

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

Facultad de Ciencias

Escuela Profesional de Biología - Microbiología

“Evaluación antimicótica “in vitro” del aceite esencial *Origanum vulgare*

“Orégano” frente a *Candida albicans* ATCC 6538”

TESIS

Presentada por:

Bach. ORFILIA NANCY MAMANI CALLACONDO

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO - MICROBIÓLOGO

TACNA – PERÚ

2016

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN, TACNA
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS N° 273 TITULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

El secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias, certifica que por Resolución de Facultad N° 8431-2016-FACI-UN/JBG el Consejo de Facultad ha designado como jurados para la sustentación de la tesis:

"Evaluación antimicótica "in vitro" del aceite esencial *Origanum vulgare* "Orégano" frente a *Candida albicans* ATCC 6538"

El mismo que está conformado por:

PRESIDENTE : MGR. DALADIER MIGUEL CASTILLO COTRINA
SECRETARIO : DR. CÉSAR JULIO CÁCEDA QUIROZ
VOCAL : BLGO. VICTOR CARB AJAL ZEGARRA

Para examinar y calificar la sustentación de tesis en acto público el día 21 de abril del 2016 a las 17:00 horas.

Presentado por la bachiller ORFILIA NANCY MAMANI CALLACONDO de la Escuela Profesional de Biología – Microbiología.

Los miembros del Jurado Calificador, en forma individual y secreta emitieron su calificación sobre la tesis expuesta y procedió a emitir el siguiente resultado.

Aprobado por UNANIMIDAD, con el calificativo de BUENO y promedio de 15.

Para ratificar lo detallado firman:


Daladier Miguel Castillo Cotrina


Dr. César Julio Cáceda Quiroz


Blgo. Victor Carbajal Zegarra

DEDICATORIA

A mis padres, Margarita y Balbino, que son un ejemplo de perseverancia y lucha.

A mis hermanos, que con su ayuda incondicional pude lograr mis metas.

A mi esposo e hijos, con su apoyo y comprensión dan sentido a mi vida.

AGRADECIMIENTO

A mi asesora Blga. Mblga. Angela Choque Miranda, por su valiosa asesoría brindada en la realización del presente trabajo.

Al Blgo. Mblgo. Edwin Obando Velarde, por su tiempo brindado, paciencia, dedicación y su valiosa asesoría.

A mi familia que me apoyaron incondicionalmente en lograr mis objetivos.

CONTENIDO

CAPÍTULO I.....	1
1. INTRODUCCION	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
1.2 JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	7
1.3 OBJETIVOS	8
1.3.1 Objetivo general	8
1.3.2 Objetivos específicos	8
1.4 HIPÓTESIS	8
1.5 DETERMINACIÓN DE LAS VARIABLES	9
1.5.1 Tipos de variables.....	9
1.5.1.1 Variable independiente:	9
1.5.1.2 Variable dependiente:	9
1.6 MARCO TEÓRICO.....	10
1.6.1 Plantas medicinales.	10
1.6.2 <i>Origanum vulgare</i> “Orégano”.	12
1.6.2.1 Descripción del “Orégano”.	12
1.6.2.2 Taxonomía del “Orégano”.	14
1.6.2.3 Composición química del “Orégano”.	15
1.6.2.4 Aplicaciones del “Oregano”. (Del Villar, 2010).....	16
1.6.3 Aceites esenciales.....	18
1.6.3.1 Generalidades de los aceites esenciales..	18
1.6.3.2 Composicion química de los aceites esenciales..	19

1.6.3.2.1 No terpenoide	19
1.6.3.2.2 Terpenoides.....	19
1.6.3.3 Extracción del aceite esencial por destilación por arrastres con vapor..	25
1.6.3.4 Aplicaciones de los aceites esenciales.	25
1.6.4 <i>Candida albicans</i>	27
1.6.4.1 Historia	27
1.6.4.2 Descripción general.	28
1.6.4.3 Características.....	29
1.6.4.4 Genoma.....	30
1.6.4.5 Clasificación científica.	33
1.6.4.6 Composición química.	33
1.6.4.7 Factores de virulencia.	35
1.6.4.8 Epidemiología.....	36
1.6.5 Candidiasis.....	38
1.6.5.1 Generalidades.....	38
1.6.5.2 Tipos de candidiasis.....	39
1.6.5.2.1 Candidiasis mucocutánea:	39
1.6.5.2.2 Candidiasis cutánea:	41
1.6.5.2.3 Candidiasis Diseminada:	41
1.7 ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	41
CAPÍTULO II.....	46
2. MATERIAL Y MÉTODOS	46
2.1 LUGAR DE ESTUDIOS	46
2.2 TIPO DE ESTUDIOS	46
2.3 DISEÑO EXPERIMENTAL	46

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
2.5 UNIDADES DE ESTUDIO.....	47
2.6 MATERIAL DE LABORATORIO	47
2.6.1 Equipos.....	47
2.6.2 Materiales de vidrio	47
2.6.3 Medios de cultivo.....	48
2.6.4 Reactivos.....	48
2.6.5 Otros.....	48
2.7 METODOLOGÍA.....	49
2.7.1 <i>Origanum vulgare</i> “Orégano”	49
2.7.1.1 Obtención de la muestra.....	49
2.7.1.2 Obtención del aceite esencial.....	50
2.7.1.3 Evaluación de la actividad del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 6538.....	50
2.7.1.3.1 Determinación de la concentración del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i>	50
2.7.1.3.2 Preparación del inóculo: Estandarización de la población micótica de estudio para la prueba de susceptibilidad en placa.....	52
2.7.1.3.3 Preparación de los discos de Sensibilidad con las diferentes concentraciones del aceite volátil de <i>Origanum vulgare</i>	53
2.7.1.3.4 Prueba de Susceptibilidad: Método difusión en Disco (Kirby-Bauer).....	53
2.7.1.3.5 Valores de sensibilidad según Duraffourd.....	55
2.7.1.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.(CMI): Método de macrodilución en medio líquido.....	55
2.7.1.4.1 Preparación de la solución madre.....	55

2.7.1.4.2 Preparación del inóculo: estandarización de la población micótica de <i>Candida albicans</i>	56
2.7.1.4.3 Preparación de la macro dilución en medio líquido.	56
2.7.1.5 Determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF).....	57
2.7.1.6 Procesamiento y análisis estadístico.	58
CAPÍTULO III	59
3. RESULTADOS.....	59
CAPÍTULO IV.....	72
4. DISCUSIÓN.....	72
CAPÍTULO V.....	80
5. CONCLUSIONES	80
CAPÍTULO VI.....	81
6. RECOMENDACIONES	81
BIBLIOGRAFÍA	82
ANEXOS.....	92

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1. Variables e indicadores	9
Tabla 2 .Grupos funcionales de cada categoría de aceites esenciales.....	24
Tabla 3 .Concentración del aceite esencial en disco de sensibilidad.	54
Tabla 4 .Concentración final de los tratamientos para la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	57
Tabla 5.Composición fitoquímica del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> “Orégano”	60
Tabla 6 .Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> “Orégano”,.....	62
Tabla 7 .Determinación del grado de sensibilidad de <i>Candida albicans</i> ATCC 6538 a diferentes concentraciones del aceite esencial de <i>Origanum</i> <i>vulgare</i> (Orégano).....	64
Tabla 8 Análisis de varianza (ANOVA) para comparar la actividad fungicida del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> (Orégano).	65
Tabla 9 .Prueba de significación de Tukey para actividad antibacteriana del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> (Orégano) frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 6538	67
Tabla 10 . Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> “Orégano” frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 6538. 69	

Tabla 11 .Determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> “Oregano” frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 6538.....	71
---	----

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura 1. Plantilla de lectura de Nefelómetro de Mac Farland (National Committee for Clinical Laboratory Standards).....	52
Figura 2. Distribución de promedios de halos de inhibición en base al efecto del aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> (Orégano) en disco frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 6538.	63
Figura 3. Medias e intervalos de Tukey HSD al 95,0	68

RESUMEN

En el presente trabajo se evaluó el efecto antimicótico del aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” frente a la levadura *Candida albicans* ATCC 6538; el aceite esencial se extrajo de la planta por la técnica de destilación por arrastre de vapor; al aceite esencial así obtenido se le realizaron pruebas “in vitro” de sensibilidad antimicótica, como son: Método de difusión de Kirby Bauer en la cual demostró tener un efecto “altamente sensible”, luego por el método de Dilución en tubo se encontró una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a la concentración de 0,805358 mg/ml, y la Concentración Mínima Fungicida fue a 0,8754 mg/ml. *Candida albicans* ATCC 6538 demostró tener sensibilidad frente al aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” lo que podría constituir una alternativa eficiente para el tratamiento de alguna enfermedad producida por esta levadura.

Palabras clave: Aceite esencial, orégano, antifúngico

CAPÍTULO I

1. Introducción

El Perú es conocido como el tercer país mega-biodiverso del mundo, siendo catalogado por algunos científicos como el segundo o primero, porque posee una extraordinaria riqueza biológica, fuente natural de moléculas bioactivas. La diversidad vegetal peruana llega aproximadamente a unas 50 000 especies detectadas, mientras que todo el continente europeo posee 12 000 especies. Razones sobran para maximizar el aprovechamiento sostenible de nuestros recursos naturales, previamente validados científica y tecnológicamente con los respectivos estudios (Brack & Heinz, 2002).

En el Perú, en 1989 se logró por Resolución Ministerial aprobar el listado de recursos terapéuticos vegetales para ser usado en los centros asistenciales del antes Instituto Peruano de Seguridad Social (IPSS), hoy Seguro Social de Salud (EsSalud), sin embargo, no logró el impacto necesario en los profesionales de la salud para su utilización debido, entre muchas causas, al desconocimiento de la acción terapéutica acompañada de una experiencia clínica confiable con un soporte de control toxicológico de las plantas medicinales mencionadas que generó mucha desconfianza entre los galenos (Villar & Villavicencio, 2001).

El uso de las plantas medicinales y la medicina tradicional ha sido reconocido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) que reconoce su importancia en los sistemas de salud en muchos países en vías de desarrollo, instando a los estados y miembros a hacer estudios de las plantas medicinales utilizadas por los curanderos tradicionales y la población para determinar aquellos que tengan un efecto satisfactorio, de manera de incluirlas en la Farmacopea Nacional (Organización Panamericana de Salud, 1998).

La medicina tradicional tiene importancia por sus grandes aportes a la medicina moderna, los pobladores dan solución a muchos de los problemas de subsistencia y conservación de la salud física y mental, aplicando conocimientos adquiridos de sus antepasados acerca de las plantas con actividad terapéutica. La abundancia y gran diversidad de estas plantas en forma silvestre y su fácil comercialización por los bajos costos que tienen, posibilitan su adquisición por las personas más necesitadas y para sustituir a los medicamentos de síntesis de altos costos. Actualmente es material básico para la formulación de nuevas drogas o para formular modelos de compuestos farmacológicamente activos (Cornejo, 1986).

Las plantas medicinales han sido consideradas a través de los años como el origen o punto de partida del desarrollo de los medicamentos, ya que han

contribuido grandemente al descubrimiento de nuevas sustancias con actividad biológica y a la producción de fitofármacos siendo muy peculiar su uso en forma de droga seca, extracto acuoso o decocción. Es la fuente de medicamentos más económica y de mayor disponibilidad para la mayoría de los países.

Reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que el 80 % de la población mundial conoce de las ventajas y uso de la utilización de medicamentos sobre plantas medicinales en la atención primaria de salud, pero también indican que los estudios existentes sobre dichas plantas son insuficientes para aceptar su uso de forma masiva, por lo cual ha orientado protocolos científicos para el desarrollo de fitofármacos, de manera que los ensayos fármaco dinámicos y toxicológicos siempre antecedan a la experimentación clínica (Tillan, 2002).

Una de estas plantas empleada con fines medicinales cuya siembra y cosecha están en proceso de estudio por parte de la Dirección Regional Sectorial de Agricultura Tacna en la provincia de Tarata es el “Orégano”, tradicionalmente utilizado en la medicina popular como astringente, expectorante, digestivo, antihelmíntico, antiespasmódico, antitusígeno, antiséptico y antifúngico. Propiedades farmacológicas de los diferentes extractos y aceites esenciales de Orégano fueron estudiados en detalle y trajo importantes contribuciones a la

industria (principalmente como aditivo para los alimentos) y los usos medicinales de la planta (Lorenzi & Mattos, 2002).

El término aceite esencial, o esencia, presenta muchas dificultades cuando se busca una definición que generalice este concepto. Existen definiciones desde el punto de vista químico, botánico y desde una perspectiva industrial. Todas coinciden en aspectos como su insolubilidad en agua, que pertenecen al metabolismo secundario de las plantas, que están formadas por varios compuestos químicos de estructura diferente y que en su composición poseen algún terpenoide (Van Ginkel, 2003).

La mayoría de los compuestos con actividad antimicótica encontrados en especies vegetales, son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides; los cuales en su mayoría son identificados como metabolitos secundarios, enzimas hidrolíticas (glucanasas, citinasas) y proteínas (Hernandez, 2003).

Las enfermedades micóticas son una amplia familia de patologías diferentes y complejas, que se encuentran confinadas en el epitelio o dermis, que a su vez puede invadir a cavidades nasales, bucales etc. y son el resultado de diferentes etiologías. El interés por las alteraciones dérmicas se basa no tanto en

su gravedad, sino en su enorme prevalencia entre la población. Las enfermedades epiteliales forman un grupo heterogéneo, en el que se pueden ver problemas de índole exclusivamente inflamatoria, pero también alteraciones de origen genético, traumático o asociadas a alteraciones sistémicas. La micosis epitelial es la primera forma de enfermedad dérmica y se define como una condición inflamatoria de los tejidos epiteliales.

El uso de plantas con fines terapéuticos es de gran utilidad, ya que de ellas se pueden obtener innumerables sustancias químicas con propiedades específicas que puedan ayudarnos a prevenir o tratar enfermedades, a partir de una fuente de materia prima más económica y natural y con pocos efectos adversos, que puedan ser más fácilmente aceptados por la población (Villar & Villavicencio, 2001).

La finalidad en la presente investigación es conocer y demostrar científicamente el efecto antimicótico *in vitro* del aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” frente a *Candida albicans* ATCC 6538, contribuyendo a que se tenga referencia para proyectos en el campo microbiológico y micótico para el uso adecuado de plantas medicinales.

