

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA**
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Actividad antimicótica del aceite esencial de
Citrus aurantium L. "naranja" frente a la cepa de
Trichophyton mentagrophytes.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO CON MENCIÓN EN LA ESPECIALIDAD DE
BIOTECNOLOGÍA**

Presentado por:

Bach. JAIME GAMBOA, Yuri Irwin

AYACUCHO – PERÚ

2015

Tesis
B725
Jai
Ej. 2

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D. Nº 100 – 2015 – UNSCH – FCB – D

Bach. Jaime Gamboa, Yuri Irwin

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro de la tarde con cinco minutos, del día veintidós de mayo del año dos mil quince, en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, reunidos los profesores miembros del jurado evaluador presididos por el Sr. Decano de la Facultad Dr. Homero Ango Aguilar además de ser miembro del jurado e integrado por el Mg. Serapio Romero Gavilán, Mg. Paula García Godos Alcázar, no asistió el Mg. Enrique Javier Aguilar Felices, y como secretario docente el Blgo. Elbert Hermoza Valdivia, la no asistencia del Mg. Aguilar Felices se debe a que tiene interferencia con su participación en el comité electoral, el motivo es la recepción del trabajo de tesis Actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a la cepa de *Trychophyton mentagrophytes*, presentado por el Bachiller en Ciencias Biológicas Jaime Gamboa Yuri Irwin quien con ello pretende optar el título profesional de Biólogo con mención en la especialidad de Biotecnología.

Constatado la documentación sustentaría para la exposición de la tesis y estando está conforme; el Sr. Decano da la autorización al sustentante para que pueda dar inicio con su exposición, en el tiempo reglamentario de cuarenta y cinco minutos, en vista de esto el Sr. sustentante inicia con su exposición en forma serena. Concluida con la exposición el Sr. Presidente invita al jurado para que pueda realizar sus preguntas o solicitar las aclaraciones que crean convenientes, de esta forma los miembros del jurado inician con la ronda de preguntas, a las mismas que el sustentante da inicio con sus respuestas en forma clara y pertinente. Terminada esta parte el Sr. Presidente del jurado y miembros del mismo invita al sustentante y público asistente para desocupar el auditorio momentáneamente, con la finalidad de efectuar las decisiones y realizar la calificación dando como resultado.

Miembro jurado	Exposición	Rpta. A preguntas	Promedio
Dr. Homero Ango Aguilar	16	16	16
Mg. Serapio Romero Gavilán	16	16	16
Mg. Paula García Godos Alcázar	17	17	17

Como resultado de la calificación se tiene el promedio de diecisiete (17) que resulta aprobatorio, e inmediatamente se invita al sustentante y público asistente para que hagan su ingreso al auditorio con la finalidad de que se dé el resultado en forma pública, así como otorgar la medalla de la Universidad en reconocimiento a su calidad de nuevo profesional Biólogo, inmediatamente se somete al juramento de Ley.

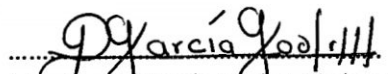
Concluye el acto de sustentación siendo las cinco y cuatro pm. e igualmente los miembros del jurado evaluador estampan su firma al pie del presente en fe de conformidad al mismo.



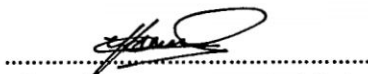
.....
Dr. Homero Ango Aguilar
Presidente - Miembro



.....
Mg. Serapio Romero Gavilán
Miembro



.....
Mg. Paula García Godos Alcázar
Miembro-Asesor



.....
Blgo. Elbert Hermoza Valdivia
Secretario Docente

A mis padres por su apoyo incondicional y esfuerzo en bien mío y mis hermanos.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, farol que ilumina las mentes en bien de nuestro país.

A la Facultad de Ciencias Biológicas, a la Escuela de Formación Profesional de Biología, en donde adquirí conocimientos que serán de mucha ayuda en mi vida.

A la Mg. Paula García Godos Alcázar, profesora de la Escuela de Formación Profesional de Biología, por el asesoramiento en el desarrollo de la tesis.

Al Sr. Alejandro Tincco, operador del laboratorio de Transferencia de masa de la Facultad de Química, por su apoyo en la extracción del aceite esencial.

A la Q.F. Roxana León Aronés, profesora de la Escuela de Formación profesional de Farmacia y Bioquímica, por su apoyo en el análisis físico químico del aceite esencial de la naranja.

Al Mg. Reynan Cóndor, profesor de la Escuela de Formación Profesional de Biología, por su apoyo en el análisis estadístico de los datos.

A la Podóloga Nelva Jeovana Espino Soto, gerente de la Clínica Salud del Pie, por facilitarme la muestras de uñas infectadas con micosis.

ÍNDICE GENERAL

	Página
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE GENERAL	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE ANEXOS	xi
RESUMEN	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Antecedentes	3
2.2. Actividad antimicótica.	6
2.2.1. Mecanismos de acción de los antimicóticos	7
2.3. <i>Citrus aurantium L.</i>	9
2.3.1. Descripción botánica	11
2.3.2. Distribución geográfica	12
2.3.3. Aceites esenciales de Citrus	13
2.3.4. Composición química	13
2.3.5. Usos medicinales	15
2.3.6. Estudios farmacológicos de <i>citrus aurantium L.</i>	16
2.4. Genero <i>Trychophyton</i>	17
2.4.1 Patogenia	18
2.4.2. Manifestaciones clínicas	18
2.4.3. Etiología de <i>Trychophyton mentagrophytes</i>	19
2.4.4. Tratamiento	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	23
3.1. Lugar de ejecución	23
3.2. Muestra Biológica	23
3.3. Recolección de la muestra	23
3.4. Cepa	23
3.5. Fármaco de Referencia	23
3.6. Diseño metodológico	23
3.6.1. Aislamiento de <i>Trychophyton mentagrophytes</i>	23

3.6.2. Identificación de <i>Trychophyton mentagrophytes</i>	24
3.6.3. Preparación de la muestra biológica	24
3.6.4. Extracción del aceite esencial	24
3.6.5. Dilución del aceite esencial	24
3.6.6. Determinación de la actividad antimicótica	25
3.6.7. Diseño experimental	25
3.6.8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	26
3.6.9. Determinación de la concentración mínima fungicida(CMF)	26
3.6.10. Lectura de los resultados	26
3.6.11. Análisis estadístico	26
IV. RESULTADOS	27
V. DISCUSIÓN	33
VI. CONCLUSIONES	39
VII. RECOMENDACIONES	41
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
ANEXOS	47

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla N° 1: Productos con actividad antimicótica de plantas	6
Tabla N° 2: Productos con actividad antimicótica de plantas	7
Tabla N° 3: Productos con actividad antimicótica obtenido de microorganismos	7
Tabla N° 4: Clasificación de los antifungicos por su estructura	9
Tabla N° 5: Antifungicos, clasificación según mecanismo de acción	9
Tabla N° 6: Clasificación taxonómica de la naranja amarga de Sevilla	12
Tabla N° 7: Características clínicas de la infección por <i>T. mentagrophytes</i>	19
Tabla N° 8: Resumen de las drogas antimicóticas y sus efectos secundarios	20
Tabla 9: Identificación macroscópica y microscópica de <i>Trychophyton mentagrophytes</i>	28
Tabla 10: Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima fungicida del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. a la concentración del 30% frente a <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	31

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura N° 1: <i>Citrus aurantium</i> L., naranjo amargo	11
Figura N° 2: Estructura química de sinefrina, octopamina y otros componentes	15
Figura N° 3: Especies de <i>Trychophyton</i> . Macroconidio, hifa en espiral, y microconidio típico	17
Figura N° 4: Estructura de los azoles	21
Figura N° 5: Promedio de los halos de inhibición por efecto del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. "naranja" frente a <i>Trychophyton mentagrophytes</i>	29
Figura N° 6: Porcentaje de inhibición del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. "naranja" frente a <i>Trychophyton mentagrophytes</i>	30

ÍNDICE DE ANEXOS

	Página
Anexo 1: Análisis de varianza para el número de halos de inhibición de las concentraciones del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. "naranja" y el control frente a <i>Trychophyton mentagrophytes</i>	48
Anexo 2: Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los halos de inhibición del efecto antimicótico del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. "naranja" y el control frente a <i>T. mentagrophytes</i>	48
Anexo 3: Análisis de varianza para el número de halos de inhibición de las concentraciones del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. "naranja" y el control frente a <i>T. mentagrophytes</i>	48
Anexo 4: Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los porcentajes de inhibición del efecto antimicótico del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. "naranja" frente a <i>T. mentagrophytes</i> .	48
Anexo 5: Características organolépticas del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. "naranja"	48
Anexo 6: Características físico químicas del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. "naranja"	49
Anexo 7: Concentración fungicida de sustancias antimicóticas sobre patógenos	49
Anexo 8: Halos de inhibición de las concentraciones de 1%, 5%, 10%, 20% del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. "naranja" frente a <i>Trychophyton mentagrophytes</i>	50
Anexo 9: Halos de inhibición de las concentraciones de 30%, 50% del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. "naranja" frente a <i>T. mentagrophytes</i>	51
Anexo 10: Halos de inhibición de fluconazol (control positivo) y control negativo frente a <i>Trychophyton mentagrophytes</i>	52
Anexo 11: Diámetro de los halos de inhibición del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. "naranja" frente a <i>Trychophyton mentagrophytes</i>	53

Anexo 12: Porcentaje de inhibición del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. "naranja" frente a <i>Trychophyton mentagrophytes</i>	53
Anexo 13: Proceso de cargado de la muestra al balón de extracción por vapor	54
Anexo 14: Aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. en diferentes concentraciones	54
Anexo 15: Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. frente a <i>Trychophyton mentagrophytes</i>	55
Anexo 16: Concentración mínima fungicida del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. frente a <i>Trychophyton mentagrophyte</i>	55
Anexo 17: Características macroscópicas y microscópicas de <i>Trychophyton mentagrophytes</i>	56

RESUMEN

La investigación tuvo como objetivo evaluar la actividad antimicótica *in vitro* del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a la cepa de *Trichophyton mentagrophytes*. Se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, la investigación es de tipo básica experimental. El aceite esencial se obtuvo por arrastre de vapor al cual fue sometido el epicarpio desmenuzado de trescientos frutos de naranja. Las uñas infectadas con micosis fueron obtenidas de la Clínica Podológica Salud del Pie en la ciudad de Ayacucho, en total fueron 12 muestras, las cuales fueron sembradas en Agar Saboraud Glucosado e incubadas a 25 °C por 5 a 7 días para después ser aisladas e identificadas por características macroscópicas y microscópicas de *Trichophyton mentagrophytes*. La cepa elegida de *Trichophyton mentagrophytes* fue sembrada por diseminación en la superficie de Agar Saboraud Glucosado, dejando secar para luego ubicar discos de 10 mm de diámetro en donde se descargó 30 µL del aceite esencial de la naranja, en concentraciones de 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, y 50%, se utilizó Twen 80 al 2% como control negativo y clotrimazol como el control positivo. Se obtuvo dos cepas de *Trichophyton mentagrophytes*, siendo una utilizada en la prueba antimicótica. Los halos de inhibición se muestran en todas las concentraciones en promedios de 14,60mm, 21,00mm, 27,30mm, 37,83mm, 52,60mm, para las concentraciones de 1%, 5%, 10%, 20%, 30% respectivamente, e inhibición total en la superficie del medio para la concentración del 50%. La concentración del 30% y 50% es superior al clotrimazol que presentó 43,17 mm, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$). La CMI y CMF del aceite esencial fue 0,586 mg/ml y 1,172mg/ml, respectivamente. El aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" presenta un efecto antimicótico y fungicida frente a la cepa de *Trichophyton mentagrophytes*, sobre todo en las concentraciones de 30% y 50%. En consecuencia es una alternativa a un nuevo antimicótico natural de uso tópico en diferentes presentaciones.

Palabras clave: *Trichophyton mentagrophytes*, antimicótico, aceite esencial

I. INTRODUCCION

Las micosis superficiales se deben principalmente a especies del género *Microsporum*, *Trichophyton* y *Epidermophyton*, que en conjunto se conocen como dermatófitos. Los dermatófitos son hongos saprófitos cuya única alimentación es la queratina de la epidermis, por eso crecen en extensión buscando alimento. Pero puede haber otros hongos contaminantes y levaduras (*Candida albicans*) y/o bacterias que compliquen y agraven la evolución patológica del problema¹.

Las infecciones micóticas ocasionadas por los dermatofitos son el pie de atleta y las tiñas de diferentes tipos. *Trychophyton mentagrophytes* es uno de los dermatofitos de importancia clínica por la enfermedad que causa en la piel, cabello y uñas¹.

La *tinea pedis* que afecta a la mayoría de personas expuestas al dermatofito que causa el deterioro de la piel y las uñas en los pies, quienes recurren a tratamientos con fármacos vía oral y tópica, generalmente la recuperación tarda de seis meses hasta un año, tiempo en el cual deja secuelas de maltrato hepático por los fármacos ingeridos².

Una de las especies vegetales con mayores bondades en el área de la salud es el *Citrus aurantium* (naranja), es usado las diferentes partes de la planta en tratamientos diversos dentro de la medicina natural. El pericarpio del fruto contiene aceites esenciales con múltiples sustancias bioactivas, que posee diversas propiedades tales como actuar como antimicrobiano; las cuales fueron comprobadas en investigaciones anteriores, atribuyéndole propiedades antimicóticas *in vitro* del aceite esencial de *Citrus aurantium* L.

La investigación es apoyada en tratamientos alternativos contra el ataque de los hongos y orientada a la búsqueda de una alternativa para el tratamiento de las enfermedades micóticas causadas por *Trichophyton mentagrophytes* específicamente.

Los aceites esenciales de los cítricos por su composición química tiene la capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos patógenos de las plantas, los animales y el mismo hombre tal como lo muestran las investigaciones que antecede a la presente, como por ejemplo su acción contra la *Candida albicans*, contra dermatofitos y bacterias que presentan una sensibilidad muy notoria. Por tal motivo, la investigación estuvo orientado a evaluar experimentalmente el efecto antimicótico del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a la cepa aislada de *Trichophyton mentagrophytes* cuyos objetivos fueron:

- Evaluar la actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a la cepa de *Trichophyton mentagrophytes*.
- Determina la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de *Citrus aurantium* "naranja" frente a *Trichophyton mentagrophytes*
- Determinar la Concentración Mínima Fungicida del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a *Trichophyton mentagrophytes*

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Rendón y Torres, (2012)¹, en la investigación realizada determinaron la actividad antimicótica de las fracciones obtenidas de la cromatografía de columna procedentes del extracto diclorometánico de la goma resina de *Eucalyptus citriodora* (eucalipto), resultando que las fracciones con mayor actividad antimicótica fueron n-hexano:acetato de etilo 30% y n-hexano:acetato de etilo 50%, cuya actividad se presume a la presencia de sustancias de naturaleza terpénica y compuestos fenólicos, comprobando así que las fracciones antes mencionadas poseen actividad antimicótica contra *Candida albicans* y *Trichophyton mentagrophytes*.

