Halos (cm) | | | | | |
| 1 | 3,5 | 1 | 2,5 | 3,6 | 4,5 |
| 2 | 3,0 | 0,8 | 2,3 | 3,6 | 3,8 |
| 3 | 3,4 | 0,9 | 2,0 | 3,8 | 4,0 |
| 4 | 3,5 | 1,0 | 2,2 | 3,5 | 4,1 |
| 5 | 3,4 | 0,8 | 2,3 | 3,7 | 4,0 |
| 6 | 3,5 | 0,9 | 2,5 | 3,6 | 4,2 |
| Media | 3,4 | 0,9 | 2,3 | 3,6 | 4,1 |
| Desv. estándar | 0,18 | 0,08 | 0,17 | 0,1 | 0,22 |
| %CV. | 5,29 | 8,88 | 7,39 | 2,78 | 5,36 |

Anexo 20. Análisis de varianza del número de halos de inhibición de las concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" y del control frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2015.

ANOVA

HALO DE INHIBICIÓN

| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| Entre grupos | 39,388 | 4 | 9,847 | 331,921 | ,000 |
| Dentro de grupos | ,742 | 25 | ,030 | | |
| Total | 40,130 | 29 | | | |

Anexo 21. Prueba de comparaciones múltiples de Dunnett de los halos de Inhibición del efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" y del control frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2015.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: HALO DE INHIBICIÓN

T de Dunnett (bilateral)^a

| (I) TRATAMIENTO | (J) TRATAMIENTO | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig. | 95% de intervalo de confianza | |
|----------------------|-----------------|----------------------------|----------------|------|-------------------------------|-----------------|
| | | | | | Limite inferior | Limite superior |
| Aceite esencial 25% | Nistatina | -2,48333* | ,09944 | ,000 | -2,7426 | -2,2241 |
| Aceite esencial 50% | Nistatina | -1,08333* | ,09944 | ,000 | -1,3426 | -,8241 |
| Aceite esencial 75% | Nistatina | ,25000 | ,09944 | ,061 | -,0092 | ,5092 |
| Aceite esencial 100% | Nistatina | ,71667* | ,09944 | ,000 | ,4574 | ,9759 |

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

a. Las pruebas t de Dunnett tratan un grupo como un control, y comparan todos los demás grupos con este.

Anexo 22. Prueba de comparaciones múltiples de Duncan ^a de los porcentajes de Inhibición del efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2015.

HALO DE INHIBICIÓN

Duncan ^a

| TRATAMIENTO | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | |
|----------------------|---|------------------------------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Aceite esencial 25% | 6 | ,9000 | | | |
| Aceite esencial 50% | 6 | | 2,3000 | | |
| Aceite esencial 75% | 6 | | | 3,6333 | |
| Aceite esencial 100% | 6 | | | | 4,1000 |
| Sig. | | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 6,000.

Anexo 23. Análisis de varianza del porcentaje de inhibición de las concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2015.

ANOVA

HALO DE INHIBICIÓN

| | Suma de cuadrados | Gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| Entre grupos | 37,360 | 3 | 12,453 | 450,120 | ,000 |
| Dentro de grupos | ,553 | 20 | ,028 | | |
| Total | 37,913 | 23 | | | |

Anexo 24: Matriz de consistencia

| TÍTULO | PROBLEMA | OBJETIVOS | MARCO TEÓRICO | HIPÓTESIS | VARIABLES | METODOLOGÍA |
|---|---|---|---|--|---|---|
| Actividad antimicrobica del aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. Ayacucho, 2015. | ¿El aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" presentara efecto antimicrobico frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231? | GENERAL: Evaluar la actividad del aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: 1. Determinar las propiedades fisico-químicas del aceite esencial <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano". 2. Comparar la efectividad antimicrobica de las diferentes concentraciones (25%; 50%; 75% y 100%) del aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" frente a la <i>Nistatina</i> 100 U.I. sobre sepas de <i>Candida albicans</i> . 3. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> "orégano". 4. Determinar la concentración mínima antifúngica (CMF) del aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> "orégano". | HONGO: un organismo eucariota que es miembro del reino fungi. MICOSIS designa a las infecciones causadas por hongos microscópicos CARVACROL El carvacrol (2-metil-5-(1-metilil) fenol) está presente en os aceites esenciales de orégano. Su estructura química esta presentada por un grupo fenólico con un alto poder hidrofóbico. De todos los agentes antimicrobianos naturales, carvacrol es capaz de desintegrar la membrana externa de las bacterias Gram negativas. TIMOL El timol (isopropilmetacresol, o 2-isopropil-5-metilfenol) reportado como un agente antimicrobianos más activos de los constituyentes de los aceites esenciales. | El aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" poseen efecto anticandida frente a <i>Nistatina</i> en el cultivo antifúngico de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. | VARIABLE INDEPENDIENT E: Aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" VARIABLE DEPENDIENTE: Actividad antimicrobica | TIPO DE INVESTIGACIÓN Básico experimenta MÉTODO DE ESTUDIO correlacional POBLACIÓN Y MUESTRA Todas las plantas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" que provienen de la provincia de Huanta, que seexpenden en el mercado "Neri Garcia" de la provincia de Huamanga, distrito de Ayacucho. MUESTRA 5Kg de hoja de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano". TÉCNICAS método de Kirby-Bauer INSTRUMENTO Observacional, Ficha de datos. PROCEDIMIENTO El aceite esencial de las hojas de <i>Origanum vulgare</i> L. "orégano" se obtuvo de hojas de la planta a través del método de arrastre de vapor a partir de muestra seca. PROCESAMIENTO DE DATOS Los datos serán procesados y tabulados en el paquete estadístico SPP versión 21. Pruebas paramétricas: serán evaluados estadísticamente por el método ANOVA, y comparación múltiple de DUNCAN y DUNNETT |

Actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2015.