1.1 Planteamiento del problema

En el ámbito mundial las micosis profundas y oportunistas son cada vez más continuas y en el Perú son infecciones frecuentes y que tienen alta prevalencia. La incidencia de estas infecciones muestran elevación constante; esto seguirá en aumento por el incremento de la esperanza de vida y en consecuencia, de las enfermedades geriátricas, uso de inmunosupresores cada vez más potentes, empleo de antibióticos de amplio espectro, complicaciones de las técnicas quirúrgicas modernas y presencia de síndrome de inmunodeficiencia adquirida. (Stevens & Lowe, 1996). Las micosis oportunistas son infecciones causadas por hongos saprofitos que están mediadas por factores pre-disponentes (neoplasia, infección-HIV, uso de antibióticos de amplio espectro, drogadicción, alcoholismo, diabetes, embarazo, etc.) presentes en el hospedero humano. Entre las principales infecciones se tiene: Aspergilosis, Criptococosis, Candidiasis, y Fusariosis. (Emanuel & Farber, 1990). La micosis profunda, denominada también micosis sistémica. La vía de ingreso es a través de la inhalación de esporas del hongo hacia el pulmón, a partir de la cual puede diseminarse a otros órganos llegando a producir la muerte del paciente. Entre los agentes etiológicos causantes de este tipo de infección en nuestro país tenemos: *Paracoccidioides brasillensis*, e *Histoplasma capsulatum* (Lopez, Mazabel & Del Castillo, 1997).

Con el fin de intentar disminuir esta problemática, se consideró en el presente trabajo, usar el aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” como un

tratamiento alternativo frente al agente patógeno *Candida albicans*, por su bajo costo y su eficacia demostrada en el presente trabajo.

1.2 Justificación del problema

La justificación del estudio a nivel de Salud Pública radica fundamentalmente en la prevalencia de infecciones en niños y adultos al no ser tratados adecuadamente en el primer nivel de atención, los refieren al tercer nivel de atención con cuadros clínicos dermatológicos graves, lo que genera aumento de los costos hospitalarios en Salud Pública. De tal forma que al encontrar una planta natural puede disminuir la prevalencia e incidencia de los casos como un tratamiento alternativo.

El estudio de investigación intenta encontrar propiedades antimicóticas *in vitro* de la planta natural para ser utilizada a un bajo costo en las comunidades.

No hay duda de que la ciencia y la tecnología pueden ayudar a descubrir y utilizar las propiedades terapéuticas de las plantas medicinales de forma mucho más efectiva. Por otra parte, no hay que olvidar el conocimiento empírico desarrollado por culturas distintas o anteriores a la nuestra.

Por estas razones, el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antimicótica “in vitro” del aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” frente a *Candida albicans* ATCC 6538.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Evaluar la actividad antimicótica “in vitro”, del aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” frente a *Candida albicans* ATCC 6538.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar el grado de sensibilidad que presenta *Candida albicans* ATCC 6538 frente al aceite esencial de *Origanum vulgare*, “Orégano”, mediante la Técnica de Difusión en Disco.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” que ejerce inhibición del crecimiento de *Candida albicans* ATCC 6538.
- Determinar la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” sobre el crecimiento de *Candida albicans* ATCC 6538.

1.4 Hipótesis

El aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” tiene actividad antimicótica *in vitro* frente a *Candida albicans* ATCC 6538.

1.5 Determinación de las variables

1.5.1 Tipos de variables.

1.5.1.1 Variable independiente:

- Concentración del aceite esencial de *Origanum vulgare*, “Orégano”.

1.5.1.2 Variable dependiente:

- Inhibición del crecimiento fúngico

Tabla 1. Variables e Indicadores

VARIABLES	INDICADORES	UNIDAD
Variable Independiente (V.I.)	Concentración del aceite esencial	μl
Variable Dependiente (V.D)	Crecimiento de <i>Candida albicans</i> en medio de cultivo líquido.	Turbidez
	Crecimiento de <i>Candida albicans</i> en medio de cultivo sólido.	UFC

Nota: UFC = Unidad formadora de colonias

1.6 Marco teórico

1.6.1 Plantas medicinales. Desde hace miles de años, las sociedades han empleado las plantas medicinales y aromáticas con múltiples fines (Mann, 1987), que van desde tratamientos de belleza, terapéuticos y medicinales hasta fuente de venenos y materia prima para industrias de colores, aromas y sabores. (Mann, 1992) Además, el uso (y en particular al abuso) de algunas plantas y las consideraciones éticas en momentos particulares han convertido a límite que las sociedades han establecido entre la legalidad y el delito. En la actualidad, los metabolitos secundarios son de gran importancia comercial y son usados como aromas, sabores y colores en industrias de alimento, de cosméticos y como fuentes de numerosas sustancias de interés agroquímico y medicinal (Pérez, 1996).

Las plantas medicinales han sido consideradas a través de los años como el origen o punto de partida del desarrollo de los medicamentos, ya que han contribuido enormemente al descubrimiento de nueva sustancias con actividad biológica y a la producción de fitofármacos. Es la fuente de medicamentos más económica y de mayor disponibilidad para la mayoría de los países (Tillan, 2002).

Los conocimientos populares y científicos de las plantas medicinales han contribuido en gran medida a la atención primaria de salud, fundamentalmente en los países menos desarrollados, al contribuir una fuente segura al alcance de la

mayoría de la población, siendo muy peculiar su uso en forma de droga seca, extracto acuoso o decocción (Tillan, 2002).

En las últimas décadas, el uso excesivo e inadecuado de los antimicóticos y la pérdida de su efectividad frente a múltiples organismos micóticos, ha conllevado a tener un renovado interés en el campo de las “medicinas alternativas” o “medicinas complementarias” (Lock de Ugas, 1994).

En los últimos años la búsqueda cada vez más intensa de nuevas sustancias farmacológicamente activas incita a los científicos no sólo a sintetizar miles de nuevos compuestos, sino también a estudiar con más profundidad numerosas sustancias naturales, específicamente las obtenidas de la plantas (Villar de Fresno, 1999).

El porqué de la necesidad de nuevos antimicóticos se explica en la resistencia cada vez mayor que los agentes micóticos poseen frente a quimioterápicos. Los antimicóticos sintéticos se hacen cada vez más potentes y eso a veces implica que resultan tóxicos para nuestros organismos (Villar de Fresno, 1999).

La OMS considera como planta medicinal todo vegetal que contiene, en uno o más de sus órganos, sustancias que pueden ser usadas con finalidad

terapéutica o que son precursores en la síntesis químico – farmacéutica. En las plantas medicinales aparecen productos secundarios como los terpenos, los cuales son constituyentes habituales de los aceites esenciales y de óleo resinas (Villar de Fresno, 1999).

1.6.2 *Origanum vulgare* “Orégano”.

1.6.2.1 Descripción del Orégano. Diversas especies del Orégano *Origanum* son nativas del mediterráneo y comercializadas como especias. Las especias más importantes son *Origanum vulgare* (Panaeuropa), *Origanum onites* (Grecia, Asia menor) y *Origanum heracleoticum* (Italia, Asia Occidental) (FOOD-INFO, 1999).

El nombre Orégano comprende más de dos docenas de diferentes especies de plantas, con flores y hojas que presentan un olor característico a “especioso”. Las hojas secas del *Origanum vulgare*, nativo de Europa y del *Lippia graveolens*, planta nativa de México son de uso culinario común (Arcila, Loarca, Lecona & Gonzales, 2003). El género *Origanum* pertenece a la Familia Lamiaceae. Es una planta herbácea, perenne, alcanza una altura de 30 a 80 cm; raíz de poco grosor y fríbo; tallo recto, delgado, de color verde oscuro, con numerosas ramas tetragonas; hojas pequeñas ovaladas, enteras y pecioladas de verde brillante en su cara superior y pálida en su cara inferior, se hallan cubiertas de finísimos y

sedosos pelos, las hojas más grandes se encuentran en la parte inferior de la planta. Son aromáticas y de sabor ligeramente picante. Flores de color rosa purpúreo, muy numerosas, en panículas, cada rama superior termina en pequeñas flores violáceas rizoma rastrero, negruzco, provisto de raíces fibrosas (Martínez, 2003).

En base a criterios morfológicos el género *Origanum* se ha clasificado en 3 grupos, 10 secciones, 38 especies 6 subespecies y 17 híbridos (Skuola, Gotsiou, Naxakis & Johnson, 1999). La composición y la cantidad de los metabolitos secundarios de estas plantas dependen de factores climáticos, la altitud, la época de cosecha y su estado de crecimiento. Por lo cual es estudio de dichos factores y su influencia en su cultivo es importante para su mejor aprovechamiento y explotación (Kokkini, 1997).

La data del Ministerio de Agricultura del Perú registra información hasta el año 2011, dando cuenta que la superficie cosechada de Orégano a nivel nacional fue de 2 592 hectáreas con crecimiento de 1,7 % en relación al año 2010. La región con mayor superficie cultivada es Tacna con 1 305 ha, seguida de Moquegua con 600 ha, Arequipa con 595 ha y el resto del país con 92 ha, siendo la zona sur la de mayor potencial productivo (Dirección Regional Sectorial de Agricultura de Tacna, 2013).

La información estadística ratifica en cuanto a la producción de Orégano en la región de Tacna, que la provincia Candarave, tiene la mayor producción con 2 879 t representando el 52,9 % de la producción regional y su área cultivada con Orégano es de 709 ha de las 1 528 ha es decir el 46,4 % de área cultivada en la región de Tacna, le sigue en importancia la provincia Jorge Basadre con la producción del distrito de Ilabaya con 1 352 t y una superficie oreganera de 470 ha (Dirección Regional Sectorial de Agricultura de Tacna, 2013).

1.6.2.2 Taxonomía del Orégano.

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida (Dicotiledóneas)
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Subfamilia	Nepetoideae
Tribu	Mentheae
Género	<i>Origanum</i>
Especie	: <i>vulgare</i>

Nombres comunes: Orégano, Mejorana silvestre, Fluriéngano orenga (catalán), Marjolaine sauvage (francés), Wild marjoran (inglés) Origano comune (italiano), Wilder majoran (alemán).

1.6.2.3 Composición química del Orégano. Existen estudios sobre la composición química del Orégano, usando extractos acuosos y sus aceites esenciales. En *Origanum vulgare* se han encontrado componentes activos como: rosmarínico (planta y hoja), palmítico, esteárico, oleico, ursólico, cafeico, capricho (planta). Minerales como: potasio, magnesio, manganeso, zinc, cobre, hierro (planta). Taninos (planta) y vitaminas como la niacina y β -caroteno (planta), aceite esencial ricos en timol, cimeno, carvacrol, borneol, α -bisolobeno, limoneno, α -pipeno, β -pineno, mirceno, canfeno, α -terpineno (planta). También contiene flavonoides como naringenina y picocembrina, lapachenol e ecterogenina. Los compuestos mayoritarios encontrados en *Origanum vulgare* son el carvacrol, timol, α -cimeno y α -terpineno, aunque en diversos estudios realizados por cromatografía de gases/espectrometría de masas se han identificado de 16 a 56 compuestos diferentes (Arcila *et al.*, 2003).

Se ha observado que un incremento en los porcentajes de timol provoca un decremento en el contenido de carvacrol. (Russo, Galletti, Bocchini, &

Carnacini, 1998). De igual manera, los hidrocarburos monoterpenoides α -terpineno y γ -cimeno están presentes de manera constante en los aceites esenciales, pero siempre en cantidades menores a las de los fenoles (Kokkini, 1997).

1.6.2.4 Aplicaciones del Orégano (Del Villar, 2010).

- Aparato respiratorio: como expectorante. El Orégano actúa directamente sobre el epitelio bronquial, ejerciendo un efecto irritante y aumentando la producción de secreciones bronquioalveolares. tradicionalmente se ha empleado en el tratamiento de la bronquitis, la tos no productiva y el resfriado común. también se utiliza en afecciones respiratorias que cursan con tos seca, como la laringitis (irritación de garganta) o la tos ferina.
- Antiespasmódico. El Orégano produce una relajación del músculo liso, probablemente debido a su contenido en timol y carvacrol, de acción sedante, antiespasmódica y carminativa. en un estudio con cobayas, el extracto antagonizó la respuesta contráctil inducida por la acetilcolina sobre el íleon.
- Digestivo. El Orégano aumenta la producción de jugos gastrointestinales, favorece la digestión y es un buen antiespasmódico.

por ello se usa en caso de dispepsias, flatulencia, espasmos o cólicos de los órganos digestivos.

- Relajante muscular. Dolores musculares, tortícolis y lumbago, aplicado externamente tanto en cataplasmas como en fricciones sobre la piel.
- Antioxidante. Probablemente debido a la presencia de polifenoles (encontrados 26 compuestos distintos), ácido rosmarínico y flavonoides se ha comprobado *in vitro* que el extracto de esta planta puede inhibir la oxidación de las proteínas de baja densidad (LDL) y también prevenir el daño en el DNA causado por los radicales de peróxido de hidrógeno.

De todos modos, en un estudio clínico se observó que tras la administración de zumos enriquecidos con extracto de Orégano no había cambios significativos en la peroxidación lipídica ni en el perfil lipídico sanguíneo.

- Antimicrobiano. Antibacteriano frente a *Listeria monocytogenes* y antifúngico frente a *Candida albicans*, debido a la presencia de carvacrol y timol. Se ha comprobado su efecto antibiótico sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. También tiene eficacia frente a *Trypanosoma cruzi*.
- Antiinflamatorio. El extracto alcohólico es capaz de inhibir la lipoxigenasa.

- Antidiabético. Se ha probado su efecto en la inhibición de la enzima aldosa reductasa, y también se ha comprobado que puede reducir la glucosa en sangre en ratas diabéticas tras ser administrado diariamente durante 15 días.
- Antiséptico bucal.
- Síndrome premenstrual.
- Oliguria, retención urinaria,
- Edemas.

1.6.3 Aceites esenciales.

1.6.3.1 Generalidades de los aceites esenciales. Los aceites esenciales son compuestos formados por varias sustancias orgánicas volátiles, que pueden ser alcoholes, acetonas, cetonas, éteres, aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas. Normalmente son líquidos a temperatura ambiente, y por su volatilidad, son extraíbles por destilación en corriente de vapor de agua, aunque existen otros métodos. En general son los responsables del olor de las plantas. Pueden estar en diferentes órganos: raíz, rizoma (jengibre), leño (alcanfor), hoja (eucalipto), fruto (anís) sumidades floridas (F. Labiatae).

La composición varía con el lugar de origen. También varía con el hábitat en que se desarrolle, (por lo general, climas cálidos tienen mayor contenido de aceites esenciales), el momento de la recolección, el método de extracción, etc.

1.6.3.2 Composición química de los aceites esenciales (Arraisa, 2009).

Los componentes de los aceites se clasifican en terpenoides y no terpenoides.

1.6.3.2.1 No terpenoide. En este grupo se encuentran sustancias alifáticas de cadena corta, sustancias aromáticas, sustancias con azufre y sustancias nitrogenadas. No son tan importantes como los terpenoides en cuanto a sus usos y aplicaciones.

1.6.3.2.2 Terpenoides. Son los más importantes en cuanto a propiedades y comercialmente. Los terpenos son una clase de sustancia química que se halla en los aceites esenciales, resinas y otras sustancias aromáticas de muchas plantas, como los pinos y muchos cítricos. Principalmente se encuentran en los aceites monoterpenos (C₁₀), aunque también son comunes en los sesquiterpenos (C₁₅) y los diterpenos (C₂₀). Pueden ser alifáticos, cíclicos o aromáticos.