Álzate *et al*, (2009)², en la investigación evaluaron la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) sobre algunos hongos filamentosos, y determinaron mediante dilución en agar, la concentración mínima inhibitoria (CMI) de distintos aceites esenciales de naranja contra 11 cepas de *Salmonella*, obteniendo resultados satisfactorios y CMI entre 0,125% y 1%, así mismo estudiaron, mediante dilución en agar, la acción antifúngica de los aceites esenciales de limón, mandarina, toronja y naranja en mohos comúnmente asociados con el deterioro de alimentos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium chrysogenum* y *Penicillium verrucosum*; llegando a la conclusión de que los aceites esenciales estudiados muestran capacidad de reducir o inhibir el crecimiento de los mohos mencionados.

Río *et al*, (2007)³, en la investigación sobre el efecto de la conservación en frío y manipulación post-cosecha de frutos de *Citrus limón* sobre los niveles de flavonoides y resistencia a *Penicillium digitatum*, los estudios *in vivo* e *in vitro* llevados a cabo revelan que tanto las flavanonas como la flavona reducen el crecimiento micelial de *Penicillium digitatum*, produciendo alteraciones morfológicas y ultraestructurales de sus hifas, concluyendo que el papel de dichos compuestos fenólicos como posibles fitoalexinas es el mecanismo de defensa de esta especie cítrica frente a *Penicillium digitatum*.

Mesa *et al*, (2004)⁴, en la investigación sobre los productos naturales con actividad antimicótica, de las hojas de la planta australiana *Melaleuca alternifolia* se obtiene el aceite esencial del árbol del té (*Tea Tree Oil*), un fitofármaco que ha mostrado actividad antimicótica por la acción directa de los componentes activos, terpinen – 4 ol y 1,8 – cineol, a una concentración que varía del 29% al 45% y del 4,5% al 16,5%, respectivamente, contra las estructuras de las membranas celulares, no solo en hongos sino también en bacterias, el aceite se utiliza para el tratamiento de infecciones de la piel por hongos de los géneros *Candida* y *Malassezia*, y en las oncomicosis causantes por dermatofitos.

Roa *et al*, (2012)⁵, en la investigación sobre la evaluación *in vitro* de la actividad antimicótica y antiviral de derivados de terpenil-1,4-nafto y 1,4-antracenediona, las quinonas se consideran activas a una concentración de < 32 µg/ml, un total de 36 muestras fueron evaluadas, el 42% mostraron actividad antimicótica y antiviral, el compuesto más activo para ambos casos fue S3 (1,4-antracenediona) en un rango de concentración de 2,00 – 20,16 µg/ml, frente a todas las especies de hongos, dentro de ellas *Trichophyton mentagrophytes* y 6,25 µg/ml frente a HHV-1, este y otros compuestos activos serán seleccionados para determinar su posible mecanismo de acción.

Alvares *et al*, (2005)⁶, en la investigación sobre la actividad antimicótica de *Phenax rugosus* (lam) pers y *Baccharis trinervis* (sw) wedd, resultando mostrar que los extractos etanólicos de ambas especies inhiben el crecimiento de los dermatofitos *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*, y se observó que *Baccharis trinervis* (sw) wedd tuvo mejor efecto antimicótico y *Trichophyton rubrum* fue el más sensible a ambos extractos.

Rodríguez *et al*, (2010)⁷, en la investigación sobre la actividad antibacteriana y antifúngica de las especies *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire) y *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) ambas cactáceas, el extracto metanólico de *A. retusus*

mostró mayor actividad contra *B. subtilis* con inhibición de 2,16 cm a 100 mg/ml y sobre *Microsporum gypseum* y *Microsporum nanum* y una concentración media letal de 263,68 y 738,00 mg/ml respectivamente, concluyendo que la actividad antimicrobiana encontrada en estas plantas es una alternativa para el desarrollo y formulación de nuevos fármacos antimicrobianos.

Treviño *et al.*, (2012)⁸, en la investigación sobre la actividad antifúngica de *Stenocereus pruinosus* y *Echinocereus stramineus*, los extractos metanólicos de ambas especies presentaron alcaloides, triterpenos, saponinas y avonoides, mientras que para la actividad antifúngica los resultados fueron relevantes para *S. pruinosus*, al presentar inhibición a dosis inferiores de 125 mg/mL, en cuanto a la toxicidad sobre *Artemia salina* ambas especies presentaron dosis letales superiores a 500 mg/mL, *Stenocereus pruinosus* es una alternativa para la formulación de nuevos fármacos antifúngicos.

Roa *et al.*, (2014)⁹, en la evaluación de la actividad antimicótica *in vitro* de nueve derivados de *bisimidaperileno*, solo tres compuestos presentaron actividad antimicótica frente a todas las especies de hongos evaluados, como resultado preliminar, las tres moléculas presentaron actividad frente a *F. oxysporum*, *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* a una concentración de 50 µg/ml.

Cano *et al.* (2008)¹⁰, en la investigación sobre la actividad antimicótica *in vitro* y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña), resultando que el aceite esencial de muña presentó efectos antimicóticos frente a cepas de *Candida albicans* a las concentraciones de 50% y 100% y frente a los dermatofitos: *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton tonsurans*, que son sensibles también en los volúmenes ensayados de 5 y 50 µL. Limachi, (2004)¹¹, en su tesis sobre la actividad antimicótica de los extractos de *Allium sativum* "ajo" frente a los dermatofitos, resultando un halo de inhibición promedio de 19,39 mm para *Trichophyton mentagrophytes* y el control positivo ketoconazol un promedio de 21,17 mm.

Tueros, (2005)¹², en su tesis sobre el efecto antimicótico de *Euphorbia peplus* "leche leche" frente a hongos dermatofitos, la cepa de *Trichophyton mentagrophytes* fue la más sensible mostrando un halo promedio de 18.44 mm y el estándar ketoconazol ejerció mayor efecto inhibitorio con un halo de 20,58 mm.

Vargas, (2004)¹³, en su tesis sobre el efecto antimicótico del *Plumbago coerulea* "yana warmi" sobre hongos dermatofitos y *Candida albicans*, reporta el mayor promedio de inhibición a una concentración del 100% frente al hongo

Trychophyton mentagrophytes con un promedio de 15,20 mm y el control positivo: nistatina con un promedio de 27 mm.

Acharte, (2010)¹⁴, en su tesis sobre la actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC 1023, resultando que el aceite esencial al 10%, 20% y 30%, presentaron mayor actividad 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 presento 19,67 mm. La CMI y CMF del aceite esencial fue 0,122 mg/ml y 0,244 mg/ml, respectivamente.

2.2. Actividad antimicótica

El concepto de agente antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped, estos compuestos conocidos como sustancias bioactivas generalmente se encuentran en organismos como metabolitos secundarios en hongos, bacterias y plantas.^{15,16}

Dentro de los metabolitos secundarios con actividad fungicida se encuentran los provenientes de la fracción líquida volátil que contiene las sustancias responsables del aroma de las plantas o aceites esenciales. Generalmente son mezclas complejas de hasta más de cien componentes de bajo peso molecular como compuestos alifáticos simples, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos, que hacen parte de los monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos.³

Tabla 1: Productos con actividad antimicótica de plantas.³

Compuesto	Fuente	Actividad
aceite del árbol del té (terpinen - 4- ol y 1,8 - cineol	<i>Melaleuca alternifolia</i>	<i>Candida</i> , <i>Malassezia</i> , dermatofitos
Alicina	<i>Alium sativum</i>	<i>Candida</i> , <i>Malassezia</i> , dermatofitos, <i>Cryptococcus</i> , <i>Aspergillus</i>
Ajoeno	<i>Alium sativum</i>	<i>Candida</i> , <i>Malassezia</i> , dermatofitos, <i>Paracoccidiodes brasiliensis</i>
Timol	<i>Thymus vulgaris</i> , <i>Thymus zygis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Saprolegnia</i> , <i>Zygorhynchu</i>
Carvacrol	<i>Thymus vulgaris</i> , <i>Thymus zygis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Saprolegnia</i> , <i>Zygorhynchu</i>
Eucaliptol (1,8 – cineol)	<i>Eucaliptus globulus</i>	<i>Candida albicans</i>
zeametina	<i>Zea mays</i>	<i>Candida albicans</i>

Tabla 2: Productos con actividad antimicótica obtenido de organismos marinos e insectos.³

Compuesto	Fuente	Actividad
Oceanapisida	Esponjas marinas del género Oceanapia	<i>Candida glabrata</i>
Sulfatos de acantosterol	Esponja marina del genero Acanthodendrilla	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Espongistatina	<i>Hyrtios erecta</i>	<i>Candida</i> <i>Aspiggillus</i> <i>Criptococcus</i> <i>Rhodotorula</i> <i>Rhyzopus</i>
Cecropinas A y B	<i>Hyalopora cecropia</i>	<i>Fusarium, Aspergillus</i>
Drosomicina	<i>Drosopila melanogaster</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>
Tanatina	<i>Podisus maculiveris</i>	<i>Fusarium, Aspergillus</i>

Tabla 3: Productos con actividad antimicótica obtenido de microorganismos.³

Compuesto	Fuente	Actividad
Amfotericina B	<i>Streptomyces noursei</i>	Antimicótico de amplio espectro
Nistatina	<i>Streptomyces nodosus</i>	<i>Candida</i>
Griseofulvina	<i>Penicillium griseofulvum</i>	Dermatofitos
Polioxinas	<i>Streptomyces cacaoi</i>	<i>Candida albicans</i>
Nikomycinas	<i>Streptomyces sendae</i>	Levaduras y hongos filamentosos
Mucidina	<i>Oudemansiella mucida</i>	Dermatofitos
Aureobasidina A	<i>Aureobasidium pullulans</i>	<i>Candida</i>
Equinocandinas	<i>Aspergillus nidulans,</i> <i>Aspergillus syndowi, Zalarion arboricola</i>	<i>Candida, Aspergillus, Pneumocystis jiroveci</i>

2.2.1. Mecanismos de acción de los antimicóticos

Los derivados del imidazol como el clotrimazol posee potentes acciones antimicóticas: fungistática en las concentraciones de 1 a 10 µg/ml y fungicida en las de 10 a 20 µg/ml sobre distintas especies de hongos de los géneros *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton*, *Candida*, hongos productores de las micosis superficiales. En cuanto al modo y mecanismo de la acción antimicótica, la ejercen sobre la membrana celular de los hongos, de manera de aumentar la permeabilidad, lo que lleva a la pérdida de elementos celulares, indispensables para el crecimiento y la vida celular. Mientras el ketoconazol produce su acción deletérea sobre los hongos por modificaciones de la membrana celular, con distorsión de la forma de la célula, aumento de la permeabilidad de aquella, con escape de los elementos vitales, lo que trae aparejado trastorno del metabolismo y necrosis celular de los hongos. Se ha demostrado que la unión del

ketoconazol con la membrana celular de los hongos se efectúa con sus esteroides.¹⁷

Los derivados de los fenoles halogenados como la haloproquina posee acciones fungistáticas y fungicidas sobre diversos hongos de los géneros *Trychophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, su modo de acción, se acepta que la haloproquina actúa aumentando la permeabilidad de la membrana celular de los hongos, evidenciado por la pérdida de potasio intracelular, lo que es deletéreo para los mismos; además se ha comprobado una disminución de la utilización de oxígeno por las células micóticas.¹⁷

En tanto los antibióticos como los benzofuranos (griseofulvina) se acepta que actúa como fungistático e interfiere en la síntesis de los ácidos nucleicos, especialmente el DNA, por un mecanismo de competición, ya que la droga es antagonizada por precursores de los ácidos nucleicos como las purinas y sus derivados. El mecanismo de acción no ha sido establecido, pero es probable que la griseofulvina interfiera con la síntesis y polimerización de los ácidos nucleicos, el efecto inhibitorio puede ser parcialmente revertida por las purinas.¹⁸

De los ácidos grasos fungicidas como los ácidos propionico saturado undecilénico no saturado y sus sales de sodio y de zinc (Piocidex) y compuestos de azufre como los tiocarbamilos y tiocarbánilidas no se conoce el mecanismo de acción antimicótica de estas sustancias.¹⁷

Los nuevos azoles actúan al igual que los otros miembros del grupo azol, inhibiendo la enzima citocromo P-450 que interviene en la síntesis del ergosterol, que es el mayor esteroide de la membrana celular del hongo. Se liga a un nitrógeno libre del anillo azol inhibiendo la 14 α de metilación del lanosterol, llevando a la depleción del ergosterol, lo que finalmente afecta la permeabilidad de la membrana del hongo y los sistemas enzimáticos unidos a la membrana, involucrados en la síntesis de la pared celular.¹⁹

Tabla 4: Clasificación de los antifúngicos por su estructura.²⁰

Grupo	Antifúngicos
Polienos	Nistatina, natamicina, anfotericina B
Azoles	Imidazol: miconazol, clotrimazol, ketoconazol Triazoles: fluconazol, itraconazol, (ketoconazol). Triazoles de segunda generación: voriconazol, ravuconazol, posaconazol
Alilaminas	Terbinafina, naftifina
Lipopeptidos	Papulacandinas Triterpenoglicosilados Equinocandinas: caspofungina, anidulofungina, micafungina
Pirimidinas	Flucitosina
Otros	Ioduro de potasio, ciclopirox, tolnaftato, griseofulvín

Tabla 5: Antifúngicos, clasificación según mecanismo de acción.²⁰

Antifúngicos que actúan sobre la membrana citoplasmática
<ul style="list-style-type: none"> • Polienos • Azoles • Alilaminas • Tiocarbamatos
Antifúngicos que actúan sobre la pared
<ul style="list-style-type: none"> • Lipopeptidos
Antifúngicos que actúan sobre el núcleo
<ul style="list-style-type: none"> • Pirimidinasfluoradas • Misceláneos

2.3. *Citrus aurantium* L.

