

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

“DR. WILMAN RUÍZ VIGO”

CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata*

“salvia azul” en cepas de *Sporothrix schenckii*.

Mendoza Hinostroza Mónica Lizeth

Monsalve Dávila Fanny Edith

Asesora:

Mg. Q.F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia

Coasesor:

Dr. Blgo. Jorge Enrique Bazán Mayra

Cajamarca – Perú

Mayo – 2017

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

“DR. WILMAN RUÍZ VIGO”

CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata*

“salvia azul” en cepas de *Sporothrix schenckii*.

Tesis presentada en cumplimiento parcial de los requerimientos para optar el Título Profesional de
Químico Farmacéutico

Bach. Mendoza Hinostroza Mónica Lizeth

Bach. Monsalve Dávila Fanny Edith

Asesora: Mg. Q.F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia

Coasesor: Dr. Blgo. Jorge Enrique Bazán Mayra

Cajamarca – Perú

Mayo – 2017

COPYRIGHT © 2017 by

Mendoza Hinostriza Mónica Lizeth

Monsalve Dávila Fanny Edith

Todos los derechos reservados

PRESENTACIÓN

SEÑORES MIEMBROS DEL JURADO DICTAMINADOR:

De conformidad con el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo, sometemos a su evaluación y elevado criterio profesional la tesis intitulada:

Efecto antimicótico in vitro del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” en cepas de *Sporothrix schenckii*.

Con la cual aspiramos obtener el Título Profesional de Químico Farmacéutico.

Es propicia esta oportunidad para manifestar nuestro sincero reconocimiento a nuestra Alma Mater y a toda su plana docente, que con su capacidad y buena voluntad contribuyeron a nuestra formación profesional.

Señores miembros del jurado, dejamos a su disposición la presente tesis para su evaluación y sugerencias.

Cajamarca, mayo del 2017

Mendoza Hinostroza Mónica Lizeth
BACH. EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Monsalve Dávila Fanny Edith
BACH. EN FARMACIA Y BIOQUÍMICA

DEDICATORIA

A DIOS por estar siempre a mi lado, sustentar mi vida, e iluminarme para culminar mis estudios guiándome por el camino del triunfo y la verdad.

A mi madre: IRMA HINOSTROZA, por ser el ser más grande y valioso que Dios me ha regalado, siendo la que siempre me impulsa a confiar en mi misma y así poder terminar mi carrera, ya que ella es mi fuente de inspiración y razón que me impulsa a seguir adelante.

A mi padre: PERCY MENDOZA, quien a pesar de haberlo perdido a muy temprana edad, ha estado siempre cuidándome y guiándome desde el cielo.

A mis hermanos: FIORELA Y KEVIN, quienes vieron siempre en mí un modelo a seguir y que indirectamente me impulsaron a seguir adelante y culminar con mi carrera.

Mónica Mendoza

DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mis abuelos María Felicitas y Arcemio, por ser el pilar más importante ya que ellos siempre estuvieron a mi lado brindándome su amor, apoyo incondicional y por sus sabios consejos para hacer de mí una mejor persona.

A mis padres Edilberto e Hilda, por los ejemplos de perseverancia y constancia que los caracterizan y que me han inculcado siempre, por el apoyo para salir adelante y por su amor.

A mi hermano Edwin, por ser un gran amigo para mí y que junto a sus ideas y ocurrencias hemos pasado momentos increíbles e inolvidables, sin duda los más importantes de mi vida.

A una persona especial por ser alguien excepcional ya que me brindó su apoyo incondicional en el transcurso de mi carrera universitaria, por compartir momentos de alegría, tristeza y demostrarme que siempre podré contar con él.

Fanny Monsalve

AGRADECIMIENTO

A Dios, que nos ha brindado fortaleza para continuar nuestros estudios; a nuestra Alma Mater “Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo”, en cuyos ambientes quedan los recuerdos de nuestra formación profesional, a los docentes que nos brindaron sus conocimientos, quienes con sus sabios consejos y enseñanzas nos han orientado en esta profesión de salud, humanística, científica y tecnológica.

A nuestra Asesora Mg. Q.F. Jéssica Nathalie Bardales Valdivia, quien con su experiencia ha sido la guía idónea, durante el proceso que ha llevado la realización de este trabajo de investigación.

También nuestro agradecimiento está dirigido al Dr. Jorge Bazán Mayra, por habernos dedicado un poco de su tiempo y conocimiento para el desarrollo de este trabajo de investigación.

Agradecemos a la vez a nuestro amigo Smith Cabanillas Murillo, quien nos brindó su apoyo, demostrándonos así su amistad hacia nosotras, apoyándonos en el desarrollo de este trabajo de investigación

Mónica y Fanny

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” sobre *Sporothrix schenckii*.