Autor : Bach. Paola Sofia Córdova Huamani.

Asesor : Mg. Enrique Javier Aguilar Felices

RESUMEN

El presente trabajo es una contribución a la búsqueda de nuevos agentes antimicóticos a partir de productos naturales que se han llevado a investigar. Los objetivos se orientaron a determinar las propiedades físico-químicas, además de evaluar la actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, El tipo de investigación fue experimental. Se desarrolló en los Laboratorios de Farmacognosia y Microbiología de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de junio a noviembre del 2015. La muestra de *Origanum vulgare* L. “Orégano” que fue recolectada de la provincia de Huanta, que se expenden en el mercado “Nery García Zarate” de la ciudad de Ayacucho. El método de extracción del aceite esencial fue por arrastre de vapor de agua y la cepa de referencia fue *Candida albicans* ATCC 10231. La actividad antimicótico se evaluó por el método de disco difusión de kirby-Bauer. Se utilizaron discos de papel embebidos con el aceite esencial a 25%, 50%, 75 % y 100 % respectivamente y como control se utilizó un disco de nistatina. Los halos de inhibición fueron 0,90 cm; 2,30 cm; 3,63 cm y 4,10 cm y para la nistatina 3,38 cm respectivamente. Se hallaron diferencias estadísticas entre los porcentajes de los halos de inhibición (ANOVA, $p < 0,05$), en comparación con el estándar nistatina (Dunnett, $p < 0,05$) y el efecto de la concentración (Duncan, $p < 0,05$). Asimismo, la Concentración Mínima Inhibitoria fue 0,055 mg/ml y la Concentración Mínima Fungicida fue 0,11 mg/ml. Se concluye que el aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano” tiene actividad sobre *Candida albicans* ATCC 10231 y que el efecto es dependiente de la concentración.

Palabras clave: *Origanum vulgare* L. “orégano”, *Candida albicans* ATCC 10231, actividad antimicótica.

Antifungal activity of essential oil of *Origanum vulgare* leaves L. "oregano" against *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2015.

SUMMARY

This paper is a contribution to the search for new antifungal agents from natural products that have been investigated. The objectives were aimed to determine the physico-chemical properties in addition to evaluating the antifungal activity of essential oil of *Origanum vulgare* leaves L. "oregano" against a strain of *Candida albicans* ATCC 10231, the research was experimental. Was developed in the Laboratory of Pharmacognosy and Microbiology of the National University San Cristobal de Huamanga, during the months of June to November 2015. The sample of *Origanum vulgare* L. "oregano" that was collected from the province of Huanta, which are sold market "Nery Garcia Zarate" in the city of Ayacucho. The method of extraction of essential oil by steam was water and the reference strain ATCC 10231. *Candida albicans* was antimycotic activity the evaluated by disk diffusion method Kirby-Bauer. Paper discs embedded with essential oil at 25%, 50%, 75% and 100% respectively and were used as a control disk used nystatin. The inhibition halos were 0.90 cm; 2.30 cm; 3.63 cm and 4.10 cm and 3.38 cm respectively nystatin. Statistical differences between the percentages of inhibition halos (ANOVA, $p < 0.05$), compared to nystatin standard (Dunnett, $p < 0.05$) and the effect of concentration (Duncan, $p < 0, is found 05$). In addition, the minimum inhibitory concentration was 0.055 mg / ml and the minimum concentration Fungicide was 0.11 mg / ml. It is concluded that the essential oil of *Origanum vulgare* L. "oregano" has activity against *Candida albicans* ATCC 10231 and that the effect is concentration dependent.

Keywords: *Origanum vulgare* L. "oregano" ATCC 10231 *Candida albicans*, antifungal activity.

Correspondencia:

Paola Sofia Córdova Huamani: sofi_miestrella_1991@hotmail.com
Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.
Facultad de Ciencias de la Salud - Av. Independencia s/n.