Por varios siglos el naranjo agrio fue el único cítrico conocido en Europa, antes de la llegada de otras especies traídas del oriente por los navegantes. En Calabria, Italia, hay alrededor de 3 500 hectáreas plantadas de naranjo agrio denominado "bergamota", de la cual se extrae el aceite base para la fabricación del agua de colonia.²¹

La presencia frecuente de mutaciones gemarias y de quimeras en los agrios, se ha utilizado siempre con fines ornamentales y en jardinería. De hecho, en el siglo I d.C. el naranjo amargo (*Citrus aurantium* L.) ya era utilizado ornamentalmente por la belleza de su follaje, perenne, y el colorido de sus frutos. Durante el renacimiento el cultivo de agrios en maceta era muy frecuente en los jardines más famosos.²²

Las naranjas amargas, también llamadas naranjas agrias, se conocen en inglés como *sour*, *bitter* o *Seville oranges* (naranjas de Sevilla), en italiano se llaman *melangolo* o *orancio amaro*, en francés *bigarade* o *orange amere*, en Israel se conocen como *khuskhash*, en Pakistán *khatta*, y en Japón *daidai*. Las naranjas amargas son generalmente demasiado amargas y acidas para su transformación en zumo, y sus aceites son generalmente excesivamente fuertes y desagradables.²³

Las naranjas amargas más comunes son principalmente las de la variedad tardía sevillano, muy utilizada en España y Australia para la producción de mermelada, aceites esenciales, y extractos amargos utilizados como bases para bebidas.²³

Deriva también por hibridación introgresiva del pomelo y la mandarina. El naranjo agrio, posiblemente domesticado en India o el Sureste de Asia, se expandió con la conquista árabe por Europa en el siglo XI y se le cultivo como ornamental y por las propiedades culinarias o medicinales del jugo. En Europa se desarrolló después en perfumería el uso del aceite de los pétalos, y de la cáscara de la fruta en la preparación de medicinas. Se utilizó mucho como patrón para injertar otros cítricos, por su resistencia a la gomosis, pero su susceptibilidad a "tristeza" ha restringido su empleo a áreas libres de esta enfermedad.²⁴



Figura 1: *Citrus aurantium*, naranjo amargo²⁵

Naranja amarga. A: Una rama de floración y fructificación; B: Fruta; 1: Flor después de la eliminación de los pétalos, ampliada; 2: Flor en sección longitudinal; 3: Pétalo; 4: Haz vascular; 5: Carpelo con la eliminación de estambre; 6: fruta madura en sección transversal; 7: cáscara de la fruta sin madurar en la sección transversal al microscópico.²⁵

2.3.1. Descripción botánica

Los árboles del genero *Citrus* son de tamaño medio forma globosa y ramas regulares, los brotes son flexibles con entrenudos de 5-7 cm de longitud limitados por una hoja de cada extremo y en cuya axila se localizan varias yemas y una espina más o menos grande y consistente según la especie y variedad. Las hojas son lanceoladas de tamaño medio con base ancha y convexa. Fruto en despendio globoso, oval o ligeramente ovoide de piel delgada superficie fina y cerosa y de color anaranjado y con notables diferencias en su acidez y contenido de azúcares, vitaminas etc. según la especie y variedad.²⁴

Árbol leñoso de 3-10 m de alto, tronco grueso, erecto, corona compacta, corteza suave, café, ramas verdes, espinas no muy puntiagudas de 2-8 cm de largo. Hojas compuestas, siempre verdes, aromáticas, alternas, peciolo alado, ancho, 6- 13 cm

de largo, finamente dentadas, con pequeñas glándulas de aceite. Flores muy olorosas, individuales o grupos en las axilas foliares, 3-4 cm de ancho, 5 pétalos blancos, separados, hasta 24 estambres, 5-12% son masculinas. Frutos en baya, redondos u oblongo-ovalados, 7-8 cm de ancho, pericarpio rugoso, grueso, amargo, con glándulas de aceite; 10-12 segmentos con paredes amargas y pulpa ácida, varias semillas.²⁶

Fruto caroso, redondeado, de unos 7 – 8 cm de diámetro, con corteza anaranjada, gruesa y rugosa, completamente cubierta de vesículas glandulares que contienen un líquido aromático; en su interior se encuentra un número variable de gajos carnosos, cubiertos de una telilla membranosa, de sabor amargo y agrio; contiene una o varias semillas en forma de pera.²⁴

Tabla 6: Clasificación taxonómica de la naranja amarga o de Sevilla.²⁴

Clasificación taxonómica de <i>C. aurantium</i> L.	
Reino	Vegetal
Orden	Geraniales
Suborden	<i>Geraniineae</i>
Clase	<i>Dicotyledoneae</i>
Subclase	<i>Archichalmydeae</i>
División	<i>Embryophyta</i>
Subdivisión	<i>Angiospermae</i>
Familia	<i>Rutaceae</i>
Tribu	<i>Aurantioideae</i>
Subtribu	<i>Citreae</i>
Genero	<i>Citrus</i> L.
Subgénero	<i>Citrus</i>
Especie	<i>Citrus Aurantium</i> L.

2.3.2. Distribución geográfica

Se desconoce con absoluta certeza el origen de estas plantas, que parecen derivar de ejemplares silvestres nativos de Asia sudoriental. El naranjo amargo se cree que procede del sudeste de China y norte de Burma, fue difundido por los árabes, y llegó a España en el siglo X, mucho antes que la naranja dulce, que se supone que lo hizo aproximadamente en 1450.²⁷

Los cítricos son ampliamente cultivados en todo el mundo desde el ecuador hasta los 41 grados de latitud norte y sur. El centro de su origen es incierto, sin embargo, recientes análisis genéticos sugieren que los diferentes cultivares de cítrico clasificados, son aparentemente resultado de la hibridación natural entre tres

especies verdaderas de citrus: el cidro (*Citrus medica*); la mandarina (*C. reticulata*) y el pomelo (*C. grandis*).¹⁶

Al igual que el resto de América, los primeros cítricos fueron introducidos al Perú por los españoles; poco a poco se fueron difundiendo, primeramente en la costa, luego en algunos valles abrigados de la sierra, y por último a la zona de selva.²¹

2.3.3. Aceites esenciales de citrus

Generalmente, los aceites esenciales son líquidos a temperatura ambiente. Su volatilidad o capacidad de evaporación al contacto con el aire, a dicha temperatura, los diferencia de los aceites fijos. Dentro de los compuestos aromáticos, el peso molecular se restringe a máximo 250 g/mol para que las sustancias puedan volatilizarse.³

Son fácilmente alterables o sensibles a la oxidación, aunque no se enrancian como los lípidos. Poseen tendencia a polimerizarse, dando lugar a la formación de productos resinosos, especialmente aquellos que contienen alcoholes ternarios insaturados, variando su olor, color y viscosidad. Son aceites grasos, fácilmente solubles en solventes orgánicos, como éter de petróleo, cloroformo, benceno o alcohol absoluto; y casi insolubles en agua, a la que comunican su olor.³

La densidad de los aceites esenciales varía de 0,84 a 1,18 g/cm³; siendo, la gran mayoría, menos densa que el agua. Poseen un índice de refracción elevado, con un promedio de 1,5 y generalmente presentan actividad óptica.³

Un elemento característico de los aceites esenciales de Citrus obtenidos por presión es la presencia de compuestos no volátiles: su contenido, generalmente inferior al 5%, puede sobrepasar el 10% (lima). El ensayo de los aceites esenciales de Citrus comprende las determinaciones habituales (rotación óptica, índice de refracción, residuo de evaporación, índice de acidez).²⁸

2.3.4. Composición química

Los aceites esenciales provenientes de frutos cítricos, contienen de 85 a 99% de componentes volátiles y de 1 al 15% de componentes no volátiles. Los primeros son una mezcla de mono terpenos como el limoneno, sesquiterpenos y sus derivados oxigenados, incluyendo aldehídos como el citral, cetonas, ácidos, alcoholes como el linalol, y ésteres.²⁹

Se han encontrado 200 compuestos químicos diferentes, presentes en el aceite esencial de naranja, de los cuales se ha identificado 100. Los monoterpenos

abarcan hasta el 97% de la composición, con alcoholes, aldehídos y ésteres abarcando el menor porcentaje de componentes (1,8 a 2,2 %) El principal componente de dichos aceites es el limoneno que puede llegar a abarcar hasta un 98% de la composición del aceite esencial de la naranja.²⁹

El pericarpio fresco de naranja amarga también llamado naranja de Sevilla produce, por expresión, un aceite esencial bastante parecido a la naranja dulce, menos rico en compuestos carbonílicos: 96-98% de limoneno y otros hidrocarburos (mirceno, α -pipeno, etc.), 0,4 – 0,5% de aldehídos alifáticos, aproximadamente 0,1 % de aldehídos monoterpénicos (la norma NF T 75 – 334 precisa: 0,5 – 2,9% de compuestos carbonílicos expresados en decanal).²⁸

Se midieron la concentración de flavonoides en la cáscara de cuatro variedades de naranja en Estados Unidos, prepararon un extracto con dimetilsulfoxido (DMSO)/metanol (1/1 v/v). Mediante la técnica de HPLC, utilizando como fase móvil metanol con ácido fosfórico 0,01M (80/20), reportaron 19-170 ppm (19,17 mg/mL) de hesperidina en la naranja valencia.³⁰

En la cáscara de naranja agria reportaron un contenido fenólico de 2.23 g/100g, de los cuales 1.097 mg/100g fueron de naringina y 66 mg/100g de hesperidina, y en la lima reportaron 19 mg/100g de naringina.³⁰

Los componentes más activos en *Citrus aurantium* (fruta) son sinefrina (también llamado p-sinefrina o oxedrine) y octopamina. *Citris aurantium* (cáscara) también contiene flavonoides, incluyendo limoneno, hesperidina, neohesperidina, naringina, y tangaretin y furanocumarinas también están presentes. Estructuralmente, los componentes activos en *C. aurantium* son estrechamente relacionados con los neurotransmisores endógenos y efedrina. La sinefrina es estructuralmente similar a la epinefrina, y octopamina es similar en estructura a norepinefrina (que sólo se diferencian en el número de hidroxilo grupos en el anillo aromático. En estrecha relación con sinefrina es im-sinefrina (fenilefrina, neosinefrina).³¹

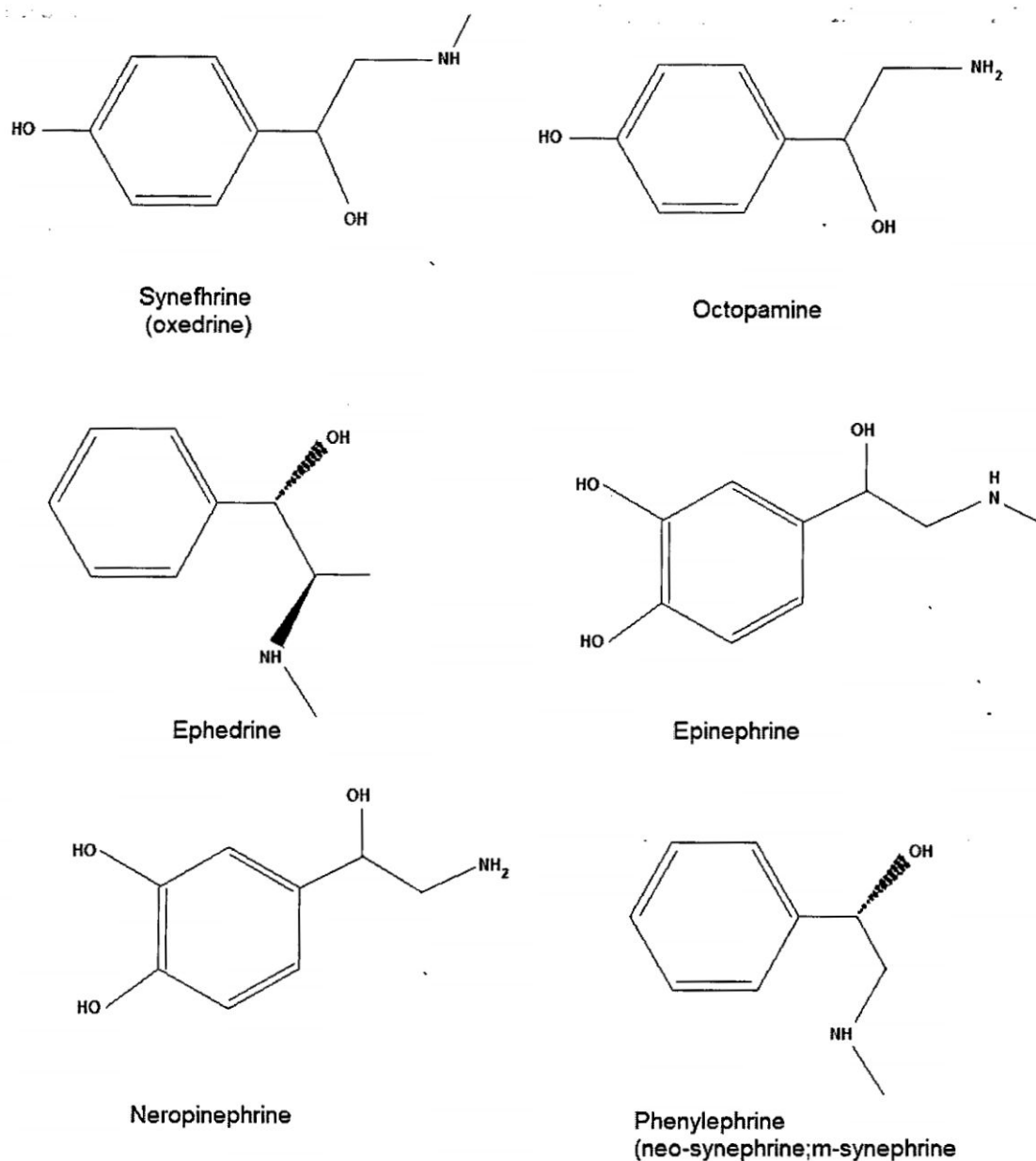


Figura 2: Estructura química de sinefrina, octopamina y otros componentes³¹

2.3.5. Usos medicinales

Los aceites esenciales son utilizados en la industria cosmética, farmacéutica, alimenticia y entre otros usos, son materia prima en la aromaterapia atribuyéndoseles acciones antibacterianas; anti fúngicas; antivirales, etc. Cabe destacar que es también importante el procedimiento que se emplea para la obtención de las esencias de los vegetales, es así que existen varias técnicas,

entre las más utilizadas están el método por arrastre de vapor de agua, la extracción por fluidos en estado supercrítico, la presión en frío y otros métodos específicos que se utilizaran de acuerdo al uso final que tendrán los aceites esenciales.²⁹

En ausencia de experimentos farmacológicos y de datos clínicos, la tradición lleva a utilizar, por vía oral, la "cascara" del naranjo amargo para estimular el apetito y facilitar la ganancia de peso. La hoja y la flor del naranjo amargo y dulce se utilizan habitualmente en infusión en el tratamiento sintomático de los estados neuróticos de adultos y niños, principalmente en trastornos menores del sueño. Las flores frescas del naranjo amargo sirven para preparar el agua destilada de flores de naranjo y el pericarpio es la materia prima utilizada en la obtención del jarabe y tintura de naranja amarga empleada en la aromatización de formas medicamentosas por vía oral.²⁸

Los aceites esenciales son conocidos por ejercer actividad antimicrobiana, aunque el mecanismo por el cual actúan no está totalmente entendido, puede involucrarse en éste la destrucción de la membrana microbiana por los constituyentes lipofílicos que poseen, y estudios recientes reportan otros efectos como cambios en la morfología del hongo que incluyen daños sobre estructuras como conidios, macroconidias e hifas, así como la disminución en la producción de micotoxinas.¹ La corteza contiene un tónico estomacal que facilita la expulsión de los gases intestinales. El fruto es depurativo de la sangre, diurético y digestivo, la decocción de las hojas está recomendada para la dispepsia, afecciones del sistema nervioso, antipirético, taquicardia, convulsiones y epilepsia, la infusión de las flores se emplea para facilitar el parto, contra las palpitaciones del corazón y la arteriosclerosis. De las flores y de las hojas se prepara una infusión calmante.¹⁶

2.3.6. Estudios farmacológicos de *Citrus aurantium* L.

En la literatura consultada, se encuentra un único estudio de cinco plantas medicinales combinadas en un elixir con propiedades hipnóticas y sedantes. El elixir contenía pericarpio de *Citrus aurantium* (naranja agria) al 2% y otras planta. Sin embargo se concluye que el elixir comercializado posee una actividad ligeramente hipnótica, mientras el elixir preparado experimentalmente posee una actividad ligeramente sedante.¹⁶