El material vegetal se obtuvo de la zona denominada el “Gavilán”, ubicada en el anexo Shin Shin del centro poblado Cashapampa - Cajamarca, utilizando las técnicas de recolección adecuadas, teniendo en cuenta los criterios de inclusión y de exclusión, del cual se obtuvo el aceite esencial por hidrodestilación, utilizando el destilador de caldera de acero inoxidable. Las cepas tipificadas de *Sporothrix schenckii*, fueron obtenidas del Laboratorio de Referencia de Salud Pública de la DIRESA - Cajamarca. Para analizar la actividad antimicótica se utilizaron los métodos de macrodilución, difusión en disco y dilución en agar, en todos estos métodos se trabajó con controles de esterilidad y crecimiento.

En el método de macrodilución se utilizaron 5 grupos problemas constituidos por las siguientes concentraciones 100%, 50%, 25%, 12,5% y 6,25% del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” y 2 grupos control: itraconazol (100 µg/100 mL) y fluconazol (100 µg/100 mL).

Para el método de difusión en disco se utilizaron 5 grupos problemas constituidos por las siguientes concentraciones 100%, 50%, 25%, 12,5% y 6,25% del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” y 2 grupos control: itraconazol (100 µg/100 mL) y fluconazol (100 µg/100 mL).

En el método de dilución en agar se utilizaron 5 grupos problemas constituidos por las siguientes concentraciones 5 $\mu\text{L/mL}$, 10 $\mu\text{L/mL}$, 20 $\mu\text{L/mL}$, 40 $\mu\text{L/mL}$ y 80 $\mu\text{L/mL}$ del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”. Luego se procedió a observar, medir y analizar los resultados obtenidos para la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*.

Los resultados obtenidos por el método de macrodilución y dilución en agar se analizaron con la prueba estadística chi-cuadrado obteniéndose un $p = 0,000$ para ambos métodos y para el método de difusión en disco los resultados se analizaron con la prueba estadística U de Mann – Whitney obteniéndose un $p = 0,012$.

Según los resultados obtenidos en el presente estudio se concluye que el aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” posee actividad antimicótica in vitro frente a la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*.

PALABRAS CLAVES: Aceite esencial, *Salvia sagittata* “salvia azul”, *Sporothrix schenckii*, levadura, antifúngico.

ABSTRACT

The present research aims to determine the antifungal activity *in vitro* of the leaves of *Salvia sagittata* "salvia azul" essential oil on *Sporothrix schenckii*.

The plant sample was obtained from the "Gavilán" area, located in the Shin Shin Annex of the Cashapampa - Cajamarca settlement, using techniques of appropriate collection, considering the inclusion and exclusion criteria, the Essential oil was obtained by hydrodistillation, using the stainless steel boiler distiller. The typified strains of *Sporothrix schenckii* were obtained from the DIRESA Cajamarca Public Health Reference Laboratory. To analyze the antifungal activity, we used the methods of macrodilution, disc diffusion and dilution in agar, in all these methods we worked with sterility and growth controls.

In the macrodilution method 5 groups were used: 100%, 50%, 25%, 12,5% and 6,25% dilutions of the essential oil of the leaves of *Salvia sagittata* "salvia azul" and 2 control groups: itraconazole (100 µg/100 mL) and fluconazole (100 µg/100 mL).

For the disc diffusion method 5 groups were used: 100%, 50%, 25%, 12,5% and 6,25% delutions of the essential oil of the leaves of *Salvia sagittata* "salvia azul" and 2 Control groups: itraconazole (100 µg/100 mL) and fluconazole (100 µg/100 mL).

In the agar dilution method 5 groups were used: 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ and 80 $\mu\text{L}/\text{mL}$ dilutions of the essential oil of the leaves of *Salvia sagittata* "salvia azul". The results obtained for the levoduriform form of *Sporothrix schenckii* were then observed, measured and analyzed.

The results obtained by the method of macrodilution and dilution in agar were analyzed with the chi-square statistical test obtaining a $p = 0,000$ for both methods and for the disc diffusion method the results were analyzed with the statistical test U of Mann-Whitney obtaining $P = 0,012$.

According to the results obtained in this research, we conclude that the leaves of *Salvia sagittata* "salvia azul" essential oil has antifungal activity against levaduriform form of *Sporothrix schenckii* in vitro.

Keywords: Essential oil, *Salvia sagittata* "blue salvia", *Sporothrix schenckii*, yeast, antifungal.