INTRODUCCIÓN

Durante la última década se ha observado un incremento de las enfermedades micóticas, sobre todo las de tipo oportunista, ello ha significado la aparición de nuevas formas clínicas de micosis así como localizaciones o presentaciones no habituales.¹ Las infecciones fúngicas sistémicas y dérmicas son la causa de gran morbimortalidad en este tipo de pacientes.² Los fármacos disponibles actualmente, tiene una toxicidad importante, producen recurrencia o causan resistencia, razón por la cual se está procurando nuevos agentes antifúngicos más potentes pero sobretodo más seguros que los existentes actualmente.² La candidiasis, es la infección causada por levaduras del género *Candida*, siendo las más frecuentes las infecciones causadas por *Candida albicans*. Esta infección (la más frecuente de las micosis oportunistas) puede localizarse en la mucosa oral (muguet), vaginales, esofágicas, etc. Es frecuente en diabéticos, tras tratamientos con antibióticos o en pacientes inmunodeprimidos.³

En el mundo un gran número de especies a las que se designan con el nombre de orégano, el género más característico es el *Origanum*, teniendo múltiples usos: condimento en la industria de los alimentos, plantas decorativas, aromatizantes en la industria de perfumes o aromas, producción de aceites esenciales y oleorresinas.⁴ Actualmente muchas especies y hierbas, en particular de la familia *Lamiaceae*, a la que pertenece el orégano, han sido evaluadas como antimicrobianas.⁴ El timol y el carvacrol son los compuestos principales.¹ La actividad antimicótica también es afectada por el tipo, composición y concentración del aceite esencial, el tipo y concentración del microorganismo seleccionado, la composición del sustrato, y las condiciones de procesamiento y conservación.⁵

Los aceites esenciales fueron conocidos desde la antigüedad por sus cualidades microbicidas (capacidad de matar microorganismos) y regeneradoras entre otras propiedades. Su nombre proviene de la *quinta essentia* (quinta esencia) ya que era considerada un elemento de vida después del agua, la tierra, el fuego y el viento.⁵

Teniendo en cuenta la incidencia de micosis que existe en nuestra población, por ello se realizó la presente investigación con el propósito de determinar la actividad

antimicótica del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. “orégano”; de tal manera que se pueda ofrecer como alternativa a cepas de *Candida albicans* resistentes a los antimicóticos, por lo cual los objetivos fueron:

1. Determinar las propiedades físico-químicas del aceite esencial extraído de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano”.
2. Comparar la efectividad antimicótica de las diferentes concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%) del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” frente a la nistatina 100 000 U.I. sobre cepas de *Candida albicans*.
3. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano”.
4. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano”

MATERIALES Y MÉTODOS

LUGAR DE EJECUCIÓN

El presente trabajo de investigación se realizó en los Laboratorios de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud. Específicamente en el laboratorio de Farmacognosia y en el laboratorio de Microbiología de la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas, Facultad de Biología de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, durante los meses de junio a noviembre del 2015.

MATERIALES

Población

Las plantas en buen estado de *Origanum vulgare* L. “orégano” que fueron recolectadas de la provincia de Huanta, que se expenden en el mercado “Nery García Zarate” del distrito de Ayacucho, de la provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho.

Muestra

5 Kg de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano”. Tipo de muestreo no probabilístico por conveniencia

La identificación taxonómica de la especie fue emitida por el Jefe del *Herbarium Huamangensis* de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

Microorganismo de ensayo

Cepas de *Candida albicans* ATCC 10231 proporcionadas por el Área de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga.

DISEÑO METODOLÓGICO

Procedimiento para la recolección de muestra

Las plantas en buen estado de *Origanum vulgare* L. "orégano" que fueron recolectadas de la provincia de Huanta, que se expenden en el mercado "Nery García Zarate" del distrito de Ayacucho, de la provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho. Las hojas fueron lavadas con agua fría para luego, ser secada en un medio ambiente fresco fuera del alcance de la contaminación, durante un período de 8 días hasta obtener el producto completamente seco y homogéneo.⁵

Las muestras fueron transportadas a los laboratorios de Farmacia de la Facultad de Ciencias de la Salud.

Obtención del aceite esencial

El aceite esencial de "orégano" (AEO) fue extraído de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" a través del método de arrastre de vapor de agua a partir de muestra seca, utilizando un equipo especialmente diseñado y adaptado.⁶

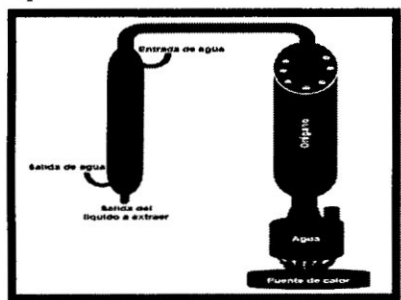


Figura 1. Esquema de la extracción de aceites esenciales de orégano por arrastre de vapor.

DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES FÍSICO-QUÍMICAS

Características Organolépticas

Características propias del aceite esencial en cuanto a su aspecto, color, sabor y olor.²

Determinación de densidad

Se determinó la densidad por el método del picnómetro. Se pesó el picnómetro vacío y seco para posteriormente ser llenado con agua destilada y ser vuelto a pesar. Seguidamente, luego de ser vaciado y secado, se le llenará con el aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano" y se volverá a pesar. Todo este procedimiento se llevara a cabo a 20 °C.⁷

$$p = \frac{(mp + d) - mp}{(mp + w) - mp} \times pw$$

Donde:

La masa del picnómetro vacío (mp)

La masa del picnómetro enrasado con agua (mp+w)

La masa del picnómetro enrasado con disolución o muestra problema (mp+d)

Densidad del agua (pw) = 1

Determinación del índice de refracción

Índice de refracción (n) de una sustancia es el cociente entre la velocidad de la luz en el aire y la velocidad de la luz en la sustancia. Es importante para la identificación de sustancias y la detección de impurezas. Se determinará haciendo uso del refractómetro, este a su vez dará el contenido de aceite esencial de orégano en la muestra.⁷