El producto más importante es la hesperidina que es antiespasmódica y ligeramente hipnótica. En un estudio realizado, se comprobó la actividad

cicatrizante de la planta en ratas albinas. La administración intravenosa de un extracto acuoso de su pericarpio, a la dosis de 1,5 mg/kg, induce una rápida respuesta vasopresora, seguida de una caída de la tensión arterial. Se reportan efectos: antimicótico y antihemorrágico sobre el sistema gastrointestinal. Muestra un efecto de relajación, *in vitro*, sobre el útero de rata en estro. Efecto antiespasmódico sobre el íleon de cobayo. El aceite presenta una actividad antibacteriana y fungicida, también se reporta una actividad antihemorrágica.¹⁶

2.4. Género *Trychophyton*

El género *Trychophyton* es miembro de la familia *Arthrodermataceae* del orden de los ascomicetos *Onygenales*, *Trychophyton mentagrophytes* var. *interdigitales* es un hongo de distribución mundial.³²

Las especies de *Trychophyton*, que pueden infectar cabello, piel o uñas, desarrollan macroconidios cilíndricos de paredes lisas y microconidios característicos. Según la variedad, las colonias de *Trychophyton mentagrophytes* pueden ser algodonosas o granulares; ambos tipos muestran abundantes microconidios esféricos similares a racimos de uva sobre ramas terminales. En los aislamientos primarios comúnmente se observan hifas espirales o enrolladas.³³

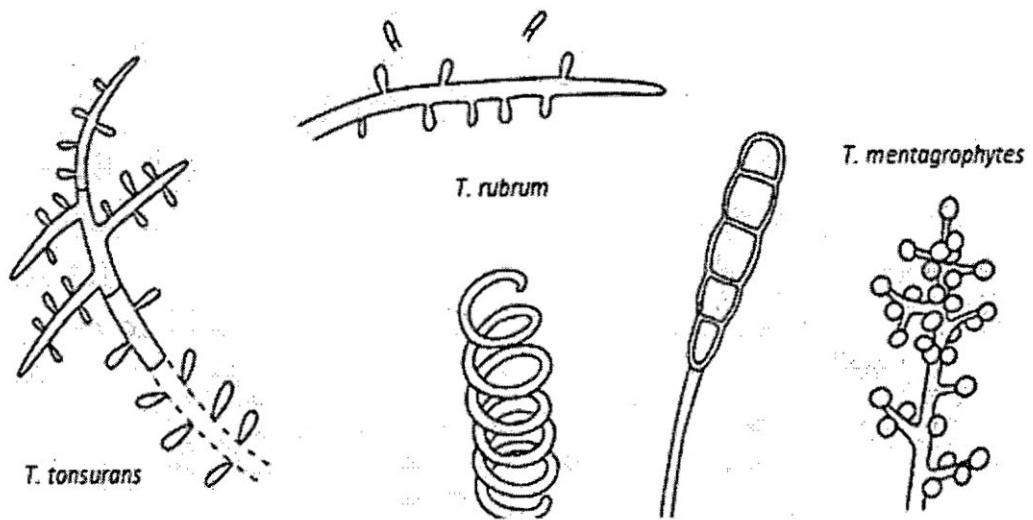


Figura 3: Especies de *Trychophyton*. Macroconidio, hifa en espiral y microconidio típico³³

2.4.1. Patogenia

Las estructuras de los dermatofitos más frecuentemente asociadas con el contagio, especialmente por especies con pobre producción de las esporas son: las artroconidias o clamidoconidias; cada una es una forma de resistencia del hongo que puede durar años en el ambiente y por lo tanto tiene la capacidad de soportar las temperaturas altas, especialmente si se están entre las escamas de la piel o restos de cabellos.³⁴

Las conidios germinan y empiezan a desarrollar hifas, se adhieren a la queratina y tratan de penetrar partes más profundas de la piel, uñas; para ello hay diferentes mecanismos que facilitan la penetración, una de ellas es la liberación de enzimas proteolíticas como los glicopeptidos y las queratinasas.³⁴

Los dermatofitos metabolizan la queratina gracias a la producción de lipasas, endopeptidasas, glucosidasas, nucleasas, queratinasas, colagenasas y elastasas. Estas enzimas además de favorecer la penetración y el desarrollo micelial en el tejido queratinizado, ocasionan en el huésped respuestas inmune de tipo inflamatorio.³⁵

El suelo es el hábitat natural de varias especies geofílicas de los géneros *Microsporum* y *Trichophyton*. La infección a humanos ocurre tanto por animales infectados como por contacto directo con el suelo contaminado.³⁵

Los dermatofitos pueden adquirirse por contacto directo o indirecto con objetos contaminados (peines, cepillos, sombreros, calzado, instrumentos de limpieza de uñas o ropa).³⁵

2.4.2. Manifestaciones clínicas

La *tinea pedis* es la más prevalente de todas las dermatofitosis. Se presenta como una infección crónica en los pliegues interdigitales del pie. Otras variedades son los tipos vesicular, ulceroso y en mocasín, con hiperqueratosis de la planta del pie. Inicialmente hay prurito entre los dedos de los pies y presencia de pequeñas vesículas que se rompen y dejan salir líquido. La piel de los pliegues interdigitales del pie se macera y descama. La infección de las uñas puede ser subsecuente a una *tinea pedis* prolongada. Con la invasión por hifas las uñas se vuelven amarillas, quebradizas, engrosadas y friables. Puede estar afectadas una o más uñas de los pies.³³

Tabla 7: Características clínicas de la infección por *T. mentagrophytes*.³³

Enfermedad de la piel	Localización de las lesiones	Aspecto clínico
<i>Tinea pedis</i> (pie de atleta)	Espacios interdigitales de los pies en personas que usan zapatos	Aguda: prurito, vesículas eritematosas Crónica: prurito, descamación, fisuras
<i>Tinea cruris</i> (comezón de jinete)	Ingle	Lesión eritematosa descamativa en áreas intertriginosas. Pruriginosa
<i>Tinea capitis</i>	Pelo de la piel cabelluda. Endotrix: hongos dentro del cabello. Ectotrix: hongos en la superficie del cabello	Placas de alopecia areta con cabellos de tallos cortos o cabellos rotos en los folículos pilosos. Querión raro.
<i>Tinea barbae</i>	Vello de la barbas	Lesión eritematosa, edematosa
<i>Tinea unguium</i> (onicomicosis)	Uña	Uñas distalmente engrosadas o quebradizas; alteraciones del color, deslustradas. Habitualmente asociadas a <i>tinea pedis</i>

2.4.3. Etiología de *Trychophyton mentagrophytes*

Las infecciones por dermatofitos se inician en la piel después de un traumatismo y por contacto. Hay evidencia de que la susceptibilidad del huésped puede ser incrementada por la humedad, el calor, la química específica de la piel, la composición de la grasa y la transpiración, la edad joven, la exposición intensa y la predisposición genética.³³

La incidencia es más alta en climas más cálidos y húmedos, así como en condiciones de hacinamiento. El uso de calzado suministra calor y humedad, condiciones para la infección de los pies. La fuente de infección es el suelo o un animal infectado en el caso de los dermatofitos geofílicos y zoofílicos, respectivamente.³³

La tricotina es una preparación cruda de antígeno que se puede emplear para detectar la hipersensibilidad inmediata o tardía a los antígenos dermatofitos. Muchos de las personas quienes desarrollan infecciones dermatofíticas crónicas no inflamatorias muestran insuficiencia de las respuestas inmunitaria mediada por las células del antígeno dermatofítico. Estos pacientes con frecuencia son atópicos y presentan hipersensibilidad de tipo inmediato con grandes concentraciones elevadas de la IgE.³³

En la piel se diagnostican por la presencia de hifas ramificadas, septadas, hialinas o por las cadenas de artroconidios. En el cultivo muchas especies están interrelacionadas y con frecuencia son difíciles de identificar.³³

2.4.4. Tratamiento

Se indican el clotrimazol, el miconazol y el econazol en las dermatomicosis o dermatofitosis, en la *tiña* de los pies o pie de atleta, onicomycosis, producido por los hongos de los géneros *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* y *Candida*.¹⁷

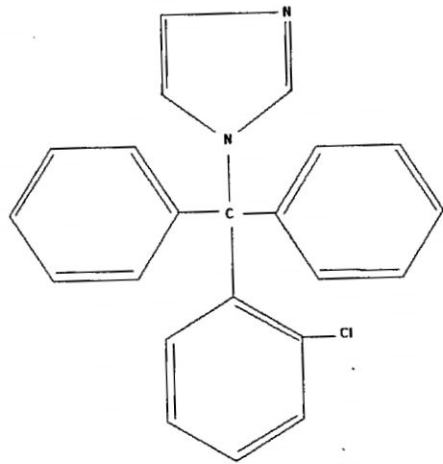
Las micosis profundas requieren tratamientos con medicamentos de acción general. Las infecciones micóticas superficiales también pueden ser tratadas con un antibiótico administrado bucalmente, la griseofulvina, pero las infecciones micóticas más comunes de la piel son tratadas con agentes antimicóticos tópicos.¹⁸

Para la onicomycosis se recomienda emplear la crema con cura exclusiva las 24 horas. Se utiliza el clotrimazol al 1 a 2%, el miconazol al 2% y el econazol al 1%, y el tratamiento a durar 2 a 4 semana, hasta la curación del proceso.¹⁷

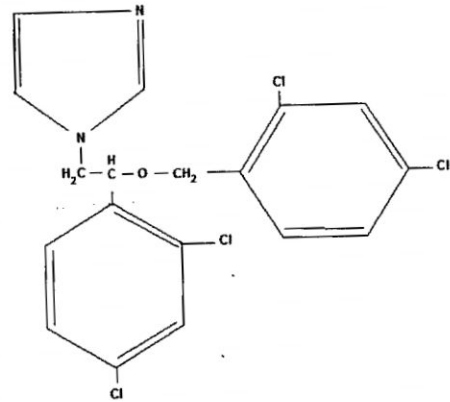
Las lesiones más agudas con fisuras y dolor pueden requerir remojos astringentes como el subacetato de aluminio hasta que desaparezca el proceso agudo. De ahí en adelante se pueden emplear el ungüento de undecilenato de zinc, el ungüento de Whitfield a medida concentración o la solución de tolnaftato, hasta que la higiene personal cuidadosa y los polvos sean de nuevo adecuados.¹⁸

Tabla 8: Resumen de las drogas antimicóticas y sus efectos secundarios.¹⁸

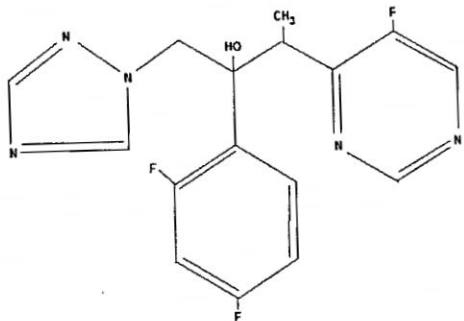
Tipo de hongo infectante	Lugar de infección	Agente antimicótico	Vía de administración	Dosis	Efectos secundarios y comentarios
Dermatophytes	intradérmica y pelo	Griseofulvina (fulvicin, grifulvin, grisactin)	bucal	12.5 mg/día o 500 mg/día adultos	Foto sensibilidad, urticaria, trastornos G.I., fatiga, leucopenia (rara); interfiere con las drogas en cumarinicas; aumenta las porfirinas en sangre y orina, por lo tanto no debe emplearse en pacientes con porfirina



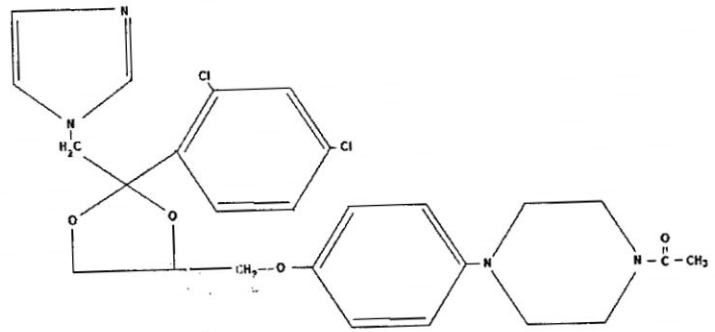
Clotrimazol



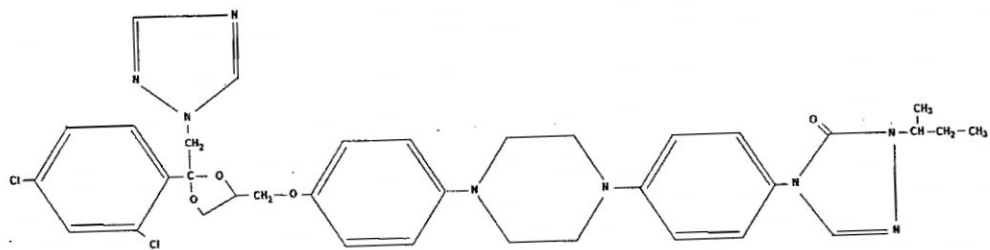
Miconazol



Variconazol



Ketoconazol



Itraconazol

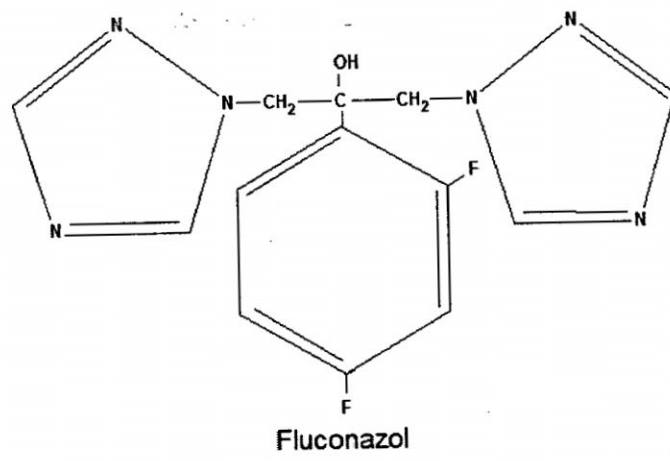


Figura 4: Estructura de los azoles.³³

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Lugar de ejecución

El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. La investigación se realizó durante los meses de mayo 2014 y noviembre 2014.

3.2. Muestra biológica

Cáscara de *Citrus aurantium* L. "naranja"

3.3. Recolección de muestra biológica

Los trescientos frutos de naranja fueron colectados en la ciudad de San Francisco.

3.4. Cepa de *Trichophyton mentagrophytes*

La cepa fue aislada e identificada en el laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas.

3.5. Fármaco de referencia

Clotrimazol al 1%

3.6. Diseño metodológico

3.6.1. Aislamiento de *Trichophyton mentagrophytes*.

- Se trasvasó la muestra en una placa de Petri estéril y realizar lavados con SSF estéril con antibiótico (cloranfenicol al 0.05%)
- Se seccionó la muestra en trozos de 1 a 2 mm con ayuda de pinza y bisturí estéril para obtener un espécimen homogéneo.