ÍNDICE

PRESENTACIÓN.....	I
JURADO EVALUADOR.....	II
DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTO.....	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABLAS.....	XIV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Antecedentes.....	5
2.2. Generalidades de los hongos.....	10
2.2.1. Estructura micótica.....	11
2.2.2. Metabolismo micótico.....	14
2.2.3. Reproducción micótica.....	15
2.2.4. Morfología y crecimiento micótico.....	16
2.3. <i>Sporothrix schenckii</i>	23
2.3.1. Clasificación científica.....	24
2.3.2. Epidemiología.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Célula micótica eucariota.....	12
Figura 2: Pared celular de un hongo.....	14
Figura 3: Esquema de la reproducción sexuada y asexuada en zigomicotina.....	16
Figura 4: Forma levaduriforme y filamentosas de <i>Sporothrix schenckii</i> ...	17
Figura 5: Formas de crecimiento de hongos en levadura y mohos.....	18
Figura 6: Formas asexuales de mohos.....	21
Figura 7: Formas asexuales de mohos.....	28
Figura 8: Esporotricosis. Nódulos y placas costrosas confluyentes de trayecto linfático, extendiéndose en el miembro inferior.....	29
Figura 9: Esporotricosis. Lesiones nodulares, ulceradas que siguen el trayecto de los linfáticos localizados en los miembros inferiores y superiores.....	29
Figura 10: Esporotricosis. Placas verrucosas crónicas a nivel del tobillo izquierdo.....	30

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Clasificación inmunológica de la esporotricosis.....	27
Tabla 2: Clasificación clínica de la esporotricosis.....	28
Tabla 3: Puntos de corte y equivalencia diámetro – CMI para <i>Candida</i> spp.....	56
Tabla 4: Inhibición de la forma levaduriforme de <i>Sporothrix schenckii</i> a diferentes concentraciones del aceite esencial de hojas de <i>Salvia sagittata</i> “salvia azul”.....	62
Tabla 5: Resumen estadístico de método de Macrodilución.....	63
Tabla 6: Medidas de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de hojas de <i>Salvia sagittata</i> “salvia azul” frente a la forma levaduriforme de la cepa de <i>Sporothrix schenckii</i>	64
Tabla 7: Resumen estadístico de método de difusión en disco.....	65
Tabla 8: Sensibilidad de las diferentes volúmenes del aceite esencial de hojas de <i>Salvia sagittata</i> “salvia azul” frente a la forma levaduriforme de la cepa de <i>Sporothrix schenckii</i>	66
Tabla 9: Resumen estadístico de método de dilución en agar.....	67

I. INTRODUCCIÓN

Bajo la denominación de micosis se agrupan una serie de enfermedades muy variadas en cuanto a sus manifestaciones clínicas, que se encuentran producidas por hongos, tanto miceliales como unicelulares (levaduras), siendo una de éstas, la esporotricosis, que es una infección micótica de evolución subaguda o crónica adquirida por inoculación traumática o por inhalación de conidios de alguna de las especies del complejo *Sporothrix schenckii*. La enfermedad puede afectar a humanos y animales. Se caracteriza por la presencia de lesiones nodulares en piel y tejido subcutáneo. Frecuentemente sigue el trayecto de los vasos linfáticos y ocasionalmente otros órganos, huesos y articulaciones. Se localiza principalmente en cara, en extremidades torácicas y pélvicas.^{13,16}

La enfermedad ocurre en todo el mundo pero se encuentra principalmente en zonas tropicales, de temperaturas cálidas y húmedas, se ha comprobado que no crece por debajo de los 13 °C. Prevalece en Sudáfrica, Japón y en América sobre todo en la zona comprendida entre los trópicos.^{13,27}

Hoy en día el mayor número de casos se da en México, Guatemala, Venezuela, Colombia, Argentina, Uruguay, Perú y Brasil. Se da por lo general en pacientes malnutridos (hospedero comprometido). No hay diferencia significativa en la incidencia de la enfermedad con respecto al sexo y la raza.³⁵

Casos de esporotricosis han sido publicados en todas las edades, aunque la mayoría de los casos se da en pacientes de alrededor de 30 años y en niños de menos de 10 años de edad.¹⁷

Según lo reportado por varias investigaciones, en el Perú, es endémica en Abancay, Cajamarca, Ayacucho, Cusco y Otuzco en La Libertad. En especial, la provincia de Abancay es considerada como una zona hiperendémica con una tasa de incidencia de 48 – 60 x 100 000 habitantes y son los menores de 14 años los más afectados; otros estudios en esa provincia muestran que la incidencia podría ser mayor, con un reporte de 98 casos x 100 000 habitantes. Los datos de esporotricosis diagnosticados por el Laboratorio de Referencia Nacional de Micología del Instituto Nacional de Salud del Perú revelan, en un periodo de 10 años, un total de 472 casos, de los cuales 235 (50%) procedían de Abancay, 204 (43%) de Cajamarca y como nuevas zonas Amazonas, Arequipa e Iquitos.³⁹