Según los grupos funcionales que tengan pueden ser:

- **Hidrocarburos Monoterpénicos.** Son los compuestos más abundantes en los aceites esenciales, y precursores de los aceites más complejos, que son los terpenos oxidados. Se denominan terminando en – eno.

Por ejemplo el limoneno es el precursor de los principales componentes de la esencia de las mentas (*Mentha spp.*, Familia Lamiaceae), como carvona y mentol. El limoneno se encuentra también en cítricos y en el “eneldo”, *Anethum graveolens* (Familia Apiaceae).

También los compuestos α y β - pineno se encuentran muy ampliamente distribuidos en la naturaleza, especialmente en la esencia de trementina, del género *Pinus* (Familia Pinaceae).

- Alcoholes. En el linalol, los alcoholes llevan el grupo hidroxilo (-OH) unido al esqueleto C₁₀. Son muy apreciados por su aroma.

El linalol, que tiene dos formas, el R-linalol se encuentra en la “rosa” y la “lavanda” y es el componente mayoritario de la *Mentha arvensis*. La forma S-linalol en el aceite de lavanda con un contenido > 5 % indica adulteración.

El linalol le da el sabor a las hojas de “té”, el “tomillo”. Otro compuesto de este grupo, el “mentol”, es uno de los responsables del sabor y el olor de la “menta”, cuya esencia puede tener hasta un 50 % de este componente.

También el geraniol, del geranio de olor (*Pelargonium spp*), el citronelol de la “rosa” (*Rosa gallica*), el borneol del “romero”, y el santalol del “sándalo” (*Santalum album*, Familia Santalaceae).

- Aldehídos. Los aldehídos son compuestos muy reactivos. Se nombran acabados en –al. Muchos de ellos, por ejemplo los encontrados en los cítricos, se corresponden con su respectivo alcohol, por ejemplo, geraniol – geranial o citronelol – citronelal.

Son abundantes en los cítricos, responsables del olor característico, principalmente los isómeros geraniol (citral) y neral (citral) juntos conocidos como citral.

Este compuesto, además de su aroma característico, tiene propiedades antivirales, antimicrobianas y sedantes. Pero muchos de ellos, incluido el citral, son irritantes para la piel por lo que no se puede hacer uso tópico de ellos. Otro grupo importante son los aldehídos aromáticos, como el benzaldehído, componente principal del aceite de almendras amargas y responsable de su aroma característico.

- Fenoles. Los fenoles sólo se encuentran en unas pocas especies pero son muy potentes e irritantes.

Los más importantes son el timol y el carvacrol, que se encuentran en el “tomillo” (género *Thymus*) y “Orégano” (género *Origanum*), ambos de la Familia Labiatae.

Otro fenol muy importante es el eugenol, que se encuentra en muchas especies, por ejemplo en la esencia de “clavo”. Es un potente bactericida, así como anestésico, y se emplea en Odontología.

- Éteres fenólicos. Son los componentes principales de especias como el “apio” y el “perejil” (apiol), “anís” (anetol), y el “estragón” (estragol).. El safrol es un componente muy empleado en perfumería que se encuentra en la corteza del árbol del “sasafrás” (*Sassafras albidum*, Familia Lauraceae)
- Cetonas. Se producen por la oxidación de alcoholes y son moléculas bastante estables. Terminan en –ona. La carvona está presente en la *Mentha spicata*.

La tuyona (aislada por primera vez en la “tuya”, *Thuja occidentalis*, Familia Cupressaceae) y “pulegona” son bastante tóxicas y nunca deben usarse en el embarazo.

La tuyona se encuentra en plantas como el género *Artemisia* (*Artemisia absinthium*, con la cual se hace el vermouth y la absenta), y en la “salvia” (*S. officinalis*). La pulegona se aisló por primera vez en el poleo (*Mentha pulegium*).

- Éteres. Los éteres u óxidos monoterpénicos son reactivos e inestables. Un ejemplo es el óxido de bisabolol presente en la “manzanilla” (*Matricaria chamomilla*).
Otro muy común es el 1,8 – cineol (también llamado eucaliptol), que es el componente principal del aceite de “eucalipto”. Es expectorante y mucolítico y el componente principal de medicamentos para la tos.



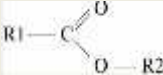
El aceite de “eucalipto” varía en aroma, según el contenido en 1,8 – cineol. El aceite rico en este componente (*Eucalyptus globulus*, Familia Myrtaceae) se emplea más para uso medicinal, mientras que el de contenido más bajo (por ejemplo *E. radiata*) se emplea para aromaterapia.

- Ésteres. La mayoría de los ésteres se forman por reacción de un alcohol terpénico con ácido acético. Su aroma caracteriza a los aceites en los que se encuentran.

Por ejemplo, el aceite de lavanda contiene linalol y su éster, acetato de linalilo. La abundancia relativa de estos dos compuestos es un indicador de buena calidad.

El salicilato de metilo, derivado del ácido salicílico y metanol, es un compuesto antiinflamatorio parecido a la aspirina que se encuentra en un tipo de “brezo” (*Gaultheria procumbens*, Familia Ericaceae),

Tabla 2 .Grupos funcionales de cada categoría de aceites esenciales.

COMPUESTO	GRUPO FUNCIONAL	EJEMPLO	PROPIEDADES
Alcohol		Mentol, geraniol	Antimicrobiano, antiséptico, tonificante, espasmolítico.
Aldehído		Citral, citronelal	Espasmolítico, sedante, antiviral.
Cetona		Alcanfor, tuyona	Mucolítico, regenerador celular, neurotóxico.
Éster		Metil salicilato	Espasmolítico, sedativo, antifúngico.
Éteres	-C - O - C -	Cineol, ascaridol	Expectorante, estimulante.
Éter fenólico	Anillo - O - C	Safrol, anetol, miristicina	Diurético, carminativo, estomacal, expectorante
Fenol		Timol, eugenol, carvacrol	Antimicrobiano, irritante, estimulante inmunológico
Hidrocarburo	Sólo contiene C y H	Pineno, limoneno	Estimulante, descongestionante, antivírico, antitumoral

Fuente: Grupos funcionales según Arraisa (2009).

1.6.3.3 Extracción del aceite esencial por destilación por arrastres con vapor. El fundamento detrás de esta técnica de extracción está dado por el rompimiento del tejido vegetal por efecto de la temperatura del vapor (100 °C) liberando así el aceite esencial (Sánchez, 2006). Después de un cierto tiempo los vapores que salen de la cámara extractora se enfrían en un condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceite finalmente se separan en un dispositivo decantador o vaso florentino (Bandoni, 2000).

Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias muy volátiles, por ejemplo las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, a la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada (Bandoni, 2000).

1.6.3.4 Aplicaciones de los aceites esenciales (Arraisa, 2009)

- Industria alimentaria. Se emplean para condimentar carnes preparadas, embutidos, sopas, helados, queso, etc. Los aceites más empleados por esta industria son el cilantro, naranja y menta, entre otros. También son utilizados en la preparación de bebidas alcohólicas y no alcohólicas, especialmente refrescos. Con respecto a esta utilidad se puede citar las esencias extraídas del naranjo, limón, mentas e hinojo, entre

otros. Estas esencias también se emplean en la producción de caramelos, chocolates y otras golosinas.

- Industria farmacéutica. Se usan en cremas dentales (aceite de menta e hinojo), analgésicos e inhalantes para descongestionar las vías respiratorias (eucalipto). El eucaliptol es muy empleado en odontología. Son utilizados en la fabricación de neutralizantes de sabor desagradable de muchos medicamentos (naranjas y menta, entre otros).
- Industria de cosméticos. Esta industria emplea los aceites esenciales en la producción de cosméticos, jabones, colonias, perfumes y maquillaje. En este campo se pueden citar los aceites de geranio, lavanda, rosas y pachouli.
- Industria de productos de uso veterinario. Esta industria emplea el aceite esencial de *Chenopodium ambrosoides* muy apreciado por su contenido de ascaridol, vermífugo. También requiere limoneno y mentol como insecticidas.
- Desodorantes industriales. Actualmente se ha desarrollado el uso de esencias para disimular el olor desagradable de algunos productos industriales como el caucho, los plásticos y las pinturas. La industria de las pinturas emplea limoneno como disolvente biodegradable. También se imparte olor a juguetes. En textiles, como enmascaradores de olores en tratamientos con mordientes antes y después del teñido.

En papelería, para impregnar de fragancias cuadernos, tarjetas, papel higiénico, toallas faciales.

- Industria tabacalera. Demanda mentol para los cigarrillos mentolados.
- Biocidas e insecticidas- Existen esencias con propiedades bactericidas, como el tomillo, clavo, salvia, mentas, orégano, pino, etc. Otras son insecticidas:

Contra hormigas: *Mentha spicata* (spearmint), *Tanacetum* y poleo.

Contra áfidos: ajo, otros *Allium*, coriandro, anís, albahaca.

Contra pulgas: lavanda, mentas, lemongrass, etc.

Contra moscas: ruda, citronela, menta, etc.

Contra piojos: *Mentha spicata*, albahaca, ruda, etc.

Contra polilla: mentas, hisopo, romero, eneldo, etc.

Contra coleópteros: tanaceto, comino, ajenjo y tomillo, etc.

Contra cucarachas: menta, ajenjo, eucalipto, laurel, etc.

Contra nemátodos: tagetes, salvia, caléndula, *Asparagus*, etc.

1.6.4 *Candida albicans*.

1.6.4.1 Historia . Uno de los aspectos más importantes a considerar es el relativo a los distintos nombres que ha recibido la principal especie patógena: *Candida albicans*. Desde que Robin la denominó en 1853 *Oidium albicans*, esta

especie estuvo incluida en 100 sinónimos y pasada a través de 18 géneros. De estos géneros, sólo 2 han prevalecido por largo tiempo para referirse a esta especie: El género *Monilia*, en el cual estaba incluida *Monilia candida*, luego *Monilia albicans* que dominó la literatura hasta el trabajo de C.M. Berkhout, quien en 1923 propone el género *Candida* y la especie *Candida albicans*, que fue aceptado por el 3er Congreso Internacional de Microbiología en Nueva York en 1939. Desde entonces se pasaron al género *Candida* todas aquellas levaduras que no encajaban en el género *Monilia*, por lo cual todas las afecciones producidas por *Candida* se conocen con el nombre de Candidiasis (Samson, 1990).

1.6.4.2 Descripción general. *Candida albicans* es un hongo diploide (un tipo de levadura) y un agente causal de infecciones oportunistas orales y genitales en el hombre. Las infecciones sistémicas por hongos (fungemias) han surgido como causas importantes de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos (por ejemplo, el SIDA, quimioterapia contra el cáncer, el órgano o el trasplante de médula ósea). Además, las infecciones relacionadas con el hospital en los pacientes que antes no consideradas en riesgo (por ejemplo, los pacientes en una unidad de cuidados intensivos) se han convertido en un motivo de preocupación para la salud (Koneman, 1987).

Candida albicans es comensal y se encuentra entre la flora intestinal, los muchos organismos que viven en la boca y el tracto gastrointestinal humano. En circunstancias normales, *Candida albicans* vive en el 80 % de la población humana, sin efectos nocivos, aunque los resultados en el crecimiento excesivo de la candidiasis. La candidiasis es a menudo observada en individuos inmunodeprimidos como los pacientes VIH-positivos. La candidiasis puede también ocurrir en la sangre y en el tracto genital. La candidiasis es una condición común, por lo general, se curan con facilidad en personas que no están inmunocomprometidos. Para infectar los tejidos del huésped, la forma habitual unicelulares como las levaduras de *Candida albicans* reacciona a las señales ambientales y los interruptores en una forma invasiva, filamentosas multicelulares (Samson, 1990).

1.6.4.3 Características. Suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas de longitud variable, con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro y pseudohifas, que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí (Samson, 1990).

Las levaduras o blastosporas son microorganismos eucarióticos, las cuales se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular

conocido como gemación. Este proceso de división implica la producción de nuevo material celular proveniente de la superficie de la blastospora. Cuando el brote o yema ha crecido y se encuentra en su tamaño óptimo, se suscita la división celular y se forma un tabique o septo entre las dos células (Koneman, 1987).

La forma filamentosa del hongo (hifa) es una estructura microscópica tubular, la cual contiene múltiples unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de blastosporas o de hifas existentes. Esta crece continuamente por extensión apical (Odds, 1994).

La apariencia microscópica de todas las especies de *Candida* es similar; todas las levaduras son gram positivas, pero en algunas ocasiones la forma de las blastosporas puede variar de ovoide a elongada o esférica. *Candida albicans* presenta dimorfismo, el cual es una transformación de la forma ovoide de las blastosporas (levaduras) gemantes a hifas (Odds, 1994).

1.6.4.4 Genoma. Una de las características más interesantes de la *Candida albicans* es la ocurrencia de reordenaciones cromosómicas numéricas y estructurales como medio de generar diversidad genética, con polimorfismo cromosómico longitud (contracción expansión de repeticiones), translocaciones recíprocas, borrados cromosómicos y la trisomía de los cromosomas individuales.

Estas alteraciones del cariotipo conducir a cambios en el fenotipo, que es una estrategia de adaptación de este hongo. Estos mecanismos se entenderan mejor con el análisis completo del genoma de *Candida albicans* (Mims, Playfair, Roitt, Wakelin & William, 1995).

El genoma de *Candida albicans* SC5314 cepa fue secuenciado en la secuenciación de ADN de Stanford y el Centro de Tecnología. El genoma de la cepa WO1 fue secuenciado por el Instituto Broad del MIT y de Harvard. La secuenciación del genoma de *Candida albicans* se puso en marcha en octubre de 1996. emisiones sucesivas de los datos de secuenciación del genoma y las ensamblajes se han producido en los últimos 10 años, que culminó con la liberación de la asamblea diploides 19, que proporcionan una versión del genoma haploide junto con los datos sobre las regiones alélica en el genoma. Es importante destacar que la disponibilidad de la secuencia de datos antes de la finalización de la secuencia del genoma ha permitido comenzar a *Candida albicans* post-genómica desde el principio. En este sentido, las bases de datos del genoma completo han sido puestos a disposición de la comunidad de investigación proporciona distintas formas de anotación del genoma. Estos se han fusionado en una anotación basada en la comunidad organizado por la base de datos del genoma de *Candida*. La disponibilidad de la secuencia del genoma ha allanado el camino para la aplicación de los enfoques post-genómica al estudio de *Candida albicans*:

macrochips y microarrays se han desarrollado y utilizado para estudiar el transcriptoma *Candida albicans*; proteómica ha sido desarrollado y complementa los análisis de la transcripción y, además, se están convirtiendo en métodos sistemáticos para estudiar la contribución de cada gen *Candida albicans* en diferentes contextos. Otras secuencias del genoma de *Candida* han sido o están siendo determinados: *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, y *Candida tropicalis*. Estas especies de poco entraran en la era post-genómica y así podrá ofrecer interesantes datos comparativos. Las secuencias de genoma obtenidas para las diferentes especies de *Candida* junto con los de hemiascomycetes no patógenos proporcionaran una gran cantidad de conocimientos sobre los procesos evolutivos que conformaron el grupo hemiascomycete, así como aquellos que pueden haber contribuido al éxito de las diferentes especies de *Candida* como patógenos (Samson, 1990).