Índice de éster

Se fundamenta en la neutralización, por una base, de los ácidos liberados en la hidrólisis de los ésteres contenidos en 1g de aceite esencial. La técnica seguida, según su recomendación, fue la siguiente: A un volumen equivalente a 1g de AEO se le agregó 25mL de KOH etanólico al 0,5N y 5 gotas del indicador fenolftaleína para luego ser reflujado por 1 hora, al término del cual se dejó enfriar. Se tituló con HCl 0,5N hasta la aparición de un coloración persistente. Paralelamente se hizo un blanco.²

$$\begin{aligned} \text{Índice de éster} &= \text{Í. saponificación} \\ &\quad - \text{Í. de acidez} \\ &= \frac{\text{Í. saponificación}}{P} \\ &= \frac{(v1 - v2) \times 0,5N \times 56,1}{P} \end{aligned}$$

Donde:

HCl utilizado en el blanco (v1)

HCl utilizado con la muestra (v2)

Peso de la muestra en gramos (P)

Índice de acidez

Se fundamente en la neutralización de ácidos libres contenidos en 1g de aceite esencial. La técnica seguida y recomendada por la misma fue la siguiente: A un volumen equivalente a 1g de aceite esencial de orégano se le agrego 5mL de alcohol medicinal y 5 gotas de indicador fenolftaleína. Posteriormente se tituló con KOH etanólico al 0,1N hasta que apareció una coloración persistente por 30 segundos. Se hizo paralelamente un blanco.²

$$\text{Í. acidez} = \frac{G \times N \times 56,1}{P}$$

Donde:

Gasto de KOH (G)

Normalidad de KOH (N)

Peso de la muestra en gramos (P)

CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DEL ACEITE ESENCIAL

Identificación de los componentes del aceite por cromatografía de capa fina.

Se detectarán los componentes de los aceites por la coloración que presenten las manchas generales luego de ser rociada por un detector químico.

- Muestra: aceite obtenido por arrastre por vapor
- Estándar: muestra comercial de aceite de Orégano
- Fase estacionaria: cromatografía de sílica Gel y placas cromatografías de sílica gel.
- Fase móvil: Tolueno – Acetato de Etilo (93:7)
- Soluciones reveladoras:

A. Ácido sulfúrico 5% en etanol

B. Vainillina 1% en etanol

Preparación de las soluciones reveladoras:

- Solución A: ácido sulfúrico al 5%

Colocar 5mL de ácido sulfúrico en un balón de 100ml

Diluir con etanol 95°

Llevar a volumen

- Solución B: vainillina al 1%

Pesar 1,0g de vainillina

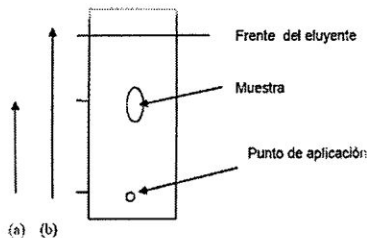
Disolverla en Etanol a 95°

Rociar las placas primero con la solución A y luego con la solución B. colocar las placas en una estufa a 105 °C por 5 minutos y observar las coloraciones formadas.

Resultado positivo: manchas de color Azul-Violeta.^{8,9}

Rf

$$Rf = \frac{(a) \text{ distancia que recorre la muestra desde el punto de aplicación}}{(b) \text{ distancia que recorre el disolvente hasta el frente del eluyente}}$$



DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Origanum vulgare* L. "orégano"

Según la metodología de Lozina et al (2005)¹⁰, para la determinación de los halos de inhibición: Palomino y Uribe (2007)¹¹, para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Fungicida (CMF).

PREPARACIÓN DE LAS DILUCIONES

Para la muestra

Para la determinación de la actividad antimicótica se prepararon concentraciones al 25%, 50%, 75% y 100% peso sobre volumen (v/v) del aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano" diluidos en Tween 80 al 2% como solvente y emulsificante.

Para la determinación de la CMI y CMF, las diluciones hechas para el aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano" se realizó de acuerdo al requerimiento del microorganismo control.

Preparación del inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231

Se procedió a seleccionar las colonias del agar de cultivo, se tocó la colonia *Candida albicans* ATCC 10231 por arriba con una asa y el crecimiento se transfirió a un tubo con 4 a 5 ml de caldo nutritivo, se incubó a 37 °C por 24 horas. La turbidez del caldo se ajustó con el caldo nutritivo obteniéndose así una turbidez ópticamente similar al estándar de 0,5 de la escala de McFarland. Se realizó este paso visualmente, teniendo en cuenta la luz adecuada, comparando así el inóculo con el estándar de 0,5 de la escala de McFarland contra un fondo blanco.¹⁰

Determinación del halo de inhibición

En cada una de las placas petri se colocaron 20 ml de agar Sabouraud, por medio de estria cruzada se agregó la suspensión de *Candida albicans* ATCC 10231. Se embebió los discos de papel filtro con las concentraciones del aceite esencial de 25%, 50%, 75% y 100% y con el control positivo que fue la nistatina 100 000 U.I. Se realizó la incubación a 37 °C y se realizó la observación de los halos de inhibición a las 48 horas, luego se procedió a la medición del diámetro del halo formado. Aquellos que tuvieron halos de inhibición similar o superior a la nistatina, se utilizará para determinación de la CMI y CMF.¹⁰