El tratamiento es de largo plazo, entre 12 a 19 semanas, dependiendo del medicamento utilizado. El yoduro de potasio, junto con la anfotericina B es el tratamiento de elección y son las principales alternativas utilizadas en el Perú debido a su bajo costo; pero, presenta una gama de reacciones adversas de índole gastrointestinal, dérmicos y otros que afectan a la adherencia del paciente al tratamiento; sin embargo, dichos medicamentos ya no están presentando la misma efectividad por la aparición de cepas resistentes a los antifúngicos convencionales, esto ha llevado a una búsqueda incansable de nuevas alternativas eficaces y seguras provenientes de la naturaleza, por lo cual, la ciencia está volteando su mirada al tratamiento fitoterapéutico, ya que muchas variedades de plantas han

presentado excelentes propiedades antimicrobianas, como es el caso de la *Salvia sagittata* “salvia azul”, planta que ha sido utilizada desde tiempos ancestrales para tratar diversos malestares y entre ellos las micosis, de allí surge la presente investigación.^{23,28,38}

Por lo dicho anteriormente, se planteó la siguiente interrogante:

¿Presentará efecto antimicótico in vitro el aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” sobre la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*?

Teniendo como objetivo general:

- Determinar la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” frente a la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*.

Y como objetivos específicos:

- Comparar el efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” a través del método de macrodilución frente a la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*, utilizando como controles a itraconazol y fluconazol.
- Comparar el efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” a través del método de difusión en disco frente a la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*, utilizando como controles a itraconazol y fluconazol.

- Comparar el efecto antimicótico de las diferentes concentraciones (5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 80 µg/mL) del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” sobre la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*, por el método de dilución en agar.

Ante lo cual se postuló la siguiente hipótesis:

- El aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”, presenta efecto antimicótico in vitro frente a la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

- **Dulger B, Hacioglu N (2008)**, en el estudio titulado “Actividad antifúngica de la especie *Salvia tigrina*”, mencionan que los extractos de etanol obtenido de las hojas, rizomas y la formulación combinada de *Salvia tigrina* (Labiataea) han sido investigados por su efecto antifúngico. La actividad antifúngica del extracto se ensayó frente a especies de *Candida*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium frequentans*, *Botrytis cinerea*, *Geotrichum candidum*, *Fusarium oxysporum* y *alternaria Alternata* por el método de macrodilución en caldo. El ketoconazol se utilizó como patrón de referencia positivo para determinar la sensibilidad de las cepas. Todos los extractos exhibieron efecto antifúngico contra los cultivos de hongos. Los extractos mostraron mejor efecto antifúngico frente a *Candida albicans*, *Candida neoformans* y *Botrytis. cinerea*. Los resultados proporcionan apoyo para el uso de esta planta en la medicina tradicional para las infecciones causadas por hongos.¹²
- **Rashidi A, Mousavi B, Reza R, et al (2011)**, en su estudio “Evaluación del efecto antifúngico de los extractos de *Lavándula officinalis*, *Salvia officinalis*, *Rhus coriaria* (Zumaque), *Glycyrrhiza glabra* y *Althaea officinalis* sobre *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*”, cuyo objetivo fue evaluar el efecto de estas plantas en especies

clínicas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*. Este estudio mostró que *Lavándula officinalis*, *Salvia officinalis*, *Rhus coriaria* (Zumaque), *Glycyrrhiza glabra* y *Althaea officinalis* tienen efectos antifúngicos. El efecto antifúngico de *Rhus coriaria* (Zumaque), *Glycyrrhiza glabra* y *Lavándula officinalis* fue significativamente diferente a la observada por *Salvia officinalis*. Es necesario una evaluación más profunda para aclarar el alcance y el mecanismo de estos cambios.³²

- **Yuce E, et al (2014)**, en el estudio “Composición de aceites esenciales, y actividad antioxidante y antifúngica de *Salvia sclarea*”, se determinó la actividad antifúngica in vitro de etanol, hexano y extractos acuosos de *Salvia sclarea* contra hongos patógenos *Epicoccum nigrum* y *Colletotrichum coccodes*. El aceite esencial de las partes aéreas de *Salvia sclarea* se obtuvo por hidrodestilación y se analizó por cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). El estado total de antioxidantes (TAS) fue determinado usando el ensayo de diagnóstico Rel y el kit de ensayo TAS (Lot.RL024) mediante el multiscaner de fotómetro de microplaca (FC). Se identificaron 33 compuestos que representaban el 85,0% de los aceites totales. Los componentes más abundantes (> 5%) de los aceites esenciales de *Salvia sclarea* fueron el óxido de cariofileno (24,1%), el esclareol (11,5%), el spathulenol (11,4%), el 1H-nafto (2, 1,6) pirano (8,6%) y b-cariofileno (5,1%). El mejor efecto antifúngico y antioxidante se observó en el extracto etanólico de *Salvia sclarea*.³⁸