- Se sembró la muestra, sumergiendo ligeramente en la superficie del medio de cultivo (Agar Saboraud Dextrosa), incubar a 25°C y controlar diariamente hasta el día 15.¹¹

3.6.2. Identificación de *Trichophyton mentagrophytes*.

- Usando una pipeta, se colocó una gota de Agar Saboraud licuado, sobre una lámina portaobjeto estéril
- Se sembró una asada de la colonia seleccionada y
- Se cubrió con una laminilla cubreobjetos estéril
- Se colocó el cultivo en una placa de Petri conteniendo la varilla de vidrio
- Se adicionó agua destilada estéril con la finalidad de mantener la humedad
- Se incubó a 25°C por 5 a 7 días
- Se separó la laminilla de la lámina, invertirla sobre una lámina portaobjetos nueva y dejar secar por 15 minutos
- Se coloreó con etanol, lactofenol y azul de tripan. Observar al microscopio para identificar las estructuras características.¹¹

3.6.3. Preparación de la muestra biológica

La cáscara de naranja se enjuagó en agua corriente y posteriormente desmenuzó. en trozos más pequeños, luego se extendió en el piso sobre la lámina de plástico y se dejó secar hasta el día siguiente.

3.6.4. Obtención de aceite esencial

Se cargó la muestra en el balón de extracción, se encendió la caldera e iniciar automáticamente la extracción. Recepcionar el aceite en un recipiente limpio (probeta), posteriormente vaciar a la pera de decantación para separar el agua; en el laboratorio purificar con sulfato de sodio anhidro y finalmente almacenar en frasco limpio, color caramelo en refrigeración.

3.6.5. Dilución del aceite esencial

Para la determinación de la actividad antimicótica se hizo la dilución a concentraciones del 50%, 30%, 20%, 10%, 5% y 1% peso sobre volumen (p/v). Se diluyó en Tween 80 al 2% como cosolvente y emulsificante.¹⁴

3.6.6. Determinación de la actividad antimicótica

a. Preparación del inóculo

- Se tomó una asada de la colonia del dermatofito e inocular en 50 ml de caldo Papa Dextrosa más 15 ml de caldo Saboraud e incubar a 25°C por 24 horas.
- Se comparó igual similitud de opalencia con escala N° 5 de Mac Farland que equivale a $(1 \times 10^6 - 5 \times 10^6)$ UFC).
- Se ajustó la opalencia con el caldo nutritivo.¹²

b. Determinación de Halo de inhibición (Método de difusión en disco)

- Se preparó placas de Petri con medio Agar Saboraud Glucosa
- Se sembró por diseminación 0,25 ml del inóculo con la ayuda de un hisopo estéril, dejando secar a temperatura ambiente por 2 horas.
- Se incorporó discos de papel filtro de 10 mm de diámetro en las placas con agar Saboraud.
- Se echó 30µL de la dilución del aceite en diferentes concentraciones según corresponda.
- Se incubó a 25 °C para después observar la formación de halos de inhibición a los 3 días hasta el día 15 y determinar la actividad antimicótica.

c. Utilización de controles

- **Control negativo.**

Se utilizó como control negativo al Twen 80 al 2%.

- **Control positivo**

Se utilizó como control positivo al clotrimazol al 1%

3.6.7. Diseño experimental

Formar 8 grupos y cada una de 6 repeticiones.

Grupo I : Control negativo tratado con Twen 80 al 2%

Grupo II : Control positivo tratado con clotrimazol

Grupo III : Administrado con aceite esencial al 1%

Grupo IV : Administrado con aceite esencial al 5%

Grupo V : Administrado con aceite esencial al 10%

Grupo VI : Administrado con aceite esencial al 20%

Grupo VII : Administrado con aceite esencial al 30%

Grupo VIII : Administrado con aceite esencial al 50%

3.6.8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

- Se ajustó el cultivo de dermatofitos al estándar de 0,5 de la escala de Mac Ferland.
- Se preparó 15 tubos previamente esterilizados y rotulados del número 1 al número 15.
- A partir del tubo número 1 hasta el tubo N° 15 se agregó 1,75 ml del caldo Saboraud
- Posteriormente se agregó 0,25 ml de la concentración del aceite esencial al tubo N° 1, a partir de la 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 el aceite esencial siendo este el control.
- Luego se agregó 1 ml del inóculo de dermatofitos a todos los tubos y se llevó a incubar a 25°C por 15 días.¹⁴

3.6.9. Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF)

- Se procedió a partir de la (CMI).
- Luego de haber observado la turbidez a simple vista, se procedió a sembrar 0,01ml por diseminación con la ayuda de la asa de Col los no turbios en las placas con agar Saboraud.
- Posteriormente se incubó a 25°C por 15 días máximo.¹⁴

3.6.10. Lectura de los resultados

Los resultados para la prueba de "difusión en disco", se reportó en función al diámetro del halo que se formó por acción del aceite en diferentes concentraciones representado en milímetros.

Para el cálculo de porcentaje de inhibición se usó la siguiente fórmula. Tomando como patrón al antimicótico clotrimazol.

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

3.6.11. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se evaluarán mediante un análisis de varianza (ANOVA) para determinar el grado de significancia entre las cepas analizadas y comparaciones múltiples de Tukey con un nivel de significancia de 0.05, para esto se usó Software estadístico.

IV. RESULTADOS

Tabla 9: Identificación macroscópica y microscópica de *Trichophyton mentagrophytes*

Muestra	Identificación macroscópica	Identificación microscópica
9	Colonia blanca algodonosa circular, regular, lisa, planas de bordes radiados, blancas. Reverso con pigmento canela.	Macroconidio alargado, abundantes microconidios redondos e hifas en espiral: <i>Trichophyton mentagrophytes</i>
12	Colonia blanca algodonosa circular, regular, lisa, planas de bordes radiados, blancas. Reverso con pigmento canela.	Macroconidio alargado, abundantes microconidios redondos e hifas en espiral: <i>Trichophyton mentagrophytes</i>

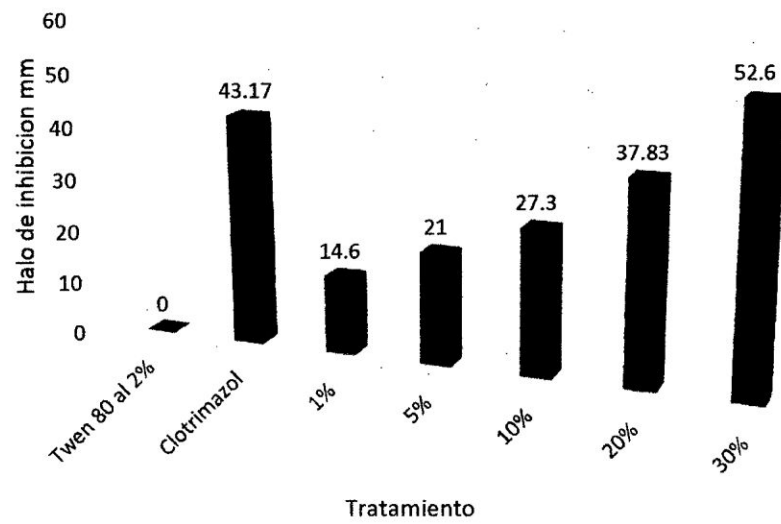


Figura 5: Promedio de los halos de inhibición por efecto del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a *Trychophyton mentagrophytes*

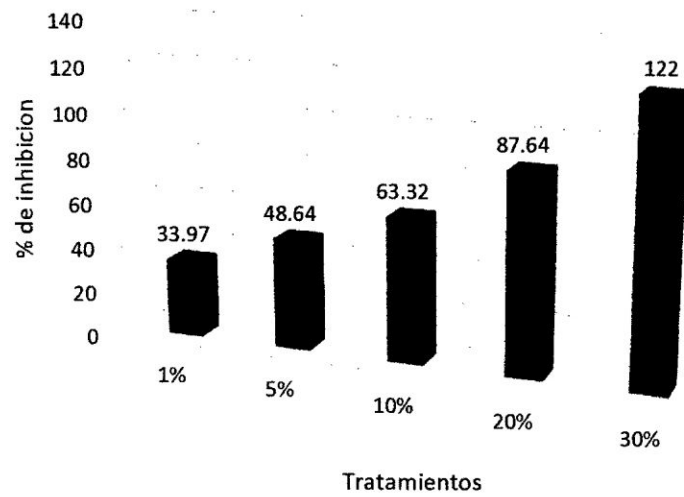


Figura 6: Porcentaje de inhibición del aceites esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a *Trychophyton mentagrophytes*

Tabla 10: Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima fungicida del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. a la concentración del 30% frente a *Trichophyton mentagrophytes*

Tubos	Aceite Esencial (mg/ml)			
	10%	20%	30%	
1	12.500	25.000	37.500	S
2	6.250	12.5	18.750	S
3	3.125	6.25	9.375	S
4	1.563	3.125	4.688	S
5	0.781	1.563	2.344	S
6	0.391	0.781	1.172	CMF
7	0.195	0.391	0.586	CMI
8	0.098	0.195	0.293	R
9	0.049	0.098	0.146	R
10	0.024	0.049	0.073	R
11	0.012	0.024	0.037	R
12	0.006	0.012	0.018	R
13	0.003	0.006	0.009	R
14	0.002	0.003	0.005	R

V. DISCUSION

En la tabla 9, se muestra la identificación macroscópica y microscópica de *Trychophyton mentagrophytes*, se encontraron dos colonias con características macroscópicas correspondiente a *Trychophyton mentagrophytes*, a los cuales se realizó microcultivo para su identificación confirmativa, resultando ser ambos *Trychophyton mentagrophytes*, una fue elegida para la prueba de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantiun L.*

Trychophyton mentagrophytes es un dermatofito abundante y frecuente en las micosis humanas que causa, como lo muestra Lujan.³⁸ En el que concluye que se encontró una frecuencia de 46% de micosis superficial humana en personas con signos de micosis. Las especies de dermatofitos identificados en orden de frecuencia fueron *Trichophyton spp.* (21) 45.6%, *Trichophyton rubrum* (17) 37.0% y *Trichophyton mentagrophytes* (8) 17.4%. Y Romero et al.³⁹, realizaron un estudio de dermatofitosis en estudiantes de la Institución Educativa "San Juan de la Frontera", Ayacucho-Perú 2010; en el cual halló la frecuencia de 68% de dermatofitosis, 47% en muestras de los espacios interdigitales. La especie de dermatofito más frecuente fue *T. mentagrophytes* (48.5%) seguido de *T. rubrum* (26.5%), hallaron 68% de los estudiantes con dermatofitosis, siendo los espacios interdigitales de los pies la zona anatómica más afectada por dermatofitos (47%) seguido de la cara (29.4%) y el tronco (19.15), la especie de dermatofito más frecuente fue *T. mentagrophytes* (48.5%). Y en otras regiones de Sudamérica como el estudio realizado en Colombia por Samiento et al.⁴⁰, en el estudio de estandarización e implementación de las técnicas en el diagnóstico clínico de micosis cutáneas en el laboratorio de Micología de la Pontificia Universidad Javeriana Bogotá - Colombia 2006, donde tomaron muestras a través de raspados de la zona afectada para

observar directamente y en cultivo encontraron que los agentes aislados con mayor frecuencia son *Fusarium solani* 31%, *Trichophyton rubrum* 26%, *Scopulariopsis* 13%, *Trichophyton mentagrophytes* 8%, *Microsporum canis* 5% y *Epidermophyton floccosum* 3%. Podemos observar que la frecuencia varía en cada uno de los estudios a pesar de que se realizaron en la misma ciudad.

En la figura 5, se muestra los promedios de los halos de inhibición de las concentraciones del aceite esencial de *Citrus aurantium L.* "naranja" del 1% (14,60 mm), 5% (21,00 mm), 10% (27,30 mm), 20% (37,83 mm), son menores al Clotrimazol (43,17 mm), las concentraciones de 30% y 50% presentaron halos de inhibición de 52,6 mm y eliminación total en la superficie del medio respectivamente; superior al clotrimazol, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,05$). La media de los halos de inhibición que obtiene Acharte.¹⁴ en la actividad antimicótica de *Citrus aurantium L.* frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC1023, para la concentración del 30% es de 22,50mm, esta diferencia muy notoria se debe a la diferencia en la técnica, difusión en pocillo y disco de papel en superficie, los microorganismos evaluados con el aceite esencial de *Citrus aurantium L.* son diferentes. Las investigaciones muestran también resultados diferentes en cuanto al diámetro del halo de inhibición, debido a que las sustancias actúan de manera distinta sobre un mismo microorganismo.

En la figura 6, los porcentajes de inhibición del aceite esencial de *Citrus aurantium L.* "naranja" correspondientes al 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, respecto al clotrimazol, fueron el 33,97%, 48,64%, 63,32%, 87,64%, 122%, respectivamente. Acharte.¹⁴ en la actividad antimicótica de *Citrus aurantium L.* frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC1023, reporta para la concentración del 30%, el porcentaje de inhibición con respecto a la nistatina es 107,23%. Los fármacos por su naturaleza también se diferencian en la acción fungicida y fungistática, y nuevamente la técnica del experimento influye, como también el microorganismo en estudio.

Según Ingraham e Ingraham.³⁷, el tubo transparente que contenga la concentración de droga más baja (máxima dilución) corresponde al a CMI de la droga. Si los organismos no crecen en el medio Agar Saboraud Dextrosa significa que han muerto, esta concentración de la droga será fungicida, el tubo con la concentración más baja (máxima dilución) corresponderá a la CMF de la droga. En la Tabla 10, los resultados del CMI y CMF, la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima fungicida del aceite esencial de *Citrus aurantium L.*

frente a *T. mentagrophytes*, presento 0,586 y 1,172 respectivamente. Acharte.¹⁴ reporta un CMI de 0,122mg/ml y CMF de 0,244mg/ml, es mayor la concentración que requiere el dermatofito para ser eliminado a comparación de *Candida albicans*. Demás estudios sobre la acción del aceite esencial de *Citrus aurantium L.* sobre otros microorganismos reportan como el estudio de Alzate et al.² se determinó, mediante dilución en agar, la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de distintos aceites esenciales de naranja contra 11 cepas de Salmonella, obteniendo resultados satisfactorios y CMI entre 0,125% y 1%.

De acuerdo a las comparaciones múltiples de Tukey los halos de inhibición del aceite esencial de *Citrus aurantium L.* del 1%, 5%,10%, 20%, 30%, son estadísticamente distintos ($p < 0,05$) al valor del halo de inhibición del clotrimazol que tiene un valor de 43,17mm, tal como lo muestra en el análisis de comparaciones múltiples de Tukey (Anexo 2). De una concentración a la siguiente existe una diferencia marcada, es decir no existe similitud de la acción antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium L.* de una concentración del 30% con una concentración del 20% o el 10%.

De acuerdo al análisis de comparaciones múltiples de Tukey del (Anexo 4), los porcentajes de inhibición de 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, son estadísticamente distintos ($p < 0,05$), determinando que estas concentraciones tienen efecto antimicótico distinto.

El porcentaje del coeficiente de variabilidad del clotrimazol, del aceite esencial a la concentración del 30%, presentó resultado homogéneo de 1,59 y 0,7, respectivamente, sin mucha variación en las repeticiones (Anexo 11).