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

CMI es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento de un microorganismo después de su incubación. La Concentración Mínima Inhibitoria es importante en diagnósticos de laboratorio para confirmar la resistencia de microorganismos a un agente antimicrobiano y además para monitorizar la actividad de los nuevos agentes antimicrobianos.¹²

El cultivo de *Candida albicans* ATCC 10231 fue ajustado al estándar de 0,5 de la escala de McFarland. Para hallar la CMI se prepararon 15 tubos previamente esterilizados y rotulados del número 1 al número 15. A continuación se detalló el procedimiento:

- A partir del tubo N° 1 hasta el tubo N° 15 se agregó 1 ml del Caldo Nutritivo
- Posteriormente se agregó 1 ml de la concentración del aceite esencial al tubo N° 1, a partir del cual se traspasó 1 ml al tubo N° 2 y así sucesivamente hasta el tubo N° 14, del tubo N° 14 se extrajo 1 ml y se descartó. El tubo N° 15 no recibió aceite esencial siendo éste el control.
- Luego se agregó 1 ml del inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231 a todos los tubos y se llevó a incubación a 37°C por 24 horas.¹⁴

| Tubos | Aceite esencial (mg/ml) | | |
|-------|-------------------------|---------|---------|
| | 50% | 75% | 100% |
| 1 | 50,000 | 100,000 | 150,000 |
| 2 | 25,000 | 50,000 | 75,000 |
| 3 | 12,500 | 25,000 | 37,500 |
| 4 | 6,250 | 12,500 | 18,750 |
| 5 | 3,125 | 6,250 | 9,375 |
| 6 | 1,563 | 3,125 | 4,688 |
| 7 | 0,781 | 1,563 | 2,344 |
| 8 | 0,391 | 0,781 | 1,172 |
| 9 | 0,195 | 0,391 | 0,586 |
| 10 | 0,098 | 0,195 | 0,293 |
| 11 | 0,049 | 0,098 | 0,146 |
| 12 | 0,024 | 0,049 | 0,073 |
| 13 | 0,012 | 0,024 | 0,037 |
| 14 | 0,006 | 0,012 | 0,018 |

Cuadro 1. Concentraciones decrecientes de las diluciones del aceite esencial.¹²

Determinación de la Concentración Fungicida Mínima (CMF)¹²

CMF es la reducción de 99,9% en las unidades formadoras de colonia. Este es el criterio que se usa para bacterias y algunos lo utilizan para los hongos.³⁸

Para determinar la Concentración Mínima Fungicida (CMF) se procedió a partir de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), realizándose de la siguiente manera:

- Luego de haber observado la turbidez a simple vista, se procedió a sembrar con la ayuda del asa, los caldos no turbios en las placas con agar Saboraud.¹¹
- Posteriormente se incubó a 37°C por 24 horas.¹¹

Diseño experimental

Para el presente trabajo, se formó cinco grupos y cada grupo de seis repeticiones con *Candida albicans* ATCC 10231, distribuido de la siguiente manera:

- Grupo I : Control positivo tratado con nistatina
- Grupo II : Aceite esencial a 25% de concentración
- Grupo III : Aceite esencial a 50% de concentración
- Grupo IV : Aceite esencial a 75% de concentración
- Grupo V : Aceite esencial a 100% de concentración

Para determinar el efecto antimicótico se procedió a medir el diámetro de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones de la muestra y del control positivo, los que nos permitió determinar la concentración ideal que muestre una mayor eficacia antimicótica en relación a la nistatina tomado como patrón.¹²

Para el cálculo de porcentaje de inhibición se usó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Diámetro de inhibición de la muestra}}{\text{Diámetro del halo control}}$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados del porcentaje de los halos de inhibición se determinó la media y la desviación estándar, media \pm desviación estándar. La diferencia entre la media se contrastó con el análisis de varianza al 95% de confianza. La comparación de los halos de inhibición con el estándar de referencia se realizó con la estadística Dunnett. La diferencia de la concentración en los halos de inhibición se evaluó con el estadístico de Duncan.

RESULTADOS

Cuadro 2. Características organolépticas del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano". Ayacucho, 2015.

| Características | Descripción |
|-----------------|--------------------------|
| Aspecto | Líquido y viscoso |
| Color | Amarillo claro |
| Olor | Característico (especie) |
| Sabor | Característico (amargo) |

Cuadro 3. Constantes físico-químico del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano”. Ayacucho, 2015.

| Características | Resultados |
|----------------------|----------------------|
| Densidad | 0,873 g/ml |
| Índice de Refracción | 1,502 |
| Índice de Acidez | 5,498 mg KOH/g AEO |
| Índice de Éster | 175,320 mg KOH/g AEO |

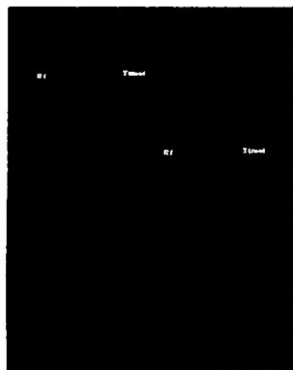


Figura 2. Cromatografía en capa fina realizada al aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano”. Ayacucho, 2015.