- **Jirovetz L, et al (2013)**, en la investigación “Actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Salvia lavandulifolia*, *Salvia officinalis* y *Salvia sclarea* contra diversas especies de *Candida* patógena”, se demostró que la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *salvia* depende de su composición química. La mejor actividad antifúngica posee el aceite esencial de *Salvia lavandulifolia*, seguido por los aceites esenciales de *Salvia sclarea* y *Salvia officinalis*. Se encontró que la cepa *Candida albicans* responsable de las infecciones orofaríngeas era la más resistente, mientras que las cepas *Candida albicans* ATCC 10231 y *Candida albicans* responsables de las infecciones cutáneas fueron evaluadas como las más susceptibles.¹⁹
- **Córdova I, et al (2016)**, en el estudio “Actividad antibacteriana y antifúngica del extracto de *Salvia apiana* frente a microorganismos de importancia clínica”, se evaluó el efecto antibacteriano y antifúngico del extracto hexánico proveniente de la raíz de *Salvia apiana*. Los extractos de salvia a las concentraciones de 27; 13,5; 6,8 y 3,4 mg/mL causaron inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterococcus faecalis* y *Candida albicans*. Sin embargo, no presentaron efecto significativo sobre *Escherichia coli* y *Candida tropicalis* al compararse con los valores del vehículo en las valoraciones de difusión en pozo. Se demostró que *Salvia apiana* tiene un efecto antimicrobiano significativo sobre patógenos de gran importancia clínica,

lo que abre el campo para continuar evaluando a esta lamiácea en vistas a su posible empleo en el futuro como un agente terapéutico.⁹

- **Kalembe D, Kunicka A (2003)**, en el estudio “Las propiedades antibacterianas y antifúngicas de aceites esenciales”, mencionan que los aceites esenciales, productos olorosos y volátiles del metabolismo secundario de las plantas, tienen una amplia aplicación en la medicina popular, aroma y conservación de alimentos, así como en las industrias de fragancia. Las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se conocen desde hace muchos siglos. En los últimos años (1987 - 2001), un gran número de aceites esenciales y sus componentes han sido investigados por sus propiedades antimicrobianas contra algunas bacterias y hongos en más de 500 informes. Este artículo revisa los métodos clásicos de uso común para la evaluación de los aceites esenciales antibacterianos y antifúngicos actividades. Se describe el método de difusión en agar (disco de papel) y el método de dilución (agar y caldo líquido), así como el seguimiento turbidimétrico e impedimétrico de crecimiento de microorganismos en presencia de aceites esenciales probados. Se muestra que existen factores que influyen en la actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales y los mecanismos de acción aceites esenciales en microorganismos. Este documento ofrece una visión general sobre la susceptibilidad de las bacterias humanas y transmitidas por los alimentos y hongos hacia los diferentes aceites esenciales y sus componentes. Se encontraron los aceites esenciales de

especias y hierbas (tomillo, de orégano, menta, canela, salvia y clavo) que poseen las propiedades antimicrobianas más fuertes entre muchos probados.²⁰

- **Lambert R, et al (2001)**, en el estudio “Concentración mínima inhibitoria y modo de acción del aceite esencial de orégano, timol y carvacrol”, evaluaron la concentración mínima inhibitoria (MIC) de aceite de orégano esencial (OEO) y dos de sus principales componentes, es decir, timol y carvacrol contra *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. También se investigó el mecanismo de acción de carvacrol y timol, concluyendo que la mezcla de estos componentes en cantidades adecuadas, puede ejercer la inhibición total. Dicha inhibición es debido a los daños en la integridad de membrana, que afecta la homeostasis, pH y el equilibrio de iones inorgánicos.²¹
- **Conner D, et al (1984)**, en el estudio “Efectos de aceites esenciales de plantas en el deterioro del crecimiento de las levaduras”, señalaron que carvacrol disminuye la actividad respiratoria de *Saccharomyces cerevisiae*. Por otro lado, señalaron que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en levaduras se debe al daño ocasionado a algunos sistemas enzimáticos involucrados con la producción de la energía y síntesis de componentes estructurales. Algunos compuestos fenólicos cruzan la membrana citoplasmática e interaccionan con proteínas y enzimas de membrana, causando un flujo opuesto de protones afectando la actividad celular.⁸

- **Cui H, et al (2015)**, en el estudio “Actividad antimicrobiana y mecanismos del aceite esencial de *Salvia sclarea*”, el aceite esencial de *Salvia sclarea* daña la membrana celular y cambia la permeabilidad de la membrana celular, llevando a la liberación de citoplasma, sustancias macromoleculares, ATP y ADN. En general, la acción antimicrobiana del aceite esencial de *Salvia sclarea* no sólo es atribuible a una vía única, sino que también implica una serie de eventos tanto en la superficie celular como dentro del citoplasma. Por lo tanto, es necesario hacer más experimentos para comprender completamente el mecanismo antimicrobiano del aceite esencial de *Salvia sclarea*.¹¹
- **Ortega T, Carretero E y Villar A (2002)**, en su estudio “Salvia. Fitoquímica, farmacología y terapéutica”, encontraron que a la Salvia le han sido atribuidas numerosas actividades farmacológicas en la medicina tradicional, la presencia de un elevado número de compuestos terpénicos le confiere una importante actividad antiséptica. El aceite esencial posee actividad antimicrobiana (frente a *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, distintas especies de *Salmonella*, *Klesbiella*, *Bacillus subtilis*) y antifúngica (*Candida*, *Torulopsis* y *Cryptococcus*).²⁹