El genoma de *Candida albicans* es muy dinámica, y esta variabilidad se ha utilizado ventajosamente para estudios epidemiológicos moleculares de *Candida albicans* y estudios de población de esta especie. Un notable descubrimiento surgió de la secuencia del genoma para identificar la presencia de un ciclo parasexual (sin división meiótica) en *Candida albicans*. Este ciclo parasexual está bajo el control de los loci de compatibilidad y el cambio entre fenotipos blanco y opaco. Investigar el papel que el proceso de apareamiento juega en la dinámica de

la población de *Candida albicans* o en otros aspectos de la biología y la patogenicidad de *Candida albicans*, sin duda, representan un importante foco para la investigación futura (Samson, 1990).

1.6.4.5 Clasificación científica. ((Mims et al, 1995)

Reino	Fungi
Filo	Deuteromiceta
SubFilo	Saccharomycotina
Clase	Saccharomycetes
Orden	Saccharomycetales
Familia	Saccharomycetaceae
Género	Candida
Especie	albicans
Nombre binomial	<i>Candida albicans</i>
Sinonimia	<i>Candida stellatoidea</i>

1.6.4.6 Composición química. La composición química de *Candida albicans* está representada por 20-40 % de proteínas y 30-50 % de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable (Ghannoum, Burns & Abu Elteen, 1989). La fracción lipídica va a depender de la cepa, edad del cultivo,

condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono (Pierce, Pierce, Unrau & Oehlschlager, 1978).

La pared celular de *Candida albicans* está compuesta principalmente por los polisacáridos Manán, Glucán y Quitina. Aunque la síntesis de los componentes de la pared celular está dinámicamente influenciada por las condiciones de crecimiento y por los estadios metabólicos. El polisacárido manán representa aproximadamente entre 15,2 % y 22,9 % del peso seco y poco más de 40 % de los polisacáridos de la pared celular del hongo. El D-Glucán β -1-3 y el D-Glucán β -1-6 constituyen entre 47 % y 60 % del peso seco de la pared celular. (Calderone & Braun, 1991). Otros componentes han sido reportados, tales como proteínas en cantidades que oscilan entre 6 % y 25 %, lípidos entre 1 % y 7 % y quitina entre 0,6 % y 9 % del peso de la pared celular (Calderone & Braun, 1991).

El número de capas y su morfología varían; esta variación está relacionada con varios factores tales como: la etapa de crecimiento celular, la forma de crecimiento (como levadura o como tubo germinal), la capa seleccionada para su estudio, el medio de cultivo empleado para el crecimiento celular y los procedimientos de fijación. La mayoría de los investigadores han descrito cinco capas dentro de la pared celular, las cuales son (de adentro hacia afuera): Manoproteínas, β -Glucán-Quitina, β -Glucán, Manoproteínas y una capa de fibrillas (Calderone & Braun, 1991).

1.6.4.7 Factores de virulencia (Casas Rincon, 1989). *Candida albicans* presenta una serie de factores de virulencia que facilitan la colonización y la infección del hospedador. Entre ellos cabe mencionar el dimorfismo o capacidad del hongo para desarrollar un crecimiento levaduriforme y filamentoso, el cual favorece la evasión de los mecanismos defensivos del hospedador. También existen otros tipos de factores de virulencia, tales como:

- Adhesinas: que permiten la unión de la célula fúngica a los receptores del hospedador o a materiales plásticos utilizados en medicina, como las prótesis y los catéteres.
- Proteinasas y fosfolipasas: Las cuales corresponden a enzimas que favorecen la diseminación por los tejidos del hospedador.
- Tigmotropismo: que permite encontrar discontinuidades entre las células y penetrar en los tejidos.
- Producción de toxinas y sustancias inmunosupresoras. Cabe señalar que la pared celular de *Candida albicans* es esencial para su patogenicidad desde el momento en que ésta es requerida para su crecimiento. Además, la pared celular le proporciona rigidez y protección a esta especie y es el lugar de contacto entre la superficie del microorganismo y el medio ambiente. Diversos ligandos y receptores de la superficie celular de *Candida albicans* promueven la colonización a los tejidos y a las células hospederas. Una enzima

proteolítica, la Proteinasa Ácido-Carboxílica asociada con la superficie celular y con el medio ambiente externo, es probablemente la responsable de la invasión de *Candida albicans* a los tejidos, la cual ocurre cuando el microorganismo sufre una transformación morfológica de levadura a forma filamentosa (Calderone, 1991).

Está claramente establecido que esta conversión morfológica tiene gran importancia en el establecimiento del proceso infeccioso por parte de este hongo (Odds, 1994; Sobel, Muller, Myers, Kaye & Levison, 1981). En estudios donde compararon la capacidad de adherencia de varias especies de *Candida* a células epiteliales bucales y vaginales, comprobaron que *Candida albicans* se adhiere en mayor grado a la superficie de estas células que las otras especies. Este estudio reveló además que las otras especies de *Candida* difieren marcadamente en su habilidad por adherirse a las células epiteliales de la mucosa bucal y vaginal. *C. tropicalis* se adhiere moderadamente, mientras que *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. kruzei* y *C. pseudotropicalis* (kefyr) mostraron poca capacidad para adherirse a dichas células (King, Lee & Morris, 1980).

1.6.4.8 Epidemiología. La frecuencia de infecciones invasoras causadas por *Candida* ha aumentado en forma importante en las últimas décadas,

constituyendo actualmente la candidemia un importante agente de infección intrahospitalaria. Se ha descrito en E.U.A. un aumento de 4 veces las tasas de fungemia nosocomial entre 1980 y 1990, representando alrededor del 10% de todas las infecciones del torrente sanguíneo durante 1990 (Stamos & Rowley, 1995; Mac Donald, Baker, & Chenoweth, 1998).

Esto se debe en gran parte a avances de la medicina, con la incorporación de nuevas modalidades terapéuticas. Algunas de ellas, como tratamientos antimicrobianos de amplio espectro, uso de nutrición parenteral, uso de catéteres intravenosos e intubación endotraqueal entre otros, son considerados factores de riesgo para esta infección. Con mayor frecuencia ocurren en pacientes que tienen condiciones de base tales como ser neonatos, prematurez, patología oncológica en quimioterapia, terapia inmunosupresora, ser sometidos a gran cirugía y estar afectados por enfermedades severas que requieren atención en una unidad de cuidados intensivos (UCI) (Mac Donald et al., 1998).

La candidemia, definida como la infección del torrente sanguíneo, puede derivar en la diseminación de la infección a múltiples órganos determinando la formación de microabscesos, lesiones cutáneas embólicas, abscesos renales y hepatoesplénicos, endocarditis, meningitis, artritis, osteomielitis y endoftalmitis (Stamos & Rowley, 1995).

1.6.5 Candidiasis

1.6.5.1 Generalidades. En los pacientes con trastornos del sistema inmunitario y en los enfermos internados con patologías graves, las infecciones por hongos son una causa importante de morbilidad y de mortalidad.

Las distintas especies de *Candida*, ampliamente distribuidas, son los hongos más comunes causantes de micosis; integran la flora microbiológica normal, pero sólo 10 especies son causa de enfermedad en los seres humanos. La patología asociada con estos hongos incluye un amplio espectro, desde trastornos leves de la piel y mucosas hasta 46 infecciones potencialmente fatales, candidemia, peritonitis, endocarditis infecciosa, infecciones de catéteres intravasculares y meningitis.

Aunque algunas de las entidades son difíciles de categorizar, se considera que la candidiasis invasiva incluye a la candidemia y a la candidiasis sistémica (Sociedad Iberoamericana de Información Científica, 2002).

La candidiasis es una infección por hongos que también se conoce por los nombres de moniliasis, “infección por levaduras”, “infección por hongos”; son causadas por un hongo del género *Candida*, el más frecuente de todos es la

Candida albicans, que causa alrededor del 90 % de las infecciones por hongos (Koneman, 1987)

Otros miembros de la familia, que pueden ocasionar la infección, son la *Candida tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis*.

Los principales factores de patogenicidad que contribuyen al aumento en su capacidad de infectar son la germinación rápida en los tejidos después de diseminarse por el torrente circulatorio; la producción de proteasas, las adhesinas para las proteínas de la matriz extracelular, los receptores de unión al complemento y los cambios fenotípicos.

Las principales manifestaciones clínicas de *Candida albicans* son de tres tipos: mucocutánea, cutánea y sistémica (Koneman, 1987) .

1.6.5.2 Tipos de candidiasis.

1.6.5.2.1 Candidiasis mucocutánea: La candidiasis de las mucosas afecta sobre todo la cavidad bucal y el conducto vaginal. La candidiasis bucal, una enfermedad conocida como muguet, es la manifestación clínica más frecuente de candidiasis en los seres humanos. La infección se manifiesta como placas blancas en la mucosa bucal y la lengua, que, en las infecciones más graves, pueden unirse en una membrana. Éstas se adhieren firmemente al epitelio y cuando se las retira

revela una base enrojecida y edematosa. El diagnóstico puede hacerse mediante la observación de las pseudohifas y los blastoconidios característicos en la microscopia de las preparaciones teñidas con Gram de frotis del exudado, entre las causas predisponentes figuran la alteración de la flora normal después de la antibiótico terapia prolongada, el pH bajo de las secreciones salivales en los recién nacidos, la hipertrofia de las papilas de la lengua (lengua negra vellosa) y la glositis crónica.

La candidiasis bucal se reconoce ahora como una enfermedad que define el SIDA y se observa casi en el 100 % de estos pacientes. Aunque clásicamente está causada por *Candida albicans*, la especie estrechamente relacionada, *Candida dubliniensis*, ha surgido hace poco como el agente más problemático en muchos casos, lo que expresa la resistencia inducida a ciertos agentes antimicóticos derivados de los azoles, en especial el fluconazol. Por consiguiente, puede estar indicada la identificación por el laboratorio de *C. dubliniensis* para los casos de muguet bucal antes de administrar el tratamiento empírico con un antimicótico azólico (Koneman, 1987).

Las mucosas de la tráquea, los bronquios y casi cualquier parte del tubo digestivo, pueden sufrir infecciones por *Candida*. Un ambiente con pH bajo puede explicar esta predisposición, en especial en los pacientes con procesos malignos

de la sangre. La disfagia, el dolor retroesternal, la hemorragia gastrointestinal alta y las náuseas son síntomas asociados. Las candidiasis esofágicas también puede suceder como una propagación orofaríngea, sobre todo en los recién nacidos (Koneman, 1987).

1.6.5.2.2 Candidiasis cutánea: Las infecciones de la piel suelen afectar las partes húmedas e intertriginosas, como las zonas interdigitales de las manos y los pies, debajo de las mamas, las axilas y los pliegues de la ingle. La infección de las uñas se conoce como onicomicosis, o paroniquia si están afectados los pliegues de la piel que encierran las uñas. La dermatitis de pañal en los recién nacidos también es una manifestación frecuente. La candidiasis mucocutánea crónica es una infección oportunista de la piel y las mucosas, asociada con varios trastornos genéticos que afectan la función de los leucocitos o del sistema endocrino (Koneman, 1987).

1.6.5.2.3 Candidiasis diseminada: La candidiasis sistémica es una enfermedad relativamente rara, que suele suceder como un episodio terminal de los pacientes con neoplasias debilitantes (crisis blásticas de leucemias y linfomas por ejemplo), enfermedades inmunosupresoras y luego del trasplante de órganos, en especial durante el síndrome de rechazo agudo.

1.7 Antecedentes bibliográficos

La actividad esencial de los aceites naturales de las plantas conllevan a la valoración de este no desde hace unos años, por el contrario, los procesos de utilización se dan hace cientos de años sin comprender o explicar sus resultados en ese entonces, así los egipcios, en 4 500 AC., usaban aceites de mirra y de cedro para embalsamar difuntos y, 6 500 años más tarde, momias perfectamente conservados con más elasticidad a la certificación de los valores de esta técnica. La investigación moderna divulgó que la madera del cedro contiene un fijativo natural y que el mirra contiene agentes antisépticos y bactericidas de gran alcance, que explica por qué muchas momias se presentan con una conservación tan buena (Martinez, 2003).

Los egipcios habían sido primeros en destilar las plantas, con el objetivo de extraer los aceites esenciales respectivos. Utilizaron estos en la medicina y ceremonias religiosas, o aún como embelesadores de la piel, perfumes y pociones para la cara. Los aceites eran tenidos con un valor incalculable, por eso fueron ofrecidos a los dioses (Palacios, 1993).

Los romanos, por otra parte, usaban aceites esenciales para eliminar dolores, los utilizaron a diario en los baños y masajes (Martínez, 2003).

La pasión del emperador Neron por el aceite de la rosa se debió porque curó jaquecas, indigestiones y levantó así el espíritu. Otro aceite favorito de los romanos era el camomila, tratando así la piel y ayudando a sanar heridas.

En Grecia, India, China y Arabia el uso aromático de la sustancia floreció. Pero del siglo XI la perfumería y el herbalismo se había ampliado solamente en Europa (Martínez, 2003).

Desde ahí la consulta de los procesos empezaron; la obtención y la comprobación de ellos.

La susceptibilidad por los aceites, extractos alcohólicos, extractos acuosos liofilizados, etc, se desarrollaron en magnitudes en todos los ámbitos (bacterianos, micóticos, parasitológicos) de ahí en Cuba García, Garcia, Menéndez y Buznego (1996) comprobaron en su trabajo : “Efecto antioxidante de los extractos fluido y de flavonoides del *Plectranthus amboinicus* (Orégano francés)” que la alta concentración de flavonoides tuvo un efecto inhibitor sobre la formación de productos reactivos al ácido tiobarbitúrico, empezando así la carrera contra los diversos fármacos; también en Cuba Martínez, Betancourt y Alonso (1996) comprobaron que no todos los aceites esenciales producían una actividad antibacteriana, tal trabajo “Ausencia de actividad antimicrobiana de un extracto

acuoso liofilizado de *Aloe vera* (sábila) determinó que solo *Staphylococcus aureus* presentaba una ligera respuesta a este, con esto se puede mencionar que la actividad de algunas plantas no siempre son lo que uno espera.

También el extracto de *Schinus terebinthifolius raddi* (copal) que se utilizó en el trabajo: “Actividad antimicrobiana de un extracto de fluido al 80 % de *Schinus terebinthifolius raddi* (copal)” (Martinez, Lopez & Morejón, 2000) se comprobó su eficiencia a diferentes concentraciones frente a bacterias Gram positivas y negativas como también a *Candida albicans*; Los extractos hidroalcohólicos en el trabajo de “Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos de *Rubus urticaefolius* (mora) de De Paula y Martins (2000) también presentaron un grado de inhibición contra algunos bacilos, en los trabajos “Actividad antimicrobiana de *Illicium verum* Hook. f.” y “Actividad antimicrobiana de *Cuminum cyminum* L”, Mukhopadhyay y Banerjee (2001) y Miro (2003) demostraron que el anís y el comino no solo servían como aditivos en aderezos sino que combatían cierta cantidad de infecciones gastrointestinales como también combatía a levaduras y hongos.