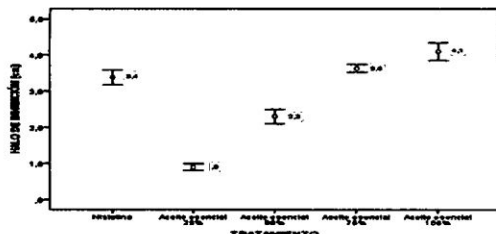


Gráfico 1. Promedio de los halos de inhibición por efecto del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2015.

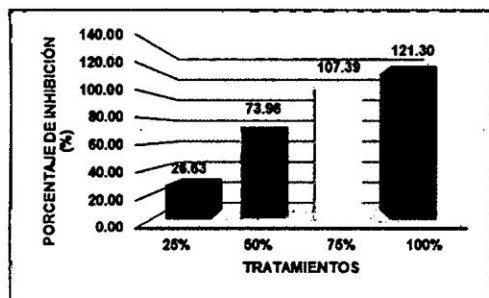


Gráfico 2. Porcentaje de inhibición del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2015.

Cuadro 4. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Fungicida del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” frente a *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2015.

| T. | Aceite Esencial (mg/ml) | | | | | |
|----|-------------------------|---|---------|---|---------|---|
| | 50% | | 75% | | 100% | |
| 1 | 50,000 | S | 100,000 | S | 150,000 | S |
| 2 | 25,000 | S | 50,000 | S | 75,000 | S |
| 3 | 12,500 | S | 25,000 | S | 37,500 | S |
| 4 | 6,250 | S | 12,500 | S | 18,750 | S |
| 5 | 3,125 | S | 6,250 | S | 9,375 | S |
| 6 | 1,563 | S | 3,125 | S | 4,688 | S |
| 7 | 0,781 | S | 1,563 | S | 2,344 | S |
| 8 | 0,391 | S | 0,781 | S | 1,172 | S |
| 9 | 0,195 | S | 0,391 | S | 0,586 | S |
| 10 | 0,098 | R | 0,195 | S | 0,293 | S |
| 11 | 0,049 | R | 0,098 | S | 0,146 | S |
| 12 | 0,024 | R | 0,049 | R | 0,073 | S |
| 13 | 0,012 | R | 0,024 | R | 0,037 | S |
| 14 | 0,006 | R | 0,012 | R | 0,018 | S |

DISCUSIÓN

Un estudio realizado sobre el aceite esencial de la orégano, recuperado las hojas, reporta un mayor rendimiento de aceite mediante la extracción por arrastre con vapor, especialmente a medida que se aumenta el flujo y la presión. El aceite esencial de orégano presenta 60 componentes, de los cuales los clasificaron en grupos: “Monoterpenos, sesquiterpenos y fenólicos”. De manera que siendo los principales componentes el “timol, carvacrol, cimeno y terpenos”.¹³

En el estudio realizado se recolectó la muestra de *Origanum vulgare* L. “orégano” que fué recolectada de la provincia de Huanta, que se expenden en el mercado “Nery García Zarate” de la ciudad de Ayacucho se tomó en cuenta estudios de Solís¹⁶ por poseer mejores propiedades físico-químicas, lo que nos indicará que el aceite esencial presenta mejores condiciones para este estudio.

En el Cuadro 2, se presentan los resultados de las características organolépticas del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano”. Bartels H.¹⁴ señala que el aceite esencial de orégano es amarillo claro, se pone oscuro con el tiempo, olor a especie, sabor amargo producto de la

destilación de la planta (hojas secas) mediante el método arrastre de vapor. Los valores obtenidos experimentalmente estuvieron dentro de las características reportadas.

En el Cuadro 3, se presenta los resultados de las determinaciones físico-químicas del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano". Bruneton J.¹⁵ señala que la densidad 0,870-0,910, índice de refracción 1,5020-1,5080; rotación óptica específica -2 a + 3°; ligeramente soluble en agua, soluble en alcohol (2/70%) y aceites; contiene carvacrol (3-17%), germacreno D (6-21%), y-cadineno 83 - 6%), terpenos, cimeno, d-linalool, timol (7%), alcoholes libres (13%) y otros compuestos. Asimismo, señala que los valores del índice de refracción para el aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano", se encuentran en el rango de 1,5020 – 1,5080. Sin embargo, los valores obtenidos para el mismo están por debajo de los valores reportados, esto se puede deber a una mala deshidratación lo que pudo interferir en la medición del índice de refracción. Las impurezas pudieron ser principalmente remanentes de agua.

Morrison R.¹⁶, por su parte refiere que los fenoles son ácidos por la capacidad del anillo aromático a estabilizarse por resonancia al anión fenóxido. Precisamente esto se corrobora por que el aceite esencial de orégano obtenido tuvo un mayor índice de acidez y una mayor cantidad de compuestos fenólicos como se observa en el cuadro 3.

Dorman y Deans¹⁷, reportan que el aceite esencial de *Origanum vulgare* variedad *hirtum* presenta un compuesto esterificado del carvacrol llamado carvacrol metil éster. Es probable que exista una mayor incidencia de este éster en la composición química del aceite esencial de orégano. El índice de éster obtenido es mayor con resultado de 175,32 mg KOH/g AEO.