2.2. Generalidades de los hongos

Los hongos son un grupo diverso y ampliamente diseminado de eucariotas, los cuales no contienen clorofila y la mayoría de las especies forman una pared celular rígida constituida por polisacáridos. Son organismos quimiorganotrofos que viven en ambientes bastante diversos. Algunos son

acuáticos, principalmente de agua dulce, aunque se conocen unas pocas especies de hongos marinos. La mayoría de los hongos tienen hábitat terrestre, viven en el suelo o sobre materia vegetal muerta y juegan un papel primordial en la mineralización del carbono orgánico. Muchos hongos son parásitos de plantas y unos pocos son parásitos del hombre y de los animales. Existen hongos filamentosos (multicelulares), denominados setas y mohos, y hongos unicelulares. ^{10,24,36,37}

2.2.1. Estructura micótica.

Las células micóticas tienen características típicas de eucariotas, lo que incluye la presencia de un núcleo con un nucléolo, membrana nuclear y cromosomas lineales (figura 1). El citoplasma contiene un citoesqueleto con microfilamentos de actina y microtúbulos que contienen tubulina. También cuentan con ribosomas y organelos, como las mitocondrias, retículo endoplásmico y aparato de golgi. Las células micóticas tienen una pared celular rígida externa a la membrana citoplásmica, cuya constitución química difiere de la observada en plantas y bacterias. ³⁷

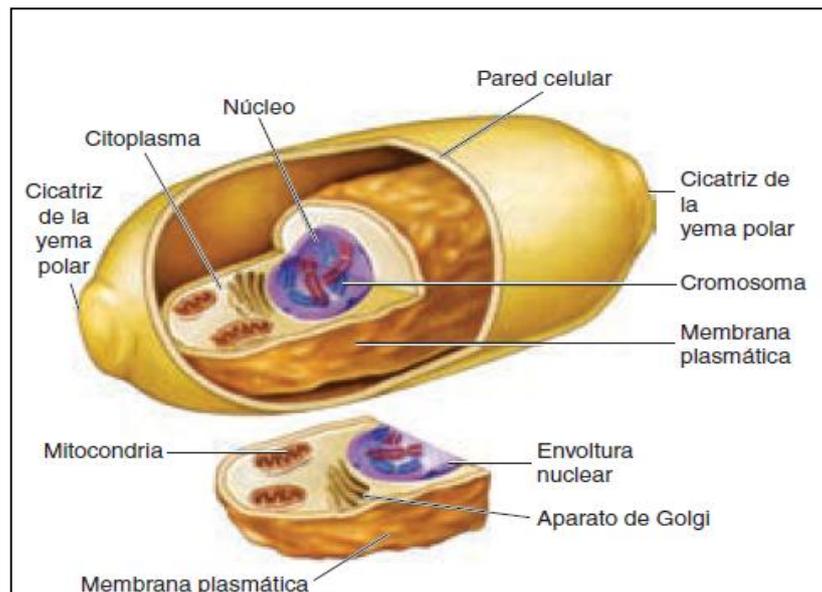


Figura 1: Célula micótica eucariota

Fuente: Ryan K, Ray G. Naturaleza de los hongos. En: Ryan K, Ray G, editores. Sherris Microbiología Médica. 5ª ed. Santa Fe: McGraw - Hill Interamericana; 2011: pp. 527 – 34.³⁴

Una diferencia importante con las células de mamíferos es que las membranas citoplásmicas están constituidas por esteroides. En hongos, el esteroide dominante es el ergosterol, en tanto que en células de mamíferos es el colesterol.³⁴

Los hongos por lo común se encuentran en un estado haploide, aunque se forma un núcleo diploide a través de fusión nuclear en el proceso de reproducción sexual.³⁴

La estructura química de la pared celular en los hongos es notablemente diferente de la observada en células bacterianas porque no contiene peptidoglucano, glicerol, ácido teicoico de ribitol o lipopolisacáridos. En su lugar, los polisacáridos manano, glucanos y quitina se encuentran en estrecha asociación unos con otros y con

proteínas estructurales (figura 2). Las manoproteínas son polímeros de manosa (manano) que se encuentran en la superficie de la matriz estructural de la pared celular unidas a proteínas. Son los principales determinantes de la especificidad serológica por las variaciones en la composición y uniones de las cadenas laterales de polímeros. Los glucanos son polímeros de glucosilo, algunos de los cuales forman fibrillas que incrementan la fuerza de la pared de las células micóticas, a menudo en estrecha asociación con quitina. La quitina está compuesta de cadenas largas, no ramificadas, de poli-N-acetilglucosamina. Es inerte, insoluble y rígida y proporciona sostén estructural en una forma análoga a la quitina en los caparazones de los cangrejos o en la celulosa de las plantas. Es el principal componente de la pared celular de hongos filamentosos. En las levaduras, la quitina parece ser de la mayor importancia en la formación de tabiques cruzados y conductos a través de los cuales pasa el núcleo de la célula madre a la célula hija durante la división celular.³⁴