La densidad de los aceites esenciales varía de 0,84 a 1,18g/cm³; siendo, la gran mayoría, menos densa que el agua. Poseen un índice de refracción elevado, con un promedio de 1,5 y generalmente presentan actividad óptica.³ la densidad es de 0,8418 g/ml e índice de refracción de 1,4130, como se muestra el (Anexo 6). Es semejante al que obtuvo Acharte¹⁴ el cual reporta 0,8444 mg/ml e índice de refracción de 1,4715.

Los aceites esenciales son conocidos por ejercer actividad antimicrobiana, aunque el mecanismo por el cual actúan no está totalmente entendido, puede involucrarse en éste la destrucción de la membrana microbiana por los constituyentes lipofílicos que poseen, y estudios recientes reportan otros efectos como cambios en la morfología del hongo que incluyen daños sobre estructuras como conidios, macroconidias e hifas, así como la disminución en la producción de micotoxinas.¹

Un estudio sobre el aceite esencial de la naranja recuperado de la piel del fruto de la naranja, reporta un mayor rendimiento de aceite mediante la extracción con vapor de agua, especialmente a medida que se aumenta el flujo y la presión. El aceite de la naranja contiene más del 90% de limoneno, componente mayoritario en su composición normal y además, en menor proporción, contiene una gran cantidad de terpenos. La cascara de naranja que es considerado un residuo, se amontona al aire libre, con este estudio se pretende añadir un valor agregado al fruto, por la aplicación potencial que se puede dar a la cascara, a partir de la extracción y comercialización de su aceite.³⁶

El pericarpio fresco de naranja amarga también llamado naranja de Sevilla produce, por expresión, un aceite esencial bastante parecido a la naranja dulce, menos rico en compuestos carbonílicos: 96-98% de limoneno y otros hidrocarburos (mirceno, α -pipeno, etc.), 0,4 – 0,5% de aldehídos alifáticos, aproximadamente 0,1 % de aldehídos monoterpénicos 0,5 – 2,9% de compuestos carbonílicos expresados en decanal).²⁸

La cáscara de naranja agria presentó el contenido fenólico más alto de los cítricos analizados (14.72 ± 0.13 g / 100g), aplicando las mejores condiciones de extracción determinadas por el diseño factorial. La cáscara de naranja agria presentó los contenidos más altos de naringina (4279.56 ± 50.84 mg/100g) y hesperidina (906.37 ± 2.13).³⁰

Se han encontrado 200 compuestos químicos diferentes, presentes en el aceite esencial de naranja, de los cuales se ha identificado 100. Los mono terpenos abarcan hasta el 97% de la composición, con alcoholes, aldehídos y ésteres abarcando el menor porcentaje de componentes (1.8 a 2.2 %) El principal componente de dichos aceites es el limoneno que puede llegar a abarcar hasta un 98% de la composición del aceite esencial de la naranja.²⁹

Los derivados de los fenoles halogenados como la haloprogina posee acciones fungistáticas y fungicidas sobre diversos hongos de los géneros *Trychophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*, su modo de acción, se acepta que los la haloprogina actúa aumentando la permeabilidad de la membrana celular de los hongos, evidenciado por la pérdida de potasio intracelular, lo que es deletéreo para los mismos; además se ha comprobado una disminución de la utilización de oxígeno por las células micóticas.¹⁷

Dentro de los metabolitos secundarios con actividad fungicida se encuentran los provenientes de la fracción líquida volátil que contiene las sustancias responsables del aroma de las plantas o aceites esenciales. Generalmente son mezclas complejas de hasta más de cien componentes de bajo peso molecular como compuestos alifáticos simples, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos, que hacen parte de los monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanos.³

Algunos estudios demuestran que los componentes de menor proporción tienen un papel crítico en la actividad antimicrobiana, posiblemente debido a un efecto sinérgico entre ellos, de forma que el aceite esencial entero tiene una mayor actividad que la mezcla de sus principios mayoritarios. Al ser sustancias volátiles, los aceites esenciales se han de estabilizar y proteger para asegurar la conservación de sus propiedades durante el almacenamiento. Los aceites esenciales poseen notables propiedades antimicrobianas, sin embargo, su mecanismo de acción aún no está definido. Hasta la fecha la mayoría de los estudios realizados sobre las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales, se han centrado en microorganismos patógenos para el hombre.¹⁴

Las sustancias bioactivas extraídas de plantas aun no fueron totalmente estudiadas en su composición y el mecanismo de acción que tienen. Pueden actuar en conjunto o solo uno de los componentes mayoritarios que a diferencia de los fármacos que tienen un mecanismo de acción conocida que se puede centrar en la membrana, la pared celular o el núcleo dependiendo de la naturaleza y el tipo de fármaco, así también se conoce las consecuencias secundarias como el daño hepático que causan estos fármacos al ser usados frecuentemente por los pacientes.

Muchas plantas han sido para uso antifúngico porque su análisis químico y evaluación farmacológica han demostrado que contiene un principio bioactivo, la búsqueda es muy intensa en todo el mundo fundada en tratamientos naturales para explorar el parentesco sistemático con plantas curativas ya reconocidas que han servido para hallar otras nuevas.

La acción del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" sobre microorganismos y hongos patógenos reportan efectos positivos con halos de inhibición superiores al control, que nos lleva a atribuirle una acción significativa para el uso como nuevo tratamiento natural para las micosis y las *tineas* causadas por dermatofitos y en especial causadas por *T. mentagrophytes*.

Las concentraciones a las cuales se produjo la inhibición son similares con respecto a otros estudios realizados, en el Anexo 7 se muestra la concentración de las sustancias y su origen que actúan como inhibidor y fungicida en los diferentes patógenos.

En cuanto a la acción de otras sustancias originarias de especies diferentes a *Citrus aurantium L.* y cítricos y la acción sobre el dermatofito *Trychophyton mentagrophytes* observamos en el Anexo 7, los halos de inhibición oscilan entre 15 a 22 mm a concentraciones del 100% y 50%, en el estudio realizado de la acción antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium L.* sobre *Trychophyton mentagrophytes* a una concentración de 30% reporta un promedio del halo de 52,6 mm y del 50% es indeterminado por la inhibición total sobre la superficie del medio ADS, indicando superioridad ante las demás sustancias.

Los componentes fenólicos que se muestran como la naringina y hesperidina podrían ser los componentes más activos en la interacción sinérgica para la acción antimicótica sobre el dermatofito en prueba. Que al igual en el estudio que se realizó con halos de inhibición superiores al control, muestra una acción agresiva ante el *Trychophyton mentagrophytes*, al 30% tiene la acción superior y al 50% fulmina totalmente al dermatofito sobre la superficie del medio Agar Saboraud Dextrosa.

VI. CONCLUSIONES

1. El aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" al 30% y 50%, presentaron mayor actividad antimicótica, respecto a las demás concentraciones, que es superior al clotrimazol, siendo estadísticamente significativa ($p < 0,05$).
2. La Concentración Mínima Inhibitoria, frente a *Trychophyton mentagrophytes*, producido por el aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja", fue 0,586 mg/ml.
3. La Concentración Mínima Fungicida frente a *Trychophyton mentagrophytes*, producido por el aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja", fue 1,172 mg/ml

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar el estudio de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium L.* sobre demás dermatofitos causantes de las diferentes *tineas*
- Realizar pruebas *in vivo* de la acción antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium L.* sobre dermatofitos
- Realizar un estudio de caracterización de los compuestos fenólicos del aceite esencial de *Citrus aurantium L.*

VIII. REFERENCIA BIBIOGRAFICA

1. Rendon Sosa S, Torres Orellana L. Determinación de la actividad antimicótica de las fracciones obtenidas de la cromatografía de columna procedentes del extracto diclorometanico de la gomaresina de *Eucalyptuscitriodora* (eucalipto).[Tesis pregrado]. San Salvador: Universidad de El Salvador; 2012.
2. ÁlzateN, López V, Marín H, Murillo A. Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptustereticomis, myrtaceae*) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis, rutaceae*) sobre algunos hongos filamentosos.Tumbaga [Revista en internet]* 2009 setiembre. [acceso 29 de septiembre de 2014]; 59-71.Disponible en: <http://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3631002.pdf>
3. Río J, Porras I, Martínez D, Gómez P, Díaz L, García A, Riquelme F, Ortuño A. Efecto de la conservación en frío y manipulación post-cosecha de frutos de *citrus limón* (CV. FINO-49) sobre los niveles de flavonoides y resistencia a *Penicillium digitatum*. España. Universidad de Murcia. 2007. [acceso 8 de septiembre de 2014]
Disponible en:<http://www.horticom.com/pd/imagenes/68/450/68450.pdf>
4. Mesa A, Bueno J, Betencur L. Productos naturales con actividad antimicótica. Revista española de Quimioterapia [revista en internet]* 2004 diciembre. [acceso 4 de octubre de 2014]; 17(4): [325-331].Disponible en: <http://seq.es/seq/0214-3429/17/4/325.pdf>
5. Roa VC, Tangarife V, Zapata B, Mesa AC, Betancur LA, San Feliciano A. Evaluación in vitro de la actividad antimicótica y antiviral de derivados de terpenil-1,4-nafto- y 1,4-antracenodiona.Actual Biol[revista en internet]*2012[acceso 7 de octubre de 2014]; 34 (96): [113-132].Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0304-35842012000100021&script=sci_arttext
6. Alvares M, Isaza G, Acosta S, Yapes A. Actividad antimicótica de *Phenax rugosus (lam) pers* y *Baccharis trinervis (sw) wedd*. Biosalud [revista en internet]*2005 enero diciembre [acceso 7 de noviembre de 2014]; [38-45]. Disponible en:http://biosalud.ucaldas.edu.co/downloads/Revista%204_5.pdf
7. Rodríguez R, Morales E, Verde J, Oranday A, Rivas C, Núñez A, González G, Treviño J. Actividad antibacteriana y antifúngica de las especies *Ariocarpus kotschoubeyanus* (Lemaire) y *Ariocarpus retusus* (Scheidweiler) (Cactaceae). Revista mexicana de ciencias farmacéuticas [revista en internet]* 2010 enero marzo [acceso 10 de noviembre de 2014]; 41(1): [55-59].Disponible en:<http://www.redalyc.org/pdf/579/57912960007.pdf>
8. Treviño J, Rodriguez R, Verde J, Morales E, Garza R, Rivas C Oranday A. Actividad antifúngica de *Stenocereuspruinosis* y *Echinocereusstramineus*. Revista mexicana de ciencias farmacéuticas [revista en internet]* 2012 enero [acceso 10 de noviembre de 2014]; 43(1): [42-548].Disponible en:<http://www.redalyc.org/pdf/579/57924376005.pdf>
9. Roa V, Mesa A, González M. Evaluación de la actividad antimicótica *in vitro* de nueve derivados *Bisimidaperileno*. Vitae [revista en internet]* 2014 enero [acceso 14 de noviembre de 2014]; 21(1): [S105-S106].Disponible en:<http://www.redalyc.org/pdf/1698/169831208052.pdf>
10. Cano C, Bonilla P, Roque M, Ruiz J. Actividad antimicótica *in vitro* y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). Rev Peru Med Exp Salud Publica [revista en internet]* 2008 febrero. [acceso 21 de noviembre de 2014]; 25(3): [298-301].Disponible en:.....

11. Limachi C. Actividad antimicótica de los extractos de *Allium sativum* "ajo" frente a los dermatofitos. [tesis pregrado] Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho - Perú. 2004.
12. Tueros R. Efecto antimicótico de *Euphorbiaeplus* "leche leche" frente a hongos dermatofitos. [tesis pregrado] Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho - Perú. 2005.
13. Vargas R. Efecto antimicótico del *Plumbago coerulea* "yanawarmi" sobre hongos dermatofitos y *Candida albicans*. [tesis pregrado] Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho - Perú. 2004.
14. Acharte D. Actividad antimicótica del aceite esencial de *Citrus aurantium L.* "naranja" frente a una cepa de *Candida albicans* ATCC 1023. [tesis pregrado] Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho - Perú. 2010.
15. Gregori B. Estructura y actividad de los antifúngicos. Rev Cubana Farm [revista en internet]*2005 marzo [acceso 21 de noviembre de 2014]; 39(2): [1-15]. Disponible en: http://www.bvs.sld.cu/revistas/far/vol39_2_05/far12205.htm
16. Barrios A. Validación farmacológica de la acción sedante e hipnótica de rizoma de *Valeriana prionophylla* (valeriana) en combinación con hojas de *Passifloraedulis* (flor de la pasión), flor con bráctea de *Tilia platyphyllos* (tilo) o pericarpio de *Citrus aurantium* (naranja agria) en infusión. [tesis pregrado] Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala. 2007.
17. Littter M. Compendio de farmacología. 4ª ed. Buenos Aires: El Ateneo; 1992.
18. Meyers F, Jawetz E, Goldfien A. Farmacología Clínica. 5ªed. México: El manual moderno; 1982.
19. Escobar C, Zuluaga A. Nuevos antimicóticos y su uso en dermatología. Med Cutan IberLat Am [revista en internet]* 2004 noviembre - diciembre [acceso 23 de noviembre de 2014]; 32(6): [231-242]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/cutanea/mc-2004/mc046b.pdf>
20. Allevato M, Negroni R. Antifúngicos Ayer, hoy y mañana ActTerap Dermato [revista en internet]* 2007 [acceso 23 de noviembre de 2014]; 30(8): [8-19]. Disponible en: http://www.atdermae.com/pdfs/atd_30_01_02.pdf
21. Morín Ch. Cultivo de cítricos. 2ª ed. Perú: Studium, S.A; 1980.
22. Agustí M. Citricultura. 2ª ed. España: Mundi-Prensa; 2003.
23. Kimball D. Procesado de cítricos. 2ª ed. España: Acribia S.A.; 2001.
24. León J. Botánica de los cultivos tropicales. 3º ed. Costa Rica: Agroamerica del IICA; 2000.
25. Wikipedia. [base de datos en internet]. at large; 31 diciembre 1896, [28 octubre 2014; 21 noviembre 2014]. Disponible: http://es.wikipedia.org/wiki/Citrus_%C3%97_aurantiumhttp
26. Vega J. Regeneración *in vitro* de naranjo agrio (*Citrus aurantium Linn.*). [tesis doctorado] Universidad Autónoma de Nuevo León. Nuevo León – España. 1997. Disponible en: <http://cdigital.dgb.uanl.mx/te/1080080882.pdf>
27. López Gonzales G A. Guía de los árboles y arbustos de la Península Ibérica y Baleares. 3º ed. México: Mundi - Prensa; 2007.
28. Bruneton J. Farmacognosia. 2ª edición. Editorial Acribia, S.A. España, 2001.
29. Flores E, Velasco P, Figueroa N, Giménez A. Aceites esenciales con propiedades antimicrobianas. Biofarbo [revista en internet]* 1999 diciembre [acceso 14 de noviembre de 2014]; 7(1): [5-8]. Disponible en: <http://www.ops.org.bo/textocompleto/rnbiofa99070701.pdf>
30. Escobar Blanco M. Extracción de compuestos fenólicos de las cáscaras de cítricos producidos en México [tesis postgrado]. México. Sección de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Politécnico Nacional; 2010. Disponible en: <http://itzamna.bnct.ipn.mx/dspace/bitstream/123456789/9612/1/34.pdf>