En la figura 2, se observa la cromatografía en capa fina realizada al aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano", revelado con ácido sulfúrico 5% en etanol y vainillina 1% en etanol con resultado positivo manchas de color Azul-Violeta. En comparación con el Rf obtenido se puede determinar que hay presencia de timol.^{8,9}

Robledo E.¹⁸, evaluó la actividad antifúngica de 9 productos vegetales (extractos, aceites y/u oleorresinas) obtenidos de dos especies

del Semidesierto Mexicano: orégano (*Lippia graveolens*) y gobernadora (*Larrea tridentata*), frente a cepas del género *Trichophyton* sp., *Microsporum* sp. y *Epidermophyton* sp. Comparando su actividad con la terbinafina. El producto que presentó la mayor actividad fue el aceite de orégano, inhibiendo el 100% del crecimiento de las cepas en sus concentraciones 100% (v/v). En nuestro estudio; el aceite esencial de *Origanum vulgare* L. "orégano" en su dilución al 100%, enfrentado con cepas de *Candida albicans* presentó halos de inhibición promedio 4,10 cm de mayor diámetro en comparación con las diferentes diluciones.

El efecto antimicótico del aceite esencial de orégano, coincide con estudios de Saavedra R.² quien concluyó que a partir del 25% del aceite esencial de *Origanum vulgare* "orégano", produce un porcentaje de inhibición mayor al 50%.

Fernández G.¹⁹ Evaluación de la actividad de aceites esenciales de eucalipto, orégano, limón y mandarina frente a *Candida albicans*, el estudio sobre la actividad antifúngica. Los diámetros promedio de los halos de inhibición fueron: orégano 4,2 cm; eucalipto 1,3 cm; mandarina 0,9 cm; limón 2 cm. En conclusión, el aceite esencial de orégano es el que presentó la mayor actividad antifúngica frente a la cepa *Candida albicans* ATCC 10231 seguido de los aceites de eucalipto, mandarina y limón. Este estudio corrobora los resultados obtenidos en el estudio.

Contreras C.²⁰ realizó el estudio frente a la actividad antimicótica in vitro de tres aceites esenciales contra hongos xilófagos. El aceite esencial (AE) de orégano tuvo un Índice Antimicótico (IA) del 0% en las concentraciones de 20 y 100 ppm, pero el efecto antimicótico fue aumentando al incrementarse la concentración del AE, de tal forma que para la concentración a 400 ppm el IA fue el 100% para el hongo de la pudrición café *C. puteana*. Con este estudio confirmamos que a mayor concentración de aceite esencial mayor efecto antimicótico.

En la Gráfico 2, las medidas de los halos de inhibición de las concentraciones del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. "orégano" del 25% (0,9 cm) y 50% (2,3 cm); son menores a la nistatina que presentó 3,38 cm; las concentraciones de 75%(3,6 cm) y 100% (4,1 cm) respectivamente; superior a la nistatina, siendo estadísticamente significativo (p<0,05).

En el Gráfico 3, los porcentajes de inhibición del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” correspondientes a las concentraciones 25%, 50%, 75% y 100%, respecto a la nistatina, fueron el 26,63%; 73,96%; 107,39%; 121,30%. Los resultados de los halos de inhibición se determinó la media y la desviación estándar, media \pm desviación estándar. La diferencia entre la media se contrastó con el análisis de varianza al 95% de confianza. La comparación de los halos de inhibición con el estándar de referencia se realizó con la estadística Dunnett. La inferencia de la concentración en los halos de inhibición se evaluó con el estadístico de Duncan.

Respectivamente, determinando que estas concentraciones tienen efecto antimicótico. Sostiene que el tubo transparente que contenga la concentración de droga más baja (máxima dilución) corresponderá a la CMI de la droga. Si los organismos no crecen en las placas querrá decir que han muerto. Esta concentración de la droga será fungicida. El tubo con la concentración fungicida más baja (máxima dilución) corresponderá a la CMF de la droga.

Acharte D.²¹ estudio referente a la actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. “naranja” frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231, El aceite esencial al 10%, 20% y 30%, presentaron mayor actividad antimicótica, respecto a las demás concentraciones, con halos de inhibición de 20,50 mm; 21,00 mm y 22,50 mm, respectivamente; superior a la nistatina que presentó 19,67 mm, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$). La CMI y CMF del aceite esencial fue 0,122 mg/ml y 0,244 mg/ml, respectivamente.