No obstante en el Perú también se hicieron trabajos sobre actividad de ciertas plantas como agentes micóticos, antibacterianos, parasitológicos, etc.; Carhuapoma (2006) en su trabajo “Estudio de la Composición química y actividad

antioxidante del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray arrayán ” expresa que no solo los aceites se pueden emplear en situaciones micóticas ni bactericidas sino también como una fuente de antioxidantes regenerando tejidos nuevos que combatirán infecciones con mejoras en su actividad inmunológica; Araujo y Salas (2008) en su trabajo “Actividad antimicrobiana de plantas” describen algunos elementos de dichas plantas que pueden ser clave para investigación y así buscar nuevas formas de resultados óptimos a los pacientes ; también se pudo comprobar en el trabajo de Chavez, Diaz, Escalante y Estrada (2008) “Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*” que el Orégano tiene una actividad sinérgica a la gentamicina comprobando los halos de inhibición que produce dicho aceite.

CAPITULO II

2. Material y Métodos

2.1 Lugar de estudios

El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, entre los meses de setiembre a diciembre del 2014.

2.2 Tipo de estudios

Esta investigación es un estudio cuasiexperimental prospectivo de corte transversal.

2.3 Diseño experimental

Para la ejecución del experimento se utilizó el diseño experimental de bloques (concentraciones) con 5 tratamientos (halos) y 5 repeticiones.

2.4 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó la técnica de análisis de varianza, usando la prueba F a un nivel de significación de 0,05 y para establecer las diferencias medias entre las concentraciones se utilizaron la prueba de significación de Tukey al 0,05.

2.5 Unidades de estudio

Biológico. Extracto de aceite esencial de *Origanum vulgare*.

Microbiano. *Candida albicans* ATCC 6538

2.6 Material de laboratorio

2.6.1 Equipos

- Autoclaves
- Balanza analítica
- Estufa de incubación a 37 °C.
- Mechero Bunsen
- Refrigeradora
- Microscopio
- Micro pipetas

2.6.2 Materiales de vidrio

- Balones de vidrio de 100, 250, 500 ml
- Embudos de vidrio
- Fiolas de 100 ml
- Matraces de 500 ml
- Pipetas de 1, 5 y 10 ml
- Placas Petri de 100 x 15 mm

- Probetas de 25 y 50 ml
- Tubos de ensayo 13 X 100 mm
- Bagueta
- Vasos de precipitación de 250 y 500 ml
- Pera de decantación.

2.6.3 Medios de cultivo

- Agar Papa dextrosa
- Agar Mueller Hinton
- Medio infusión cerebro corazón (BHI)
- Caldo Mueller Hinton

2.6.4 Reactivos.

- Alcohol etílico de 70°
- Alcohol yodado
- Agua destilada
- Dimetilsulfóxido 10 % (DMSO)
- Ron de quemar

2.6.5 Otros.

- Asa de Kholle

- Asa de Drigalski
- Gradillas
- Espátulas
- Tripode y malla de asbesto
- Pinzas
- Papel kraft
- Papel de filtro
- Mascarilla
- Guantes quirúrgicos
- Algodón pabilo
- Papel aluminio
- Marcadores
- Calculadora
- Vernier

2.7 Metodología

2.7.1 Origanum vulgare “Orégano”

2.7.1.1 Obtención de la muestra. *Origanum vulgare* “Orégano” se obtuvo en una comercializadora de especies y condimentos ubicado en un mercado de la localidad (Mercado Grau) este fue puesto en bolsa de papel para su mejor traslado; se procedió a seleccionarlo prevaleciendo las hojas enteras.

2.7.1.2 Obtención del aceite esencial (Peredo, Palou & López, 2009). Para poder extraer el aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” se colocó 200 gramos de muestra en un balón, de capacidad volumétrica de un 1 litro (balón de extracción). Mientras se agregaba agua (volumen aproximado de 650 mL) en otro balón de extracción, de la misma capacidad del anterior, El cual fue sometido a calor directo (cocina eléctrica). El producto destilado se recibió en una pipeta Pasteur estéril cortada a la mitad, después de haber hecho una modificación a la técnica tradicional de recolección de aceites esenciales ya que esta modificación nos resultó más eficiente porque no hay pérdida de aceite en las paredes del recipiente y se recolecta un mayor porcentaje de aceite que en la técnica tradicional donde se pierde aceite en las paredes del recipiente donde se recolecta el destilado. El aceite esencial fue almacenado en un frasco ámbar a temperatura ambiente y en oscuridad hasta su utilización.

2.7.1.3 Evaluación de la actividad del aceite esencial de *Origanum vulgare* frente a *Candida albicans* ATCC 6538. La actividad antimicótica del aceite esencial se evaluó por el método de difusión en disco (Kirby Bauer).

2.7.1.3.1 Determinación de la concentración del aceite esencial de *Origanum vulgare*.

Probeta de 10 ml vacía	=	22,5267 g
Probeta de 10 ml con aceite	=	24,3651 g
Masa	=	$24,3651 - 22,5267 = 1,8384$
Volumen	=	2,1 ml

d = densidad

m = masa

v = volumen

$$d = \frac{m}{v}$$

$$d = \frac{1,8384 \text{ g}}{2,1 \text{ ml}}$$

$$d = 0,8754 \text{ g/ml}$$

$$1 \text{ g} \longrightarrow 1000 \text{ mg}$$

$$0,8754 \text{ g} \longrightarrow X$$

$$X = \frac{0,8754 \times 1000}{1} = 875,4 \text{ mg}$$

$$d = 875,4 \text{ mg/ml}$$

2.7.1.3.2 *Preparación del inóculo: Estandarización de la población micótica de estudio para la prueba de susceptibilidad en placa.* La estandarización de la población micótica en estudio se realizó a partir de cinco colonias de *Candida albicans*, provenientes del cultivo puro de Agar Mueller Hinton, las cuales se transfirieron con un asa de kolle a un tubo que contenía 5 mL de caldo Mueller Hinton.

Se homogenizaron los cultivos y se incubó a 37 °C por un tiempo de 24 horas. Seguidamente el cultivo se estandarizó por comparación de turbidez del tubo 0,5 de la escala de Mc Farland cuya población bacteriana es $1,5 \times 10^8$ UFC/ml



Figura 1. Plantilla de Lectura de Nefelómetro de Mac Farland (National Committee for Clinical Laboratory Standards).

2.7.1.3.3 *Preparación de los discos de sensibilidad con las diferentes concentraciones del aceite volátil de Origanum vulgare.* Para esta prueba con una micropipeta se tomaron 0,6 µl, 0,8 µl, 1,0 µl, 1,2 µl, 1,4 µl, 1,6 µl, 1,8 µl, 2,0 µl de aceite de *Origanum vulgare*.

Dichos volúmenes se vertieron en discos de papel de sensibilidad utilizados en las prácticas de antibiograma, con una medida de 6 mm de diámetro desproteinizados los antibióticos por un proceso de esterilización, teniendo así un total de 64 discos que corresponden a 4 repeticiones, y su respectivo control.

2.7.1.3.4 *Prueba de susceptibilidad: Método difusión en disco (Kirby-Bauer).* De la preparación del inóculo que se comparó con el tubo N° 0,5 de la escala de Mac Farland se sembró por el método de disseminación en un volumen de 100 µl del inóculo micótico.

Este proceso se repitió en todas las placas a sembrar y se dejó secar por 5 minutos.

Usando una pinza estéril se sacaron los discos y se colocaron en la superficie de las placas de Müeller Hinton con *Candida albicans*, haciendo una ligera presión para permitir un contacto homogéneo.

Estas placas fueron llevadas a incubar a 37 °C por 24 horas después de la cual se realizó la lectura de presencia de halos de inhibición y la medición del diámetro (en milímetros) de los mismos. Dándose como resultados positivos los halos mayores de 14 mm de diámetro.

Mediante la prueba de susceptibilidad, se determinó la sensibilidad de *Candida albicans* al aceite esencial de *Origanum vulgare*, realizándose cuatro repeticiones por cada tratamiento.

Tabla 3 .Concentración del aceite esencial en disco de sensibilidad.

Nº de Disco	Volumen del Aceite en μ l	Concentración
1	0,6	0,52524
2	0,8	0,70032
3	1	0,8754
4	1,2	1,05048
5	1,4	1,22556
6	1,6	1,40064
7	1,8	1,57572
8	2	1,7508

Fuente: Elaboracion propia

Testigo:

Para realizar el método se colocó un disco control que no contenía aceite esencial en una placa sembrada con la levadura.

2.7.1.3.5 Valores de sensibilidad según Duraffourd. La actividad se consideró en función al diámetro del HICM (Halos de inhibición del crecimiento del microorganismo): nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm; sensibilidad límite (sensible = +) de 9 a 14 mm; media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm y sumamente sensible (S.S. = +++) si fue igual o superior a 20 mm.

2.7.1.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria.(CMI):

Método de macrodilución en medio líquido.

2.7.1.4.1 Preparación de la solución madre. Se preparó una solución madre de 10000 µl; de aceite esencial 600 µl de DMSO y 600 µl y de caldo Mueller Hinton 9400 µl. Llevado una concentración de tal de 1269,49mg/µl lo cual se realizó de la siguiente manera, sabiendo que en 1000 µl el aceite esencial tiene una concentración de 525,24 mg/µl.

Para la solución madre:

525,24 mg	—————→	10000 µl
X	—————→	1000 µl

$$X = 52,524 \frac{\text{mg}}{\mu\text{l}}$$

2.7.1.4.2 *Preparación del inóculo: estandarización de la población micótica de Candida albicans.* La estandarización de la población micótica en estudio parte de cinco colonias de la levadura (*Candida albicans*) bien aislada de un cultivo puro de Müeller Hinton. Con un asa de kolle se transfieren las colonias a un tubo que contenga 5 ml de caldo Müeller Hinton, homogenizado las colonias hasta lograr turbidez se incuba el cultivo a 37 °C por 4 horas seguidamente el cultivo se estandariza por turbidez con el tubo N° 5 de la escala de Mc Farland cuya población micótica es $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.

2.7.1.4.3 *Preparación de la macro dilución en medio líquido.* Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria mediante el método de dilución en medio líquido en tubos con medio que es el caldo Müeller Hinton haciendo uso de un sistema de 13 tubos, pero los dos últimos fueron controles (positivo y negativo), conteniendo cada uno de ellos 3 ml entre caldo y solución madre en diferentes volúmenes a los que se le adicionó 300 μl . (10 %) de solución estandarizada de *Candida albicans* lo que resultó en las diferentes concentraciones. Los tubos fueron llevados a incubación a 37 °C durante 24 horas.

Tabla 4 .Concentración final de los Tratamientos para la prueba de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

TRATAMIENTO	VOLUMEN SOLUCIÓN MADRE μl	CALDO MÜELLER HINTON	TOTAL DE VOLUMEN	CONC. EN 1 000 μl	CONC. FINAL
T1	30	2 970 μl	3 000 μl	1,57572	0,52524 mg/ μl
T2	32	2 968 μl	3 000 μl	1,680768	0,560256 mg/ μl
T3	34	2 966 μl	3 000 μl	1,785816	0,595272 mg/ μl
T4	36	2 964 μl	3 000 μl	1,890864	0,630288 mg/ μl
T5	38	2 962 μl	3 000 μl	1,995912	0,665304 mg/ μl
T6	40	2 960 μl	3 000 μl	2,100096	0,70032 mg/ μl
T7	42	2 958 μl	3 000 μl	2,206008	0,735336 mg/ μl
T8	44	2 956 μl	3 000 μl	2,311056	0,770352 mg/ μl
T9	46	2 954 μl	3 000 μl	2,416104	0,805368 mg/ μl
T10	48	2 952 μl	3 000 μl	2,521152	0,840384 mg/ μl
T11	50	2 950 μl	3 000 μl	2,6262	0,8754 mg/ μl
T12	+	3 000 μl	3 000 μl		
T13	-	3 000 μl	3 000 μl		

Fuente: Elaboración propia.

2.7.1.5 Determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF).

Se tomó a partir del primer tubo, que no presentó turbidez, tres tubos en total sin turbidez (National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS. 1997)

de cada uno de ellos se resembró 100 μ l por diseminación en placa que contenían agar Müeller Hinton. Las placas se dejaron secar por 5 minutos para luego incubarlas a 37 °C por 24 horas transcurrido este tiempo se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes para cada concentración del aceite esencial.

2.7.1.6 Procesamiento y análisis estadístico (Fisher, R.A., 1934). El presente trabajo de investigación se basó en un estudio cuasi-experimental, todos los datos fueron procesados a través del software estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión 18.0 para Windows. Para el análisis estadístico se utilizó la técnica de análisis de varianza (ANOVA), usando la prueba F a un nivel de significación de 0,05 y 0,01 y para establecer las diferencias medias entre los tratamientos se utilizó prueba de significación de Tukey al 0,05.

CAPÍTULO III

3. Resultados

Se determinó la composición fitoquímica del aceite esencial extraído de las hojas de *Origanum vulgare* “Orégano”, presente en nuestro medio; mediante cromatografía gaseosa con detección de masa.

Luego se realizó un estudio de sensibilidad cualitativa “*in vitro*” de la actividad antimicótica del aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” frente al agente *Candida albicans* ATCC 6538, mediante el Método de difusión en disco (Kirby-Bauer) para lo cual se trabajó con 8 tratamientos y 4 repeticiones. Asimismo, se determinó la sensibilidad cuantitativa mediante la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Mínima Fungicida del aceite esencial de *Origanum vulgare* frente *Candida albicans* ATCC 6538.

Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas han sido agrupados en cuadros y gráficas para su mejor interpretación. Se utilizó el diseño completamente aleatorio, debido a que este es un diseño de simple distribución al azar siendo útil para métodos y técnicas de laboratorio.