31. Fugh A, Myers A. Citrus aurantium, an Ingredient of Dietary Supplements Marketed for Weight Loss: Current Status of Clinical and Basic Research. Department of Physiology and Biophysics, Georgetown University, Washington, District of Columbia 20057 Disponible en: http://www.fugh-berman.com/files/Citrus_aurantiu.pdf
32. Fernández R, Segundo C, Arenas R, Da Silva D, Guzmán A. Determinación de las variedades de *Trichophyton mentagrophytes* en 10 casos de dermatofitosis de Paraguay. Paraguay. Universidad Nacional de Asunción. 2002. [acceso 7 septiembre de 2013]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57627203>
33. Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. 19ª ed. México: Manual moderno; 2008.
34. Mazza M. Epidemiología descriptiva y análisis espacial exploratorio de los dermatofitos en la provincia de Buenos Aires (2002 – 2007). [tesis pregrado] 2010. Disponible en: <http://bvssp.iciict.fiocruz.br/lildbi/docsonline/get.php?id=2481>
35. Fernández B. Sensibilidad antifúngica de los dermatofitos. Tesis Doctoral. España. Universitat Rovira i Virgili Reus; 2005. [acceso 17 de septiembre de 2013]. Disponible en: <http://www.tdx.cat/bitstream/10803/8718/1/TesisdoctoralporBelkysFernandez-Torres.pdf>
36. Yañes X, Lugo L y Parada D. Estudio del aceite esencial de la cascara de la naranja dulce (*Citrus sinensis*, variedad valenciana) cultivada en Labateca – Colombia. Revista de la Facultad de Ciencias Básicas Universidad de Pamplona [revista en internet] 2007 [acceso 27 de noviembre de 2014]; 5(1): [3-8]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/903/90350101.pdf>
37. Ingraham J, Ingraham C. Introducción a la Microbiología. México: Manual Moderno. 1998
38. Lujan Y. Dermatofitos asociados a micosis superficial humana. [tesis pregrado] Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho - Perú. 2012
39. Romero S, Guevara R. Dermatofitosis en estudiantes de la Institución Educativa “San Juan de la Frontera”, Ayacucho, Perú. 2010. Disponible en: http://rpe.epiredperu.net/rpe_ediciones/2011_V15_N01/CC11_Vol15_No1_2011.html
40. Sarmiento C, Trujillo M. Estandarización e implementación de las técnicas en el diagnóstico clínico de micosis cutáneas en el laboratorio de micología de la pontificia universidad javeriana. 2006. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis166.pdf>

ANEXOS

Anexo 1: Análisis de varianza para el número de halos de inhibición de las concentraciones del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" y el control frente a *Trychophyton mentagrophytes*

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Inter grupos	5	6152,556	1230,511	4520,245	0.000
Intra grupos	30	8,167	0.272		
Total	35	6160,722			

Anexo 2: Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los halos de inhibición del efecto antimicótico del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" y el control frente a *Trychophyton mentagrophytes*.

Tratamiento	N	Media	Agrupación
Clotirmazol	6	43,17	A
30.00%	6	52,6	B
20.00%	6	37,83	C
10.00%	6	27,3	D
5.00%	6	21	E
1.00%	6	14,6	F

Anexo 3: Análisis de varianza para el número de porcentajes de inhibición de las concentraciones del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a *Trychophyton mentagrophytes*

Fuente	GL	SC	CM	F	P
Inter grupos	4	28845,281	7211,32	6293,510	0.000
Intra grupos	25	28,644	1,460		
Total	29	28873,932			

Anexo 4: Prueba de comparaciones múltiples de Tukey de los porcentajes de inhibición del efecto antimicótico del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a *Trychophyton mentagrophytes*.

Tratamiento	N	Media	Agrupación
30.00%	6	122,0	A
20.00%	6	87,64	B
10.00%	6	63,32	C
5.00%	6	48,64	D
1.00%	6	33,97	E

Anexo 5: Características organolépticas del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja"

Características organolépticas del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. "naranja"	
Aspecto	: Líquido y viscoso
Color	: Incoloro
Olor	: Característico (muy acentuado)
Sabor	: Característico (ácido)

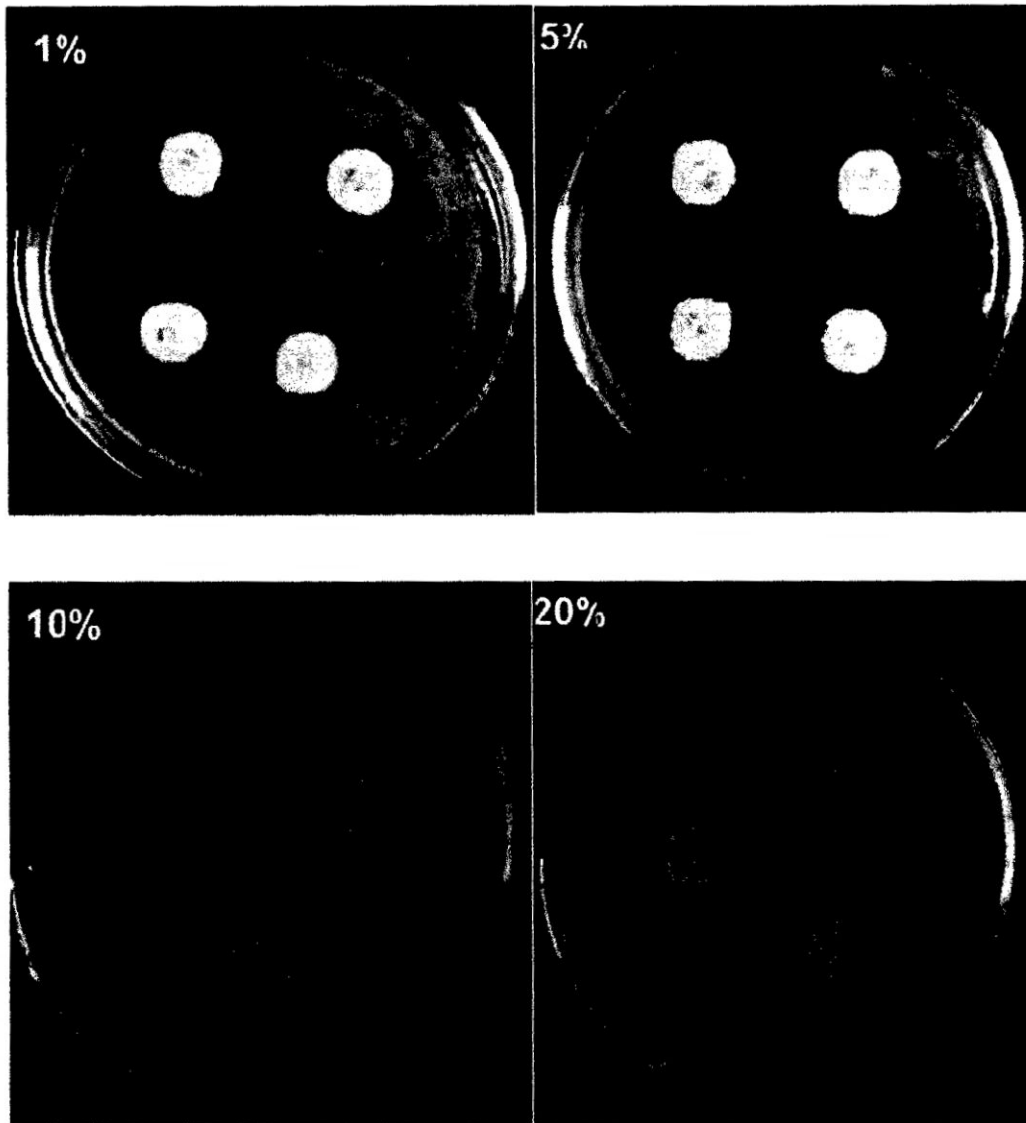
Anexo 6: Características físico - químicas del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja"

Características Fisicoquímicas	Valores
Densidad	0,8418 g/ml
Índice de refracción	1,4130
%de solidos solubles	71,0
Índice de Acidez	1,9803 mg KOH/g AE
Índice de Ester	2,9683 mg KOH/g AE

Anexo 7: Concentración fungicida de sustancias antimicóticas sobre patógenos

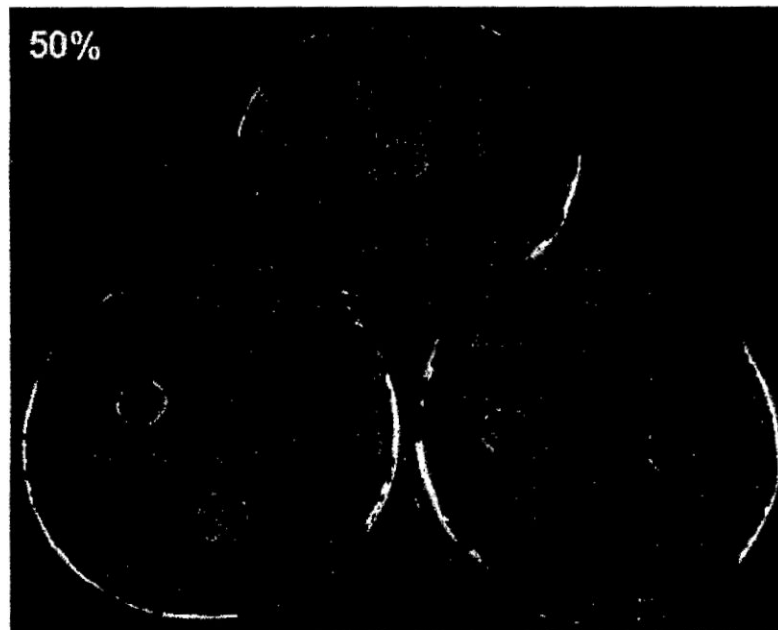
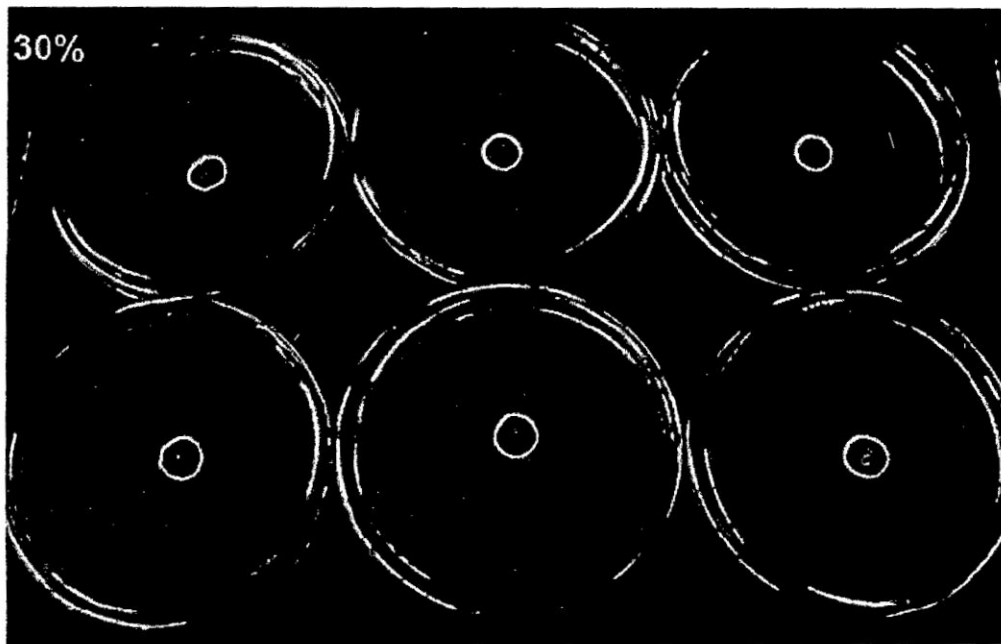
Sustancia	Concentración	Patógeno
Aceite esencial de naranja	MIC: 0,125% y 1%	11 cepas de salmonella
Aceite esencial de naranja	CMF: 1:1000 ppm	<i>Trichoderma harzianum</i>
Hojas de <i>Melaleuca alternifolia</i>	29%, 45%	Bacterias, <i>Candida</i> y <i>Malassezia</i> , dermatofitos
Quinonas (1,4-antracenediona)	2,0 - 20,16 µg/ml	Hongos (<i>Trychophyton mentagrophytes</i>)
<i>A. retusus</i>	CL50: 263.68 y 738.00 mg/mL	Dermatofitos
<i>Artemia salina</i>	CL50: > 500 mg/mL	Dermatofitos, <i>Candida</i>
<i>Eucalyptus citriodora</i> (n-hexano:acetato de etilo, n-hexano:acetato de etilo)	30%, 50%	<i>Trychophyton mentagrophytes</i> , <i>Candida</i>
<i>Minthostachys mollis</i> (muña)	100%, 5 - 50µL	<i>Trychophyton mentagrophytes</i>
<i>Allium sativum</i> L. "ajo"	21.17 mm	<i>Trychophyton mentagrophytes</i>
<i>Euphorbia peplus</i> "leche leche"	18.44 mm	<i>Trychophyton mentagrophytes</i>
<i>Plumbago coerulea</i> "yanawarmi"	100% (15,20 mm)	<i>Trychophyton mentagrophytes</i>
<i>Citrus aurantium</i> L	30% (22,50 mm)CMI y CMF fue 0,122 mg/ml y 0,244 mg/ml	<i>Candida albicans</i>
<i>Bisimidaperileno</i>	50 µg/mL	<i>Trychophyton mentagrophytes</i>

Anexo 8: Halos de inhibición de las concentraciones de 1%, 5%, 10%, 20% del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a *T. mentagrophytes*

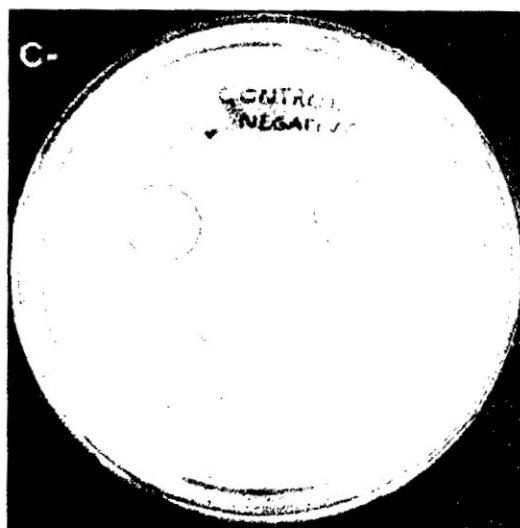
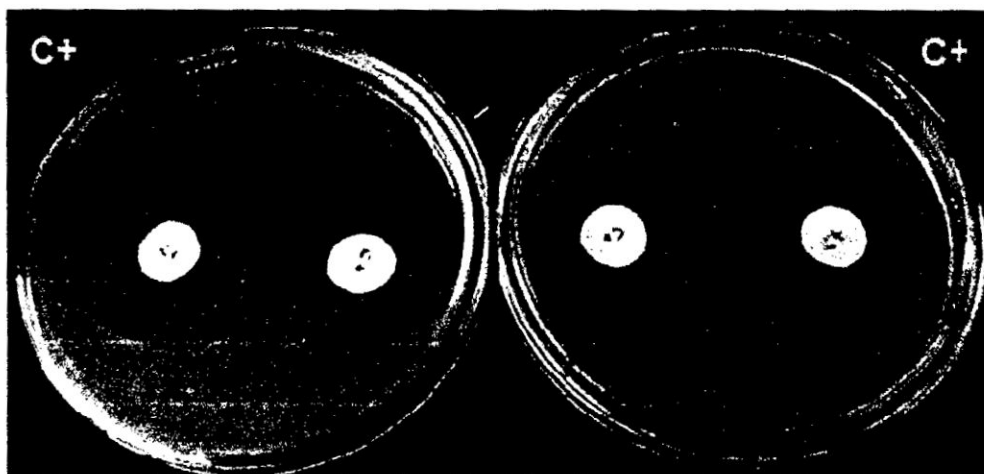