Los resultados de este procedimiento muestra que en el Cuadro 4 la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Fungicida del el aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* L. “orégano” frente a *Candida albicans* ATCC 10231, presentó 0,055 mg/ml y 0,11 mg/ml respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilar M., De la Cruz M., Gastélum F., Silva R. y Nevárez G. Efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*Lippia berlandieri Schauer*) y de su aceite esencial sobre cinco especies del género *Vibrio*. [Revista en internet]. 2007 julio-setiembre. [Acceso 25 de julio del 2015]; 30(3). Pág. 261-267. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/610/61003008.pdf>.
2. Saavedra R. Actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Origanum vulgare* “orégano”, Ayacucho 2002. [Tesis para optar Título Profesional]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú 2002.
3. De La Rosa, M. y Prieto, J. Microbiología en Ciencias de la Salud. 2a ed. Madrid: Elsevier; 2003.
4. Cueto M. Determinación del efecto inhibitorio del aceite esencial y diferentes extractos de orégano (*Lippia berlandieri shauer*) sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* tanto in vitro como en plántulas de tomate. [Tesis para optar el Grado Académico de Doctor]. Universidad Autónoma de Nuevo León. México 2010. Disponible en: <http://eprints.uanl.mx/2099/1/1080177206.pdf>.
5. Ruiz J. Actividad antifúngica *in vitro* y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales. [Tesis para optar el Grado Académico de Magíster]. Universidad Nacional Mayor De San Marcos Facultad De Farmacia Y Bioquímica Unidad De Post-Grado Lima, Perú. 2013.
6. Look. Investigación Fitoquímica. 2da ed. Perú: Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
7. Bruneton, J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. 1a ed. España: Acribia. S.A; 1991.
8. Flores A. Hernández A. y Valladares R. Determinación de la actividad antifúngica de aceites esenciales extraídos de *lippia graveolens* (orégano), *rosmarinus officinalis* (romero) y *eucalyptus globulus* (eucalipto) en *microsporium canis trichophyton rubrum* y *epidermophyton floccosum*. [Grado para optar Licenciatura en Química y Farmacia] Universidad de El Salvador Facultad de Química y Farmacia San salvador. El salvador -centro américa 2004. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/3147/1/16100703.pdf>.
9. Durst. H. D. y otros. Química Orgánica Experimental. 1a ed. Barcelona: Reverté, S.A.; 1985.
10. Lozina, L., Boehringer, S. y Acosta, O. Extrapolación en una Forma Posológica de valores obtenidos in Vitro sobre

- actividad antifúngica del propóleo. Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. [Revista en internet] 2005 setiembre-diciembre. [Acceso 19 de octubre de 2015]; v-018. Disponible en: <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/ct/com2005/4-Veterinaria/V-018.pdf>.
11. Palomino, M. y Uribe, C. Determinación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos etanólico e hidroalcohólico de las semillas de *Carica papaya* L. "papaya". [Tesis para optar Título Profesional]. Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica. Perú 2007. Disponible en: <http://documents.mx/documents/tesis4.html>.
 12. Andrews, J. Determination of minimum inhibitory concentrations. Journal of Antimicrobial Chemotherapy [Revista en internet] 2001 octubre-diciembre. [Acceso 27 de octubre 2015]; 49(6). Disponible en: (Suppl. 1):5-16. 2001. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11420333>.
 13. Silva VR, Dunford NT. Bioactive components of Mexican Oregano oil as affected by moisture and plant growth. Journal of Essential Oil Research. Mexico. 2005. Disponible en: http://www.archivos.ujat.mx/2016/Divulgacion_cientifica/Perspectiv_UJAT_2015.pdf.
 14. Bartels. H. Inspección Veterinaria de la Carne. Zaragoza. 1a ed. España: Acribia; 1980.
 15. Bruneton, J. Elementos de Fitoquímica y de Farmacognosia. 1a ed. España: Acribia. S.A; 1991.
 16. Morrison R. Química orgánica. 4a ed. México: Del Fondo Educativo Interno americano; 1998.
 17. Dormán y Deans. Journal Of Applied Microbiology 8. Antimicrobial Agents From Plants: Antibacterial Activity Of Plant Volatile Oils. Estados Unidos. 1999. Pág. 308-316.
 18. Robledo E., González M., Elizondo M., Adame J. M.1, y Morales D. Actividad antifúngica *in vitro* de productos vegetales frente a hongos dermatofitos. [Tesis para optar Título Profesional]. Universidad Autónoma de Nuevo León, UANL, Facultad de Ciencias Biológicas, Nuevo León. México. 2014. disponible en: http://riiit.com.mx/apps/site/files/actividad_antifungica_in_vitro_de_productos_vegetales_frente_a_hongos_dermatofitos_v1.pdf.
 19. Fernández G., Maurtua D., Aguilar L., Delgado C. y Díaz R. Evaluación de la actividad de aceites esenciales de eucalipto, orégano, limón y mandarina frente a *Candida albicans*. [Tesis para optar Título Profesional]. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Universidad en Lima, Perú 2010. Disponible en: <http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/REH/article/viewFile/1731/1758>.
 20. Contreras C., Gonzáles P. Actividad antimicótica *in vitro* de tres aceites esenciales contra hongos xilófagos. [Tesis para optar Título Profesional]. Universidad Autónoma Chapingo. México. 2012. Disponible en: http://www.google.com.pe/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwj6tvKB2fvLAhVK4SYKHxNOBooQFggaMAA&url=http%3A%2F%2Ffiles.departamento-de-productos-forest.webnode.es%2F200001499-5d7645e706%2FMemoria%2520XIV%2520congreso%2520Chapingo.pdf&usg=AFQjCNGOsHysNq1Zf7WokFQ0pMZJR_EqhQ&bvm=bv.118817766,d.eWE.
 21. Acharte D. Actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC 10231. Ayacucho, 2010. [Tesis para optar Título Profesional]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho. Perú 2010.