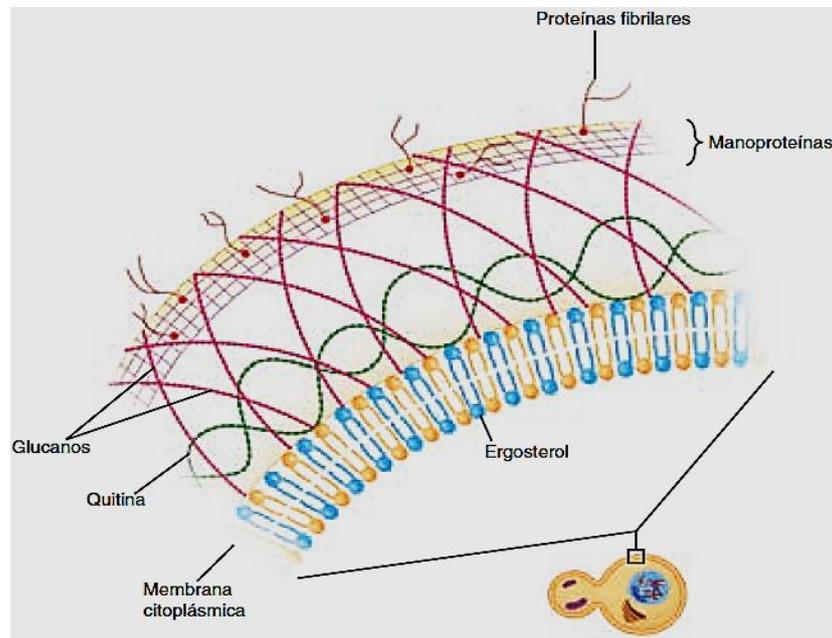


Figura 2: Pared celular de un hongo

Fuente: Ryan K, Ray G. Naturaleza de los hongos. En: Ryan K, Ray G, editores. Sherris Microbiología Médica. 5ª ed. Santa Fe: McGraw - Hill Interamericana; 2011: pp. 527 – 34. ³⁴

2.2.2. Metabolismo micótico.

El metabolismo de los hongos es heterótrofo, pues degradan sustratos orgánicos como fuente exógena de carbono. La diversidad metabólica es grande, pero la mayor parte de los hongos crecen sólo con fuentes de carbono orgánico y amonio o iones nitrato como fuente de nitrógeno. En esencia, los nutrientes para los hongos de vida libre se derivan de la descomposición de la materia orgánica. Una diferencia fundamental entre hongos y plantas, es que los hongos carecen de cloroplastos y de mecanismos fotosintéticos productores de energía. ³⁴

En su mayor parte son aerobios estrictos, aunque algunos pueden crecer en condiciones anaerobias. Sólo unos pocos son anaerobios, ninguno de los cuales es patógeno para los seres humanos.³⁴

2.2.3. Reproducción micótica.

Los hongos pueden reproducirse por procesos sexuales o asexuales. La forma asexual se denomina anamorfa y su elemento reproductor se llama conidia. La forma sexual se denomina teleomorfa y las estructuras de reproducción se denominan esporas (p. ej., ascosporas, zigosporas, basidiosporas).³⁴

La reproducción asexual incluye la división mitótica del núcleo haploide con la producción asociada de conidias con forma de esporas por gemación o la separación de elementos de las hifas. En la reproducción sexual, los núcleos haploides de las células donadoras y receptoras se fusionan para formar un núcleo diploide, el cual se divide por meiosis clásica. Algunos de los cuatro núcleos haploides resultantes pueden ser recombinantes genéticos y pueden sufrir división adicional por mitosis. Los estudios detallados de este proceso en hongos como *Neurospora crassa* han sido importantes para comprender los mecanismos genéticos celulares básicos.³⁴

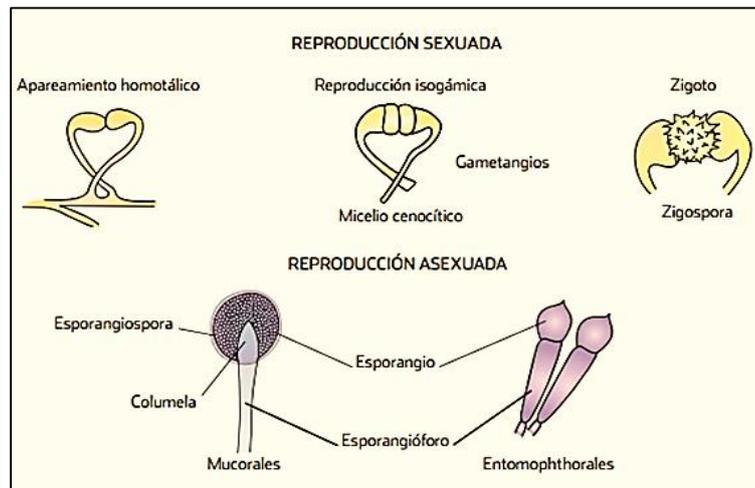


Figura 3: Esquema de la reproducción sexual y asexual en zigomicotina.