185678

Anexo 9: Halos de inhibición de las concentraciones de 30%, 50% del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a *T. mentagrophytes*



Anexo 10: Halos de inhibición de clotrimazol (control positivo) y control negativo frente a *T. mentagrophytes*



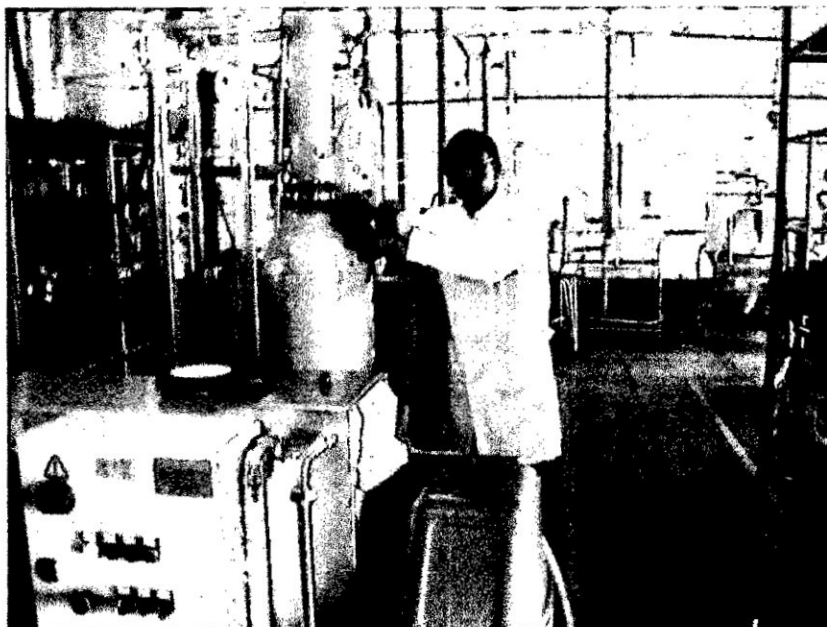
Anexo 11: Diámetro de los halos de inhibición del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a *T. mentagrophytes*

Repeticiones	Control +	Concentraciones				
	(Clotrimazol)	1%	5%	10%	20%	30%
1	42	14	20,5	27	37	52,5
2	44	14,5	21	27,5	38	52,5
3	43	15	21	27	38	53
4	44	15	21	27,5	39	53
5	43	15	21	27,5	37	52
6	43	14,5	21,5	27,5	38	53
Promedio	43,17	14,6	21,00	27,3	37,83	52,6
Desv estándar	0,69	0,37	0,23	0,22	0,69	0,37
%CV	1,59	2,53	1,09	0,80	1,86	0,70

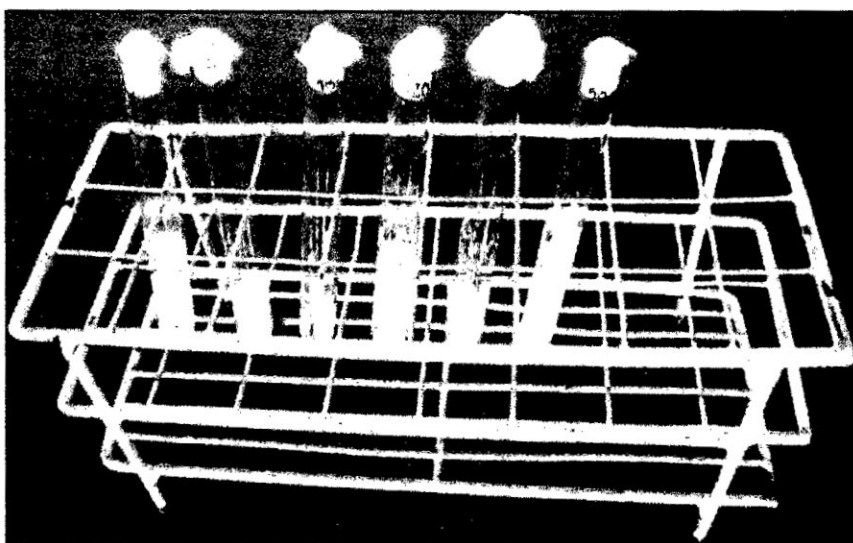
Anexo 12: Porcentaje de inhibición del aceite esencial de *Citrus aurantium* L. "naranja" frente a *T. mentagrophytes*

Repeticiones	1%	5%	10%	20%	30%
1	32.43	47.48	62.54	85.71	121.61
2	33.58	48.64	63.70	88.02	121.61
3	34.75	48.64	62.54	88.02	122.77
4	34.75	48.64	63.70	90.34	122.77
5	34.75	48.64	63.70	85.71	120.45
6	33.58	49.80	63.70	88.02	122.77
Promedio	33.97	48.64	63.32	87.64	122.00
Des. Est	0.86	0.67	0.55	1.59	0.86
%Coef. Variac.	2.54	1.38	0.86	1.82	0.71

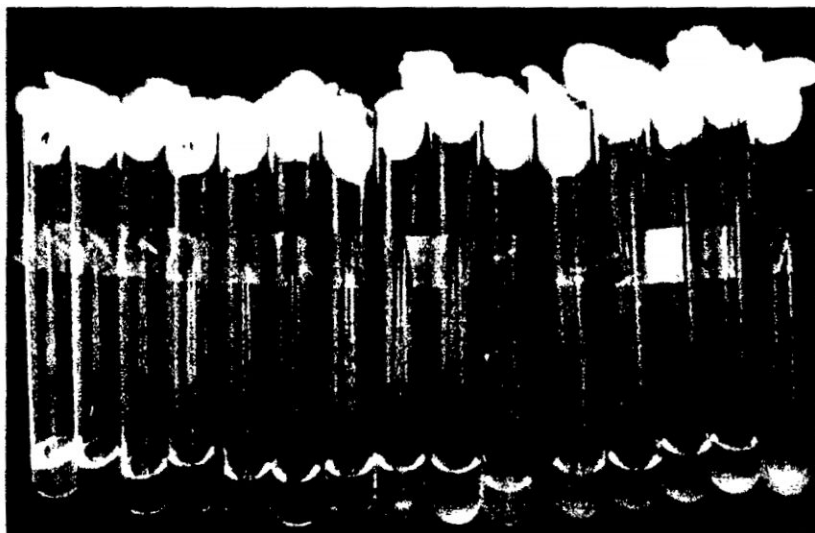
Anexo 13: Proceso de cargado de la muestra al balón de extracción por vapor



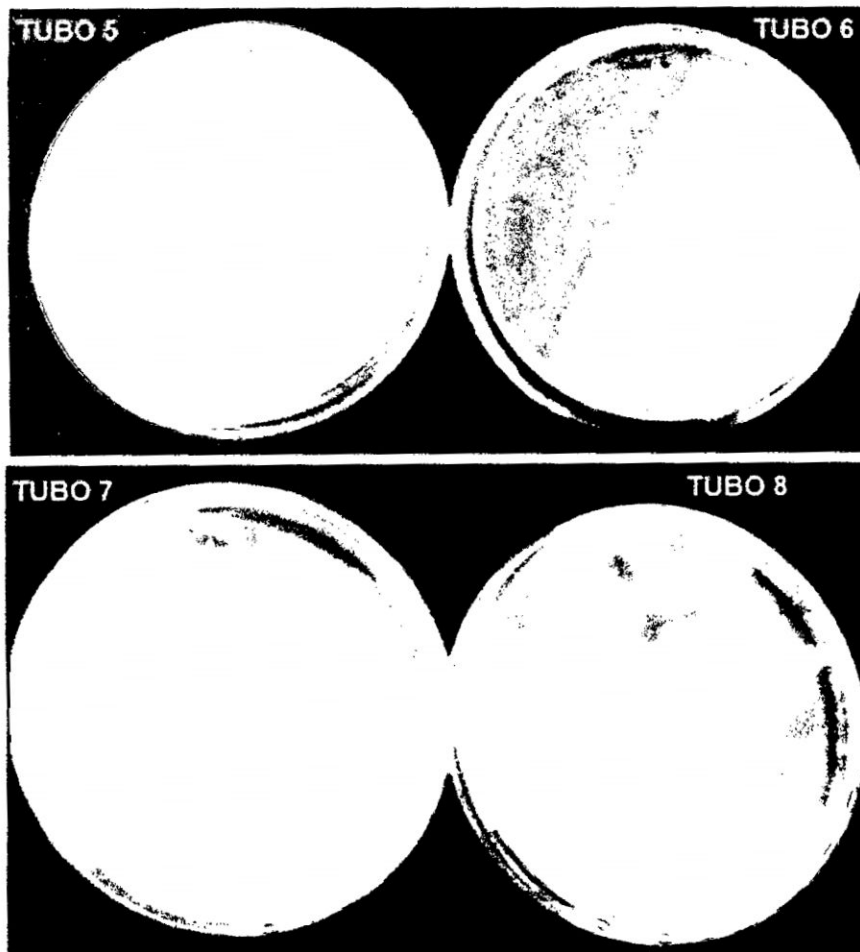
Anexo 14: Aceite esencial de *Citrus aurantium* L. en diferentes concentraciones



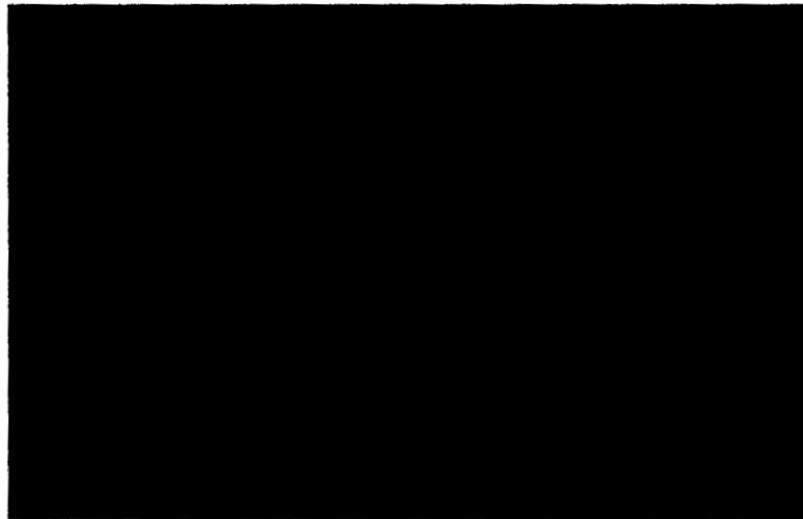
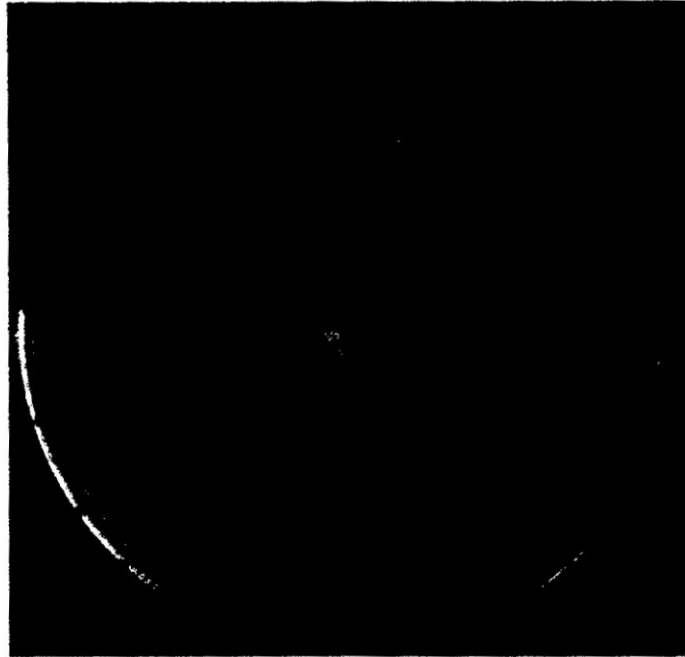
Anexo 15: Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de citrus aurantium frente a *T. mentagrophytes*



Anexo 16: Concentración mínima fungicida del aceite esencial de *Citrus aurantium* frente a *T. mentagrophytes*



Anexo N° 17: Características macroscópicas y microscópicas de *Trychophyton mentagrophytes*



Anexo 18: Matriz de consistencia.

TITULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEORICO	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGIA
Actividad antimicrobica del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. frente a la cepa de <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	¿Presentará actividad antimicrobica el aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> frente a la cepa de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> ?	Evaluar la actividad antimicrobica del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. frente a la cepa de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> . Determina la Concentración Mínima Inhibitoria del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> frente a <i>Trichophyton mentagrophytes</i> Determinar la Concentración Mínima Fungicida del aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. frente a <i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Antecedentes. - Actividad antimicrobica. - Mecanismos de acción de los antimicrobicos. - <i>Citrus aurantium</i> L. - Descripción botánica. - Distribución geográfica. - Aceite esencial de Citrus. - Composición química - Usos medicinales - Estudios farmacológicos de Citrus - Género <i>Trichophyton</i>. - Patogenia - Manifestaciones clínicas - Etiología de <i>Trichophyton mentagrophytes</i> - Tratamiento 	<p>VARIABLE INDEPENDIENTE Aceite esencial de <i>Citrus aurantium</i> L. "naranja".</p> <p>Indicadores: Temperatura 25°C, y inoculo 5% del aceite esencial.</p> <ul style="list-style-type: none"> - 1% - 5% - 10% - 20% - 30% - 50% 	<p>Tipo de investigación: Experimental</p> <p>Población: 300 frutos de naranjo colectadas en la localidad de San Francisco, provincia de Huamanga, departamento de Ayacucho, a una altura de 739 m.s.n.m.</p> <p>Muestra: 13 kg de cáscara de los frutos de <i>Citrus aurantium</i> L. "naranja".</p> <p>Determinación de la actividad antimicrobica La metodología empleada para la determinación de la actividad antimicrobica se basa en el método de difusión en discos de papel.</p> <p>Análisis estadístico Los resultados se procesarán en una (ANOVA) y comparaciones múltiples de Tukey con un programa estadístico Matlab</p>
				<p>VARIABLE DEPENDIENTE Actividad antimicrobica</p> <p>Indicadores:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Halos de inhibición - Concentración mínima inhibitoria (CMI). - Concentración fungicida mínima (CMF) 	