Tabla 5. Composición fitoquímica del aceite esencial de *Origanum vulgare*

“Orégano”

ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICO																											
ANÁLISIS	RESULTADO																										
<p>Determinación cualitativa de metabolitos secundarios Cromatografía Gaseosa con detección de masas</p>	<ul style="list-style-type: none"> • 1 - Decene • Pentadecane • D - Limonene • Choestan – 3,22,26-triol 16-[2-[formylthio Cyclopentaneethanol, 4-(acetyloxy)-2-[(a • Undecane • 1-Dodecene • 7-Hexadecenal, (Z)- • 7-Hexadecenal, (Z)- • Octadecane, 5-methyl- • 1-Tetradecene 																										
<p>Determinación Cuantitativa de metabolitos secundarios (%) Cromatografía Gaseosa con detección de masas, método de cuantificación, por normalización interna (área)</p>	<table border="0"> <tbody> <tr> <td>• 1 – Decene</td> <td>7,54 %</td> </tr> <tr> <td>• Pentadecane</td> <td>7,28 %</td> </tr> <tr> <td>• D – Limonene</td> <td>5,26 %</td> </tr> <tr> <td>• Choestan – 3,22,26</td> <td>1,31 %</td> </tr> <tr> <td>-triol 16-[2-[formylthio</td> <td></td> </tr> <tr> <td>• Cyclopentaneethanol,</td> <td>2,18 %</td> </tr> <tr> <td>4-(acetyloxy)-2-[(a 1</td> <td></td> </tr> <tr> <td>• Undecane</td> <td>15,65 %</td> </tr> <tr> <td>• 1-Dodecene</td> <td>44,51 %</td> </tr> <tr> <td>• 7-Hexadecenal, (Z)-</td> <td>1,29 %</td> </tr> <tr> <td>• 7-Hexadecenal, (Z)-</td> <td>1,31 %</td> </tr> <tr> <td>• Octadecane, 5-methyl-</td> <td>1,34 %</td> </tr> <tr> <td>• 1-Tetradecene</td> <td>12,14 %</td> </tr> </tbody> </table>	• 1 – Decene	7,54 %	• Pentadecane	7,28 %	• D – Limonene	5,26 %	• Choestan – 3,22,26	1,31 %	-triol 16-[2-[formylthio		• Cyclopentaneethanol,	2,18 %	4-(acetyloxy)-2-[(a 1		• Undecane	15,65 %	• 1-Dodecene	44,51 %	• 7-Hexadecenal, (Z)-	1,29 %	• 7-Hexadecenal, (Z)-	1,31 %	• Octadecane, 5-methyl-	1,34 %	• 1-Tetradecene	12,14 %
• 1 – Decene	7,54 %																										
• Pentadecane	7,28 %																										
• D – Limonene	5,26 %																										
• Choestan – 3,22,26	1,31 %																										
-triol 16-[2-[formylthio																											
• Cyclopentaneethanol,	2,18 %																										
4-(acetyloxy)-2-[(a 1																											
• Undecane	15,65 %																										
• 1-Dodecene	44,51 %																										
• 7-Hexadecenal, (Z)-	1,29 %																										
• 7-Hexadecenal, (Z)-	1,31 %																										
• Octadecane, 5-methyl-	1,34 %																										
• 1-Tetradecene	12,14 %																										

Fuente: Universidad Católica de Santa María - Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad-Arequipa

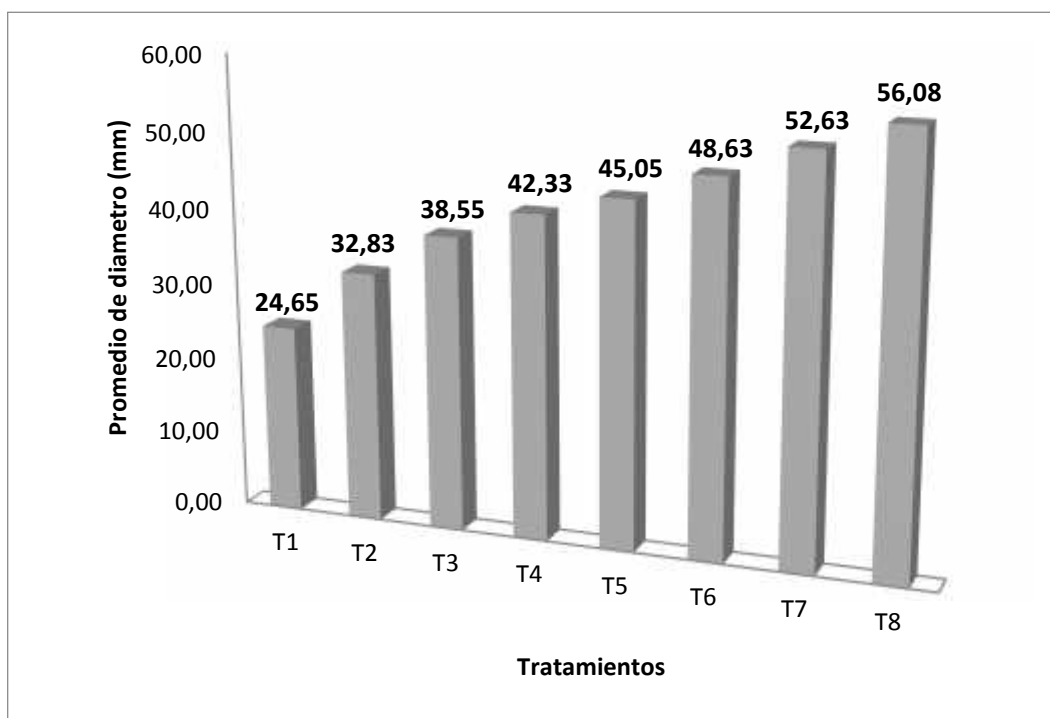
En la Tabla 5 se muestra la composición fitoquímica del aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” obtenido por el método de cromatografía gaseosa con detección de masa en forma cualitativa y cuantitativa, se determinó que los componentes con mayor presencia son: 1- Dodecene-(44,51 %); Undecene (15,65 %).

Tabla 6 .Aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano”,

Aceite esencial de <i>Origanum vulgare</i> “orégano”								
Tratamientos	Aceite esencial		N° Discos	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Promedio
	Volumen (ul)	[] (mg/ml)		Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Final Halos (mm)
T1	0,6	0,53	4	24,00	25,10	24,80	24,70	24,65
T2	0,8	0,70	4	32,30	33,60	34,60	30,80	32,83
T3	1,0	0,88	4	38,20	37,80	39,40	38,80	38,55
T4	1,2	1,05	4	42,10	43,40	41,20	42,60	42,33
T5	1,4	1,23	4	44,60	45,50	44,30	45,80	45,05
T6	1,6	1,40	4	48,10	48,80	49,00	48,60	48,63
T7	1,8	1,58	4	52,10	52,10	52,60	53,70	52,63
T8	2,0	1,75	4	56,10	57,30	55,10	55,80	56,08

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 6 se presenta los promedios de halos de inhibición producidos por las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Origanum vulgare* (Orégano) frente a *Candida albicans*, mediante el método de difusión del disco (Kirby Bauer). Los resultados obtenidos indican que hay un aumento progresivo del promedio de halo. Así se tiene mayor promedio de halo de inhibición a la concentración de 1,75 mg/ml con 56,08 mm de diámetro entre las distintas concentraciones del aceite esencial (Tratamiento 8); por el contrario el menor promedio de halo de inhibición se encuentra a la concentración de 0,5 mg/ml con 24,65 mm de diámetro (Tratamiento 1).



Fuente: Obtenido de Tabla 6.

Figura 2. Distribución de promedios de halos de inhibición en base al efecto del aceite esencial de *Origanum vulgare* (Orégano) en disco frente a *Candida albicans* ATCC 6538.

La Figura 2 muestra los promedios de halos de inhibición producido por las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Origanum vulgare* (Orégano). Se aprecia que el tratamiento T8 obtuvo el mayor promedio con 56,08 mm, seguido del tratamiento T7 en el segundo lugar; los de menor promedio fueron el T1 y T2 respectivamente 24,65 y 32,83 mm.

Tabla 7. Determinación del grado de sensibilidad de *Candida albicans* ATCC 6538 a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Origanum vulgare* (Orégano).

ACEITE ESENCIAL		GRADO DE SENSIBILIDAD		
VOL (μl)	[](mg)	SENSIBILIDAD LÍMITE 9-14MMM (SENSIBLE=+)	SENSIBILIDAD MEDIA 15-19 mm (MUY SENSIBLE=++)	SUMAMENTE SENSIBLE 20 mm A MÁS (S.S.=+++)
0,6	0,52524	-	-	24,65
0,8	0,70032	-	-	32,825
1	0,8754	-	-	38,55
1,2	1,05048	-	-	42,325
1,4	1,22556	-	-	45,05
1,6	1,40064	-	-	48,625
1,8	1,57572	-	-	52,625
2	1,7508	-	-	56,075

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 7 se determinó el grado de sensibilidad de acuerdo a los promedios de los halos de inhibición según la escala de Duraffourd y col.; observando que en todas las concentraciones del aceite esencial dan halos de inhibición mayores a 20,0 mm por lo cual, indican que *Candida albicans* ATCC 6538 es sumamente sensible frente a sus diferentes concentraciones del aceite esencial *Origanum vulgare* “Orégano”.

Tabla 8 Análisis de varianza (ANOVA) para comparar la actividad fungicida del aceite esencial de *Origanum vulgare* (Orégano).

Fuentes de variabilidad	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	F tabular
					Significación 0,05 0,01
Tratamientos	7	3034,440	433,491	547.352	2,42 *
Error	24	19,007	0,792		3,50 **
Total	31	19,007			

CV. 2,09 %

** Diferencias altamente significativa (Nivel de 0,01)

* Diferencias significativa (Nivel de 0,05)

ns = no significativo

Fuente: Datos del Tabla 6

En la Tabla 8 se observa los resultados del análisis de varianza (ANOVA), de los promedios de los halos de inhibición producidas a diferentes concentraciones o tratamientos del aceite esencial de *Origanum vulgare*. A niveles de confiabilidad al 95 % y 99 % con 7 y 24 grados de libertad se tiene F calculado de 547,352 mayores a los valores del F tabular (2,42 y 3,50), lo que indica que existen diferencias estadísticas altamente significativas entre los promedios de tratamientos, por lo que una de las concentraciones tendría mayor efecto y que corresponde al tratamiento T8. Asimismo, el coeficiente de variabilidad 2,09 % es aceptable para las condiciones del ensayo, por lo tanto, los datos son confiables.

Tabla 9 .Prueba de significación de Tukey para actividad antibacteriana del aceite esencial de *Origanum vulgare* (Orégano) frente a *Candida albicans* ATCC 6538 .

Orden de mérito	Tratamientos	(mm)	Significancia a=0,05
1	2	56,075	a
2	1,8	52,625	b
3	1,6	48,625	c
4	1,2	42,325	d
5	0,8	32,825	e
6	1,4	45,05	f
7	1	38,55	g

En la Tabla 9 se expresa la prueba de significación de Tukey al 95 % de confiabilidad se observa los promedios de los tratamientos o concentraciones, donde destacan con la mayor concentración 2,0 mg/ml con 56,075 mm es siendo estadísticamente superior a los demás promedios.

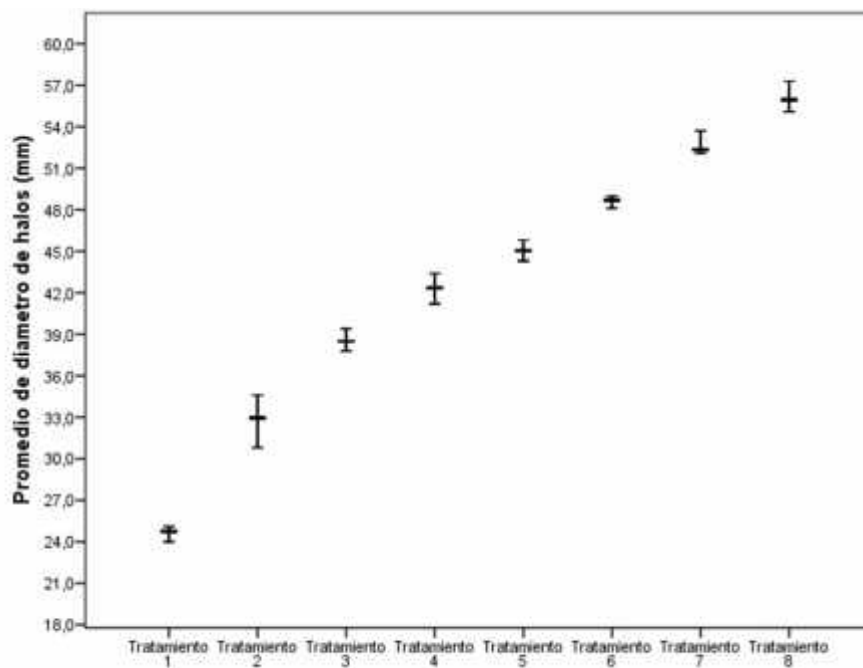


Figura 3 Medias e intervalos de Tukey HSD al 95,0

En la Figura 3 se muestra las medias e intervalos de Tukey HSD al 95,0 % apreciándose diferencias estadísticas significativas entre todos los tratamientos. La mediana de cada tratamiento supera ampliamente a la mediana de las otras.

*Tabla 10 . Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” frente a *Candida albicans* ATCC 6538.*

N° Tubo	[] Aceite esencial (mg)	Turbidez
1	0,52524	+
2	0,560256	+
3	0,595272	+
4	0,630288	+
5	0,665304	+
6	0,70032	+
7	0,735336	+
8	0,770352	+
9	0,805358	-
10	0,840384	-
11	0,8754	-
12	Control (+)	+
13	Control (-)	-

En la Tabla 10 se observa que las concentraciones de 0,52524 mg/ml hasta 0,770352 mg/ml presentan turbidez (+), lo que indica la existencia del crecimiento micótico; pero a partir de las concentraciones 0,805358 mg/ml hasta 0,8754 mg/ml no presentaron turbidez (-), lo que evidencia que no hubo crecimiento micótico. En el tratamiento N° 9 cuya concentración es 0,805358 mg/ml es el CMI, ya que fue el primer tratamiento donde ya no hubo crecimiento micótico.

Tabla 11 .Determinación de la Concentración Mínima Fungicida (CMF) del aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” frente a *Candida albicans* ATCC 6538

N° Tubo	[] (mg/ml)	UFC/Placa
9	0,805358	4
10	0,840384	2
11	0,8754	0

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla 11 se muestran sólo las concentraciones del aceite esencial de *Origanum vulgare* “Orégano” donde no se evidenció turbidez en la prueba de CMI. La Concentración Mínima Fungicida se observó en el tubo número 11 a la concentración de 0,8754 mg/ml en la que hay una inhibición absoluta del crecimiento de *Candida albicans*, mientras que en la concentración 0,805358 mg/ml y la concentración 0,840384 aún existe crecimiento de 4 UFC y de 2 UFC respectivamente.

CAPÍTULO IV

4. Discusión

Las plantas medicinales representan, muchas veces, el único recurso terapéutico disponible para los sectores más desfavorecidos de una población (Sharapin, 2002).

Los aceites esenciales (AE) son mezclas homogéneas de sustancias orgánicas provenientes de una misma familia química (terpenos y sus compuestos oxigenados). Tienen la propiedad común de generar diversos aromas agradables y perceptibles al ser humano, algunos presentan propiedades antimicóticas. Los aceites esenciales son una mezcla de lípidos o grasas de bajo peso molecular muy hidrofóbicas, generalmente menos densos que el agua, aromáticos y volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas, formados por terpenos, en particular monoterpenos y sesquiterpenos, así como sus derivados oxigenados, alcoholes, aldehídos, ácidos y ésteres terpénicos que se denominan respectivamente, monoterpenoides y sesquiterpenoides (Batish, Singh, Kohli & Kaur, 2008)(Bakkali, Averbeck, Averbeck & Idaomar, 2008) (Bosquez, Bautista & Morales.,2009)(Stashenko, 2000). Se encuentran muy difundidos en el reino vegetal, especialmente en las fanerógamas y se pueden encontrar localizadas en diferentes partes de la planta, por ejemplo en las hojas (“albahaca”, “mejorana”,

“menta”, “romero”, “salvia”, “Orégano”), en las raíces (“valeriana”, “vetiver”), en la corteza (“canela”, “cedro”), en la cáscara del fruto (“limón”, “mandarina”, “naranja”) o en los frutos (“anís”, “cardamo”, “hinojo”). La cantidad y composición del aceite varía de una especie a otra y dentro de los mismos géneros de la planta (Meza, Gonzales & Usubillaga, 2007)(Nejad, Hadian, Mirjalili, Somboli & Yousefzadi, 2008).

Desde el punto de vista químico pueden ser clasificadas según el predominio de algunos componentes, como por ejemplo monoterpenoides (“hierbabuena”, “albahaca”, “salvia”), sesquiterpenoides (“aceite de cedro”, “jengibre”) y, del tipo de mezcla donde los compuestos oxigenados son mayoritarios, entre éstos, los fenoles (“clavo”, “canela”, “anís”, “albahaca”, “laurel”, “tomillo”, entre otras) (Sheng-Yang, Pin Fun & Shang-Tzen, 2005) (Bosquez et al., 2009)(Stanshenko, 2000).

Los aceites esenciales son mezclas complejas de numerosas moléculas con gran diversidad de grupos químicos, la actividad antimicótica no se debe a un mecanismo específico, ya que en las células hay diferentes sitios donde pueden actuar y los eventos pueden llevarse a cabo en forma independiente, simultánea consecuente. Bosquez et al. (2009) y Maguna, Romero, Garro y Okulik (2006), propusieron como posible sitio de acción, la membrana celular donde los

terpenoides surtirían efecto desencadenando una serie de procesos que podrían provocar la muerte micótica. El carácter hidrofóbico de los aceites esenciales les permite incorporarse en los lípidos de las paredes celulares y la membrana fundamental micótica perturbando su estructura y consecuentemente su permeabilidad, dando lugar a la fuga de iones y otros contenidos celulares vitales, conduciendo finalmente a la muerte del microorganismo (Bosquez et al., 2009). Los aceites esenciales también podrían actuar sobre las proteínas embebidas en la membrana citoplasmática interfiriendo en la interacción lípido- proteína y afectando la actividad de enzimas como la ATPasa, disminuyendo la producción de energía requerida para el funcionamiento celular. Otra posible acción sería la interacción directa de los componentes lipofílicos con las partes hidrofóbicas de la molécula de proteína (Singh, Kapoor, Singh, Heluani & Lampasona, 2008) (Wang, Wang & Yang, 2009).

La susceptibilidad por los aceites, extractos alcohólicos, extractos acuosos liofilizados, etc., se desarrollaron en magnitudes en todos los ámbitos (bacterianos, micóticos, parasitológicos) de ahí que García et al. (1996) comprobó el efecto antioxidante de los extractos fluido y de flavonoides del *Plectranthus amboinicus* (“Orégano francés”) en el cual la alta concentración de flavonoides tuvo un efecto inhibitor sobre la formación de productos reactivos al ácido tiobarbitúrico, empezando así la carrera contra los diversos fármacos.

También en Cuba, Martínez (1996) comprobó que no todos los aceites esenciales producían una actividad antibacteriana, en su trabajo “Ausencia de actividad antimicrobiana de un extracto acuoso liofilizado de Aloe vera (“sábila”) determinó que sólo *Staphylococcus aureus* presentaba una ligera respuesta a éste. De los trabajos expuestos, se puede deducir que la actividad de algunas plantas no siempre son lo que se espera.

También los extractos de *Schinus terebinthifolius raddi* (“copal”) se utilizó en la investigación “Actividad antimicrobiana de un extracto de fluido al 80 % de *Schinus terebinthifolius raddi* (“copal”)”; Martínez et al. (2000) comprobaron su eficiencia a diferentes concentraciones frente a bacterias Gram positivas y negativas como también frente a *Candida albicans*. Los extractos hidroalcohólicos analizados en el trabajo De Paula y Martins (2000) “Acción antibacteriana de extractos hidroalcohólico de *Rubus urticaefolius* (“mora”) demostraron un grado de inhibición contra algunos bacilos. En el año 2001 y 2003 en los trabajos “Actividad antimicrobiana de *Illicium verum* Hook. F.” y “Actividad antimicrobiana de *Cuminum cyminum* L.” se demostraron que el “anís” y el “comino” no sólo servía como aditivos en aderezos, sino que combatía cierta cantidad de infecciones gastrointestinales como también combatía a levaduras y hongos (Kuklinski, 2003).

El diluyente que se utilizó fue el dimetilsulfóxido (DMSO), que es un líquido incoloro, que se utiliza principalmente como solvente industrial. El cual es un disolvente aprótico de baja toxicidad y a la vez recomendado por la NCCLS (2000) en las pruebas de sensibilidad para bacterias. No observándose en ninguno momento el efecto del solvente sobre las células bacterianas, hongos y levaduras; por lo que los resultados obtenidos son sólo imputables al aceite esencial.

El efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* “Orégano”, fue evaluado sobre levaduras *Candida albicans* ATCC 6538, dando como resultado, que el aceite esencial actúa sobre la levadura escogidas como representativa de este grupo de hongos. Aunque como se demuestra en el Cuadro 02 los halos de inhibición tiende a ser mayores teniendo una concentración de 0,52524 mg/ml (24,65 mm) y con un halo promedio final es su tratamiento 8 de 1,7508 mg/ml (56,075 mm); en este caso, la actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* “Orégano” es directamente proporcional a la concentración en la dilución, esto coincide con el trabajo de Venezolana de infectología (1997) (A la conquista de la Candidiasis) que estudiaron la actividad antimicótica del “Orégano” frente a diferentes hongos patógenos, hallando una relación directamente proporcional entre la concentración y el tamaño de la inhibición.

Para la obtención de estos resultados hay que considerar la actividad de compuestos presentes en el “Orégano”, tales como: el timol, cimeno, carvacrol, limoneno, -pipeno, -pineno, canfeno, -terpineno, -Felandeno, Canfeno, Linalol, Terpinen-4-ol (planta). También contiene flavonoides como naringenina y picocembrina, quercetina, kaempferol.

Los compuestos mayoritarios encontrados en las hojas de *Origanum vulgare* “Orégano” son el carvacrol, timol, r –cimeno y g – terpineno, aunque en diversos estudios realizados por cromatografía de gases/espectrometría de masas se han identificado de 16 a 56 compuestos diferentes.(<http://www.botanical-online.com/medicinalsoreganocastella.htm>).

En los archivos latinoamericanos de nutrición los estudios sobre el rendimiento de cinco especies de “Orégano”, encontraron que para *Origanum vulgare*, *Origanum dictamnun*, *Origanum onitis*, *Origanum glandulosum* los rendimientos en porcentaje de sus componentes fueron diferentes en cada una de ellas, respectivamente, mencionando que los resultados pueden variar según la especie de origen, así mismo que la cantidad de aceite obtenida depende del método de extracción, de los cuales la hidrodestilación es el que presentó mayor rendimiento, igualmente el más usado a nivel industrial por su sencillez y bajo costo, además la naturaleza del aceite no se ve afectada durante la extracción.

La actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* “Orégano”, sobre *Candida albicans* ATCC 6538 en el presente trabajo fue de una Concentración Mínima Inhibitoria de 0,805388 mg/ml con halo de 24,65 mm por el método de difusión en disco (Kirby Bauer), resultados similares fueron obtenidos por la Sociedad Venezolana de Infectología, (1997) quienes reportaron una actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* “Orégano”, en Venezuela, a una concentración de 0,81626 mg/ml con un halo de inhibición de 23,1 mm.

La actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* “Orégano”, sobre *Candida albicans* ATCC 6538 en el presente trabajo tuvo una Concentración Mínima Fungicida de 0,8754 mg/ml

Para determinar el grado de sensibilidad de aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* “Orégano”, por el método de Kirby Bauer, se siguieron las pautas según Duraffourd (1983), que considera que la actividad de los aceites esenciales es como sigue: a) sensibilidad límite, cuando presenta un diámetro entre 9 y 11 mm, b) sensibilidad media, cuando presenta un diámetro entre 11 a 20 mm y, c) sumamente sensible, cuando presenta un diámetro mayor a 20 mm.

No hay trabajos reportados en el Perú, respecto al efecto antimicótico *in vitro* del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* “Orégano”, frente a *Candida albicans* ATCC 6538, sólo se conoce la eficacia de otras especies vegetales frente a levaduras en mención.

Hernández y Rodríguez (1991) indicaron que la actividad antibacteriana observada de los aceites esenciales podría ser atribuida a una interacción o efecto sinérgico de los principios activos, cuya acción es la de provocar lesiones en la membrana citoplasmática, ocasionando alteraciones en la composición interna de la célula bacteriana.

Los resultados del presente trabajo permitieron afirmar que el aceite esencial, extraído de las hojas de *Origanum vulgare* “Orégano”, es productora de sustancias bioactivas con efecto antimicótica *in vitro* frente a *Candida albicans* ATCC 6538.

CAPÍTULO V

5. Conclusiones

- En la presente investigación se demostró la sensibilidad *in vitro* de la levadura patógena *Candida albicans* ATCC 6538 frente al aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* “Orégano”.
- Se determinó la sensibilidad antimicótica *in vitro* del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* “Orégano”, por el método de Disco difusión, siendo para *Candida albicans* ATCC 6538 de 0,52524 mg/ml y un halo de inhibición de 24,65 mm lo que se determina como Sumamente Sensible (+++).
- Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de dilución en medio líquido con el aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* “Orégano” de *Candida albicans* ATCC 6538 cuya concentración fue de 0,805358 mg/ml.
- Se determinó la Concentración Mínima Fungicida (CMF) por el método de difusión en agar con el aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* “Orégano” para *Candida albicans* ATCC 6538, cuya concentración fue de 0,8754 mg/ml.

CAPÍTULO VI

6. Recomendaciones

- Tomando el presente trabajo, se recomienda realizar pruebas experimentales *in vitro* del aceite esencial de las hojas de *Origanum vulgare* “Orégano”, frente a otros microorganismos de importancia clínica.
- Realizar otros métodos de extracción de las hojas de *Origanum vulgare* “Orégano”, para las pruebas de comparación del aceite esencial, de este modo lograr cuán efectiva son las diferentes extracciones y cómo variarán su actividad antimicótica.
- Realizar estudios de bioensayos en otras especies, para la valoración y preservación de los recursos naturales debido que nuestro país está entre los 12 países considerados como mega diversos.

BIBLIOGRAFÍA

- Araújo, J. & Salas, R. (2008). Actividad Antimicrobiana de plantas. Revista Científica.
- Arcila, Cynthia, Loarca G., Lecona, S. & González E. (2003). PROPAC (Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República), Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro, Departamento de Ciencia de Alimentos y Nutrición Humana, University of Illinois, Urbana-Champaign.
- Arraisa, M. Paz. (2009). Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales Universidad Politecnica de Madrid Tema 7 <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema1.pdf>
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D., & Idaomar M. (2008). Review. Biological effects of essential oils. Food and Chemical Toxicology. 46:446–75.
- Bandoni, A. L. (2000). “Los recursos vegetales aromáticos en latinoamérica”. CYTED; editorial de la Universidad de La Plata.
- Batish, D., Singh, H., Kohli, R. & Kaur, S. (2008). Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. Forest Ecology and Management. 256(12):2166-2174

- Bosquez M, Bautista E., & Morales J. (2009). Essential oils: biopreservatives of High potential in the food industry. Universidad Autónoma Metropolitana.;Mexico.
- Brack, A. & Heinz, P. (2002). Perú Maravilloso. Edit. Epenza.
- Byrnes, S. (1999). A la conquista de la candidiasis naturalmente. Revista «Continuum». Volumen 5. Número 6.
- Calderone, R., & Braun, P. (1991). Adherence and Receptor Relationships of *Candida albicans*. Microbiol Rev. 55(1): 1-20.
- Carhuapoma, M. (2006). Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de Luma chequen (Molina) A. Gray “arrayan”. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
- Casas Rincon, G. (1989). Micología General. Caracas. Universidad Central de Venezuela. Ediciones de la Biblioteca, pp. 243-247.
- Chávez, L., Díaz, F., Escalante, G. & Estrada E. (2008). Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* a la Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*. Universidad Nacional Federico Villarreal, Lima, Perú. CIMEL Vol. 13, Nº 2
- Cornejo, A. V. (1986). Estudio morfológico-estructural de plantas medicinales de uso más frecuente en Ayacucho. Tesis. Universidad San Cristóbal de Huamanga . Perú.

- De Paula J. & Martins A. (2000). Accion Antibacteriana de extractos hidroalcoholicos de Rubus urticaefolius. Rev cubana plant med 2000;5(1):26-9
- Del Villar J., & Esther Melo. (2010). Guía de plantas medicinales del Magreb : Establecimiento de una conexión intercultural, Fundación Dr Antonio Esteve.
- Díaz, O. (2007). “Estudio comparativo de la composición química y evaluación de la actividad antioxidante del aceite esencial de Aloysiatriphylla cultivada en 3 regiones de Colombia”. Tesis de la Universidad Industrial de Santander. Bucaramanga – Colombia.
- Dirección Regional Sectorial de Agricultura Tacna, GRT. (2013). Tacna: Produccion y exportacion de aceituna, orégano y cebolla, Región Tacna,
- Duraffourd C, D' Hervicourt L. & La praz J.C. (1983). Cuadernos de Fitoterapia Clínica. 1º edición. París: editorial Masson SA.
- Emanuel, Rubin & John L. Farber. (1990). Enfermedades infecciosas y parasitarias. Editorial Médica Panamericana. Argentina.
- Fisher, R. A., (1934). Statistical Methods for Research Workers. Biological Monographs and Manuals. Quinta edicion. Edimburgo-London.
- FOOD-INFO. (1999). Wageningen University Netherlandspecies y hierbas <http://www.food-info.net/es/products/spices/oregano.htm>

- García, J., García T., Menéndez R. & Buznego M. (1996). Efecto antioxidante de los extractos fluido y de flavonoides del *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. (oregano francés). *Rev Cubana Plant Med* v.1 n.3 Ciudad de la Habana sep.-dic.
- Ghannoum, M.A., Burns, G.R., & Abu Elteen, K. (1986). Experimental evidence for the role of lipids in adherence of *Candida* spp. to human buccal epithelial cells. *Infect Immun.* 54: 189-193.
- Hernandez, L. (2003). Actividad inhibitoria letal de los extractos de ajo para *E. coli* y *L. innocua*.
<http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/3285>
- King, R.D., Lee, J.C. & Morris, A.L. (1980). Adherence of *Candida albicans* and other *Candida* species to mucosal epithelial cells. *Infect Immun.* 27: 667-674.
- Kokkini, S. (1997). Taxonomy, diversity and distribution of *Origanum* species. - Pp. 2-12 in: Padulosi, S. (ed.), *Oregano*. - Rome.
- Koneman. Allen. Janda. (1987). "Diagnóstico Microbiológico"-Texto y Atlas en color-6ta Edición. Editorial médica Panamericana
- Lock de Ugas, O. (1994). Investigación fitoquímica. Método en el estudio de productos naturales. 2da Edición. PUCP. Lima – Perú.
- López López, César, Mazabel César & Del Castillo Kelvin. (1997). Determinación de la presencia de histoplasma en cuevas de atracción

turística en Tingo María.. Centro de Investigaciones de la Universidad Nacional Agraria de la Selva.

Lorenzi, H. & Mattos F. J. A. (2002). Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum. Brasil.

Mac Donald L, Baker C. & Chenoweth C. (1998). Risk factors for candidemia in a Children'Hospital. Clin Infect Dis; 26: 642-5.

Maguna F, Romero A, Garro O. & Okulik N. (2006). Mecanismos de acción de los Aceites Esenciales. Argentina: Universidad Nacional del Nordeste;

Mann, J. (1987). Secondary metabolism. Oxford, Oxford Science Publications.

Mann, J. (1992). Murder, magic and medicine. Oxford University Press, Nueva York

Martínez M., Betancourt J. & Alonso N. (1996). Rev Cubana Plant Med v.1 n.3 Ciudad de la Habana sep.-dic.

Martínez, M. A. (2003). "Aceites esenciales". Facultad química farmacéutica. Medellín.

Martínez, M., Lopez, M., & Morejón Z. (2000). Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius raddi* (copal). Rev Cubana Plant Med ; 5(1) : 23-25.

Meza, M., N. Gonzalez,, & A. Usubillaga. (2007). Composición del aceite esencial de *Origanum majorana* L. extraído por diferentes técnicas y su actividad biológica. Revista Facultad de Agronomía. 24 (4): 725-38.

- Mims, C.; Playfair, J.; Roitt, I.; Wakelin, D. & William, R. (1995). "Microbiología Médica". Mosby/Doyma Libros División de Times Mirror de España. S.A.
- Mukhopadhyay R.; Banerjee A. B. & Miro M. (2001). Actividad antimicrobiana de *Illicium verum* Hook. f.. *Ars Pharm* 42(3-4); Universidad de Granada, Facultad de Farmacia
- Mukhopadhyay R.; Banerjee A. B. & Miro M. (2003). "Actividad antimicrobiana de *Cuminum cyminum* L." *Ars Pharmaceutica*, 44(3). Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, Granada España;
- National Committee for clinical Laboratory Standards (NCCLS). (1997). Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. Approved Standard M11-A4. Wayne, PA.
- National Committee for clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2000). Disk diffusion supplemental tables. Document M100-S10. Wayne, PA.
- National Committee for clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2000). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved Standard M7-A5. Wayne, Pa.
- National Committee for clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2000). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard, M2-A7. Wayne, Pa.

- Nejad S., Hadian J., Mirjalili M., Somboli A. & Yousefzadi M. (2008). Essential oil composition and antibacterial activity of *Thymus caramanicus* at different phenological stages. *Química de los alimentos*. 110(4): 927-931.
- Odds, F.C. (1994). Pathogenesis of *Candida* infections. *J Am Acad Dermatol*. 31: S2-S5.
- Organización Panamericana de Salud. (1998). Situación de la Medicina Tradicional en América. Bolivia.
- Palacios V. (1993). Plantas Medicinales del Perú. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Lima-Perú.
- Pérez, E. (1996). Plantas útiles de Colombia. Bogotá, Colombia, Fondo FEN
- Peredo, A., Palou, E. & Lopez, A. (2009). Aceites esenciales: métodos de extracción. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos* 3.1:24-32.
- Pierce, A.M.; Pierce, H.D.; Unrau, A.M. & Oehlschlager, A.C. (1978). Lipid composition and polyene antibiotic resistance of *Candida albicans*. *Can J Biochem*. 56: 135-142.
- Reiss, E.; Stone, S.H. & Hasenclever, H.F. (1974). Serological and cellular immune activity of peptidoglucomannan fractions on *Candida albicans* cells walls. *Infect Immun*. 9: 881-890.
- Russo M, Galletti GC, Bocchini P, & Carnacini A. (1998). Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their

- use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *J. Agric. Food Chem.*; 46: 3741-3746.
- Russo M, Galletti G.C., Bocchini P. & Carnacini A. (1998). Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *J. Agric. Food Chem.*; 46: 3741-3746.
- Samson, J. (1990). Candidiosis buccales: Epidémiologie, diagnostic et traitement. *Rev Mens Suisse Odontostomatol.* 100: 548-559.
- Sanchez, F. (2006). Extracción de Aceites esenciales: Experiencia Colombiana, II Congreso Internacional de Plantas Medicinales y Aromáticas; Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira: I – 8.
- Sharapin, N. (2000). Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Subprograma X Química Fina Farmacéutica. Colombia: Pinzón R, Ed.
- Sheng-Yang, W., C., Pin-Fun, C. & Shang-Tzen. (2005). Antifungal activities of essential oils and their constituents from indigenous cinnamon (*Cinnamomum osmophloeum*) leaves against wood decay fungi. *Bioresource Technology* 96 (7): 813-818.

- Singh G., Kapoor I., Singh P., Heluani C. & Lampasona M. (2008). Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology* 46: 3295-302.
- Skuola M, Gotsiou P, Naxakis G. & Johnson CB. (1999). A chemosystematic investigation on the mono and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). *Phytochem.*; 52: 649-657.
- Sobel, J.D.; Muller, G.; Myers, P.G.; Kaye, D. & Levison, M.E. (1981). Adherence of *Candida albicans* to human vaginal and buccal epithelial cells. *J Infect Dis.* 143: 76-82
- Sociedad Iberoamericana de información Científica (SIIC) (2002). Disponible en: <http://www.bago.com/BagoArg/Biblio/infectoweb534.htm>
- Stamos J K. & Rowley A. H. (1995). Candidemia in a pediatric population. *Clin Infect Dis*; 20: 571-5.
- Stashenko, E. (2000). Estudio prospectivo de aceites esenciales colombianos de interés industrial. *Universidad Industrial de Santander.* 18(1):645-6737.
- Stevens, Alan & James Lowe. (1996). *Texto y atlas de anatomía patológica.* -- Madrid: Mosby; Doyma.
- Tillan Capo, J. (2002). Plantas medicinales. *Revista cubana* N° 2. Volumen 7. Pág. 37-44. Cuba.

- Van Ginkel, A. (2003). Apuntes del Máster y Diplomatura de posgrado de la UAB
“Plantas Medicinales y Fitoterapia. Módulo 2. Cultivo de plantas
medicinales. Tecnología y Producción.”
- Villar de Fresno, A.M. (1999). Farmacognosia General. Editorial Síntesis. España.
- Villar M. & O. Villavicencio. (2001). Manual de Fitoterapia, OPS/OMS/EsSalud-
Programa Nacional de Medicina Complementaria, Lima, Peru, 2001.
- Volk, W.A., Benjamin, D.C., Kadner, R.J. & Parsons, J.T. (1989). Microbiología
Médica. Interamericana Mc Graw-Hill. 3ra Edición, pp. 533-560
- Wang, R., R. Wang, & B. Yang. (2009). Extraction of essential oils from five
cinnamon leaves and identification of their volatile compound
compositions. Innovative Food Science and Emerging Technologies
10(2):289–292.

ANEXOS

Anexo 1

Identificación de especie botánica *Origanum vulgare*.

Tacna, 24 de noviembre de 2014



Señor
MSc. ARÍSTIDES CHOQUEHUANCA TINTAYA
 Decano (e) de la FCAG
 Presente.-

De mi consideración :

Tengo el agrado de dirigirme a usted para manifestarle con relación a la solicitud de la srta. Bach. Orfilia N. Mamani Callacondo, sobre la identificación de una especie botánica. Al respecto le informo que se ha procedido a identificar la muestra recibida y debo señalar que se trata de *Origanum vulgare* L. "**Orégano**".

Sin más que informar al respecto, le saludo cordialmente.

Atentamente,


Dra. ROSARIO ZEGARRA YDA. DE CHÁVEZ
 Profesora Principal FCAG



Anexo 2

Extracción del aceite esencial de *Origanum vulgare* por destilación por arrastre de vapor



Anexo 3



UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umachillo CAMPUS UNIVERSITARIO H.264026 聖 + 51 54 251210 ANEXO 1188
 E: laboratorioensayo@ucsm.edu.pe F: 442 (línea ucsm.edu.pe) T: Apdo. 1392
 AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO
Nº DE INFORME: ANA14K14.001470

Nombre del Cliente	: ORFILIA NANCY MAMANI CALLACONDO
Dirección del Cliente	: CALLE JOSÉ TORIBIO ARA I-202 PARACHICO TACNA
RUC	: NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: ACEITE DE OREGANO
Tamaño de muestra	: 10 mL
Fecha de Recepción	: 14/11/2014
Fecha de Ejecución del ensayo	: 14/11/2014
Fecha de Emisión de Informe	: 21/11/2014
Página	: 1 de 2


I. ANALISIS FISICO – QUIMICO:

ANALISIS	RESULTADO																								
DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECCIÓN DE MASAS (DENOMINACION NIST)	1-Decene Pentadecane D-Limonene Cholestan-3,22,26-triol[16-[2-]formylthio Cyclopentaneethanol, 4-(acetyloxy)-2-(a Undecane 1-Dodecene 7-Hexadecenal, (Z)- 7-Hexadecenal, (Z)- Octadecane, 5-methyl- 1-Tetradecene																								
DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS (%) CROMATOGRAFÍA GASEOSA CON DETECCIÓN DE MASAS, METODO DE CUANTIFICACIÓN, POR NORMALIZACIÓN INTERNA (AREA)	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td>1-Decene</td><td style="text-align: right;">7.54%</td></tr> <tr><td>Pentadecane</td><td style="text-align: right;">7.28%</td></tr> <tr><td>D-Limonene</td><td style="text-align: right;">5.26%</td></tr> <tr><td>Cholestan-3,22,26-triol</td><td style="text-align: right;">1.31%</td></tr> <tr><td>16-[2-]formylthio</td><td style="text-align: right;">2.18%</td></tr> <tr><td>Cyclopentaneethanol, 4-(acetyloxy)-2-(a</td><td style="text-align: right;">15.65%</td></tr> <tr><td>Undecane</td><td style="text-align: right;">44.51%</td></tr> <tr><td>1-Dodecene</td><td style="text-align: right;">1.29%</td></tr> <tr><td>7-Hexadecenal, (Z)-</td><td style="text-align: right;">1.31%</td></tr> <tr><td>7-Hexadecenal, (Z)-</td><td style="text-align: right;">1.54%</td></tr> <tr><td>Octadecane, 5-methyl-</td><td style="text-align: right;">12.14%</td></tr> <tr><td>1-Tetradecene</td><td style="text-align: right;"></td></tr> </table>	1-Decene	7.54%	Pentadecane	7.28%	D-Limonene	5.26%	Cholestan-3,22,26-triol	1.31%	16-[2-]formylthio	2.18%	Cyclopentaneethanol, 4-(acetyloxy)-2-(a	15.65%	Undecane	44.51%	1-Dodecene	1.29%	7-Hexadecenal, (Z)-	1.31%	7-Hexadecenal, (Z)-	1.54%	Octadecane, 5-methyl-	12.14%	1-Tetradecene	
1-Decene	7.54%																								
Pentadecane	7.28%																								
D-Limonene	5.26%																								
Cholestan-3,22,26-triol	1.31%																								
16-[2-]formylthio	2.18%																								
Cyclopentaneethanol, 4-(acetyloxy)-2-(a	15.65%																								
Undecane	44.51%																								
1-Dodecene	1.29%																								
7-Hexadecenal, (Z)-	1.31%																								
7-Hexadecenal, (Z)-	1.54%																								
Octadecane, 5-methyl-	12.14%																								
1-Tetradecene																									




Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

Anexo 4




UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS, BIOQUIMICAS Y BIOTECNOLOGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San Juan 576 Urbacillo CAMPUS UNIVERSITARIO 11-304033 ☎ + 51 94 251210 ANEXO 1100
 info@laboratorioensayo@ucsm.edu.pe http://www.ucsm.edu.pe Apurí: 1200
 AREQUIPA - PERU




INFORME DE ENSAYO
N° DE INFORME: ANA14K14.001470

Nombre del Cliente	: ORFILA NANCY MAMANI CALLACONDO
Dirección del Cliente	: CALLE JOSÉ TORIBIO ARA I-202 PARACHICO TACNA
RUC	: NO CORRESPONDE
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: ACEITE DE OREGANO
Tamaño de muestra	: 10 mL
Fecha de Recepción	: 14/11/2014
Fecha de Ejecución del ensayo	: 14/11/2014
Fecha de Emisión de Informe	: 21/11/2014
Página	: 2 de 2




N°	Retención	Identificación	Concentración
1	10.123	ACEITE DE OREGANO	100%

OBSERVACIONES:
 Este documento al ser emitido con el símbolo de acreditación, se encuentra dentro del marco de la acreditación otorgada por INDECOPI-SNA



Q.F. Juan Ramirez Chelana
 3814 052
 DIRECTOR TÉCNICO



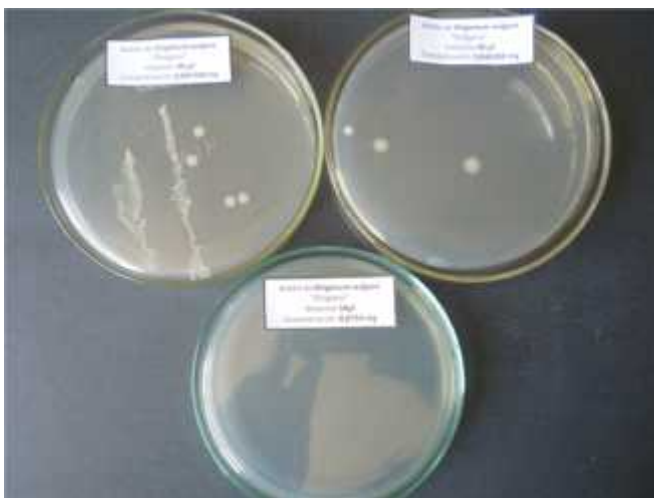
Los resultados emitidos en el presente informe, se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

Anexo 5

Medición de halo de inhibición de *Candida*

Anexo 6

Determinación de la Concentración Mínima Fungicida



ASESORA


BLGA. MBLGA. ANGELA CHOQUE MIRANDA

TESISTA


ORFILIA NANCY MAMANI CALLACONDO