Fuente: Ryan K, Ray G. Naturaleza de los hongos. En: Ryan K, Ray G, editores. Sherris Microbiología Médica. 5ª ed. Santa Fe: McGraw - Hill Interamericana; 2011: pp. 527 – 34.³⁴

2.2.4. Morfología y crecimiento micótico

El tamaño de los hongos varía en forma notable. Una sola célula sin tabiques transversos puede variar desde el tamaño de una bacteria (2 a 4 μm) hasta una estructura visible a simple vista. La morfología de crecimiento varía desde las colonias que en forma superficial tienen un aspecto similar al de las bacterias hasta algunas de naturaleza más compleja, multicelulares, muy coloridas y de gran belleza. Los hongos pueden considerarse como una organización compleja de células que muestran diferenciación estructural.³⁴

- **Levaduras y mohos**

El crecimiento inicial desde una sola célula puede seguir uno de los diferentes cursos, levaduras o mohos (figura 4).

La primera y la forma más simple es la formación de una yema, que se origina de un progenitor redondeado u oblongo, que se contrae y forma una nueva célula, la cual se separa de la célula progenitora. Estas yemas se denominan blastoconidias, y los hongos que se reproducen de esta forma se conocen como levaduras. En los medios de cultivo en placa, las levaduras forman colonias similares a las de las bacterias. En líquidos son mucho más transportables que los mohos por su naturaleza unicelular.¹⁶

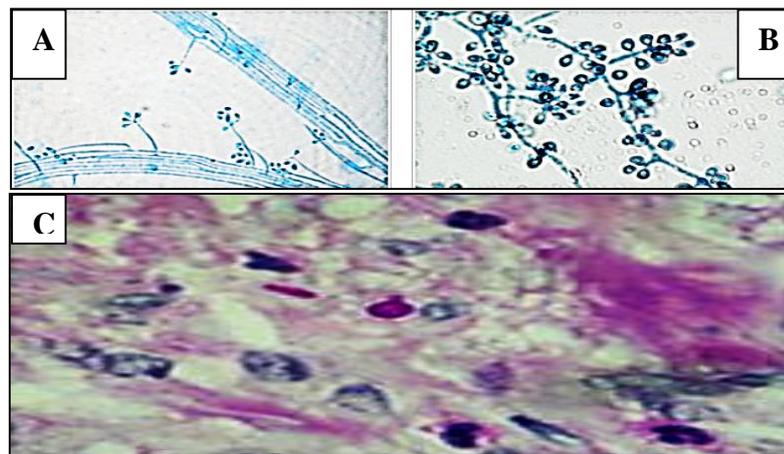
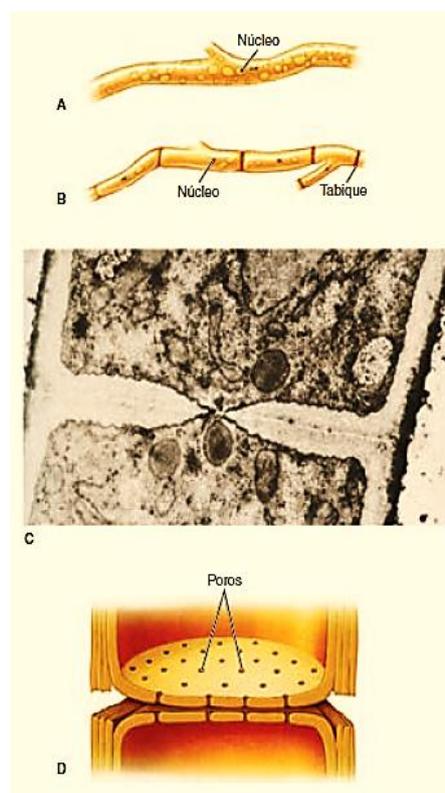


Figura 4: Forma levaduriforme y filamentosas de *Sporothrix schenckii*

Examen microscópico de *Sporothrix schenckii* en donde se observa **A)** Hifas finas, conidióforos largos y conidios simpodiales organizados en forma de flor de margarita. **B)** Conidios triangulares hialinos - pigmentación, naciendo directamente de la hifa o de conidióforo. **C)** *Sporothrix schenckii*. Corte histológico de un paciente. Se aprecian levaduras alargadas (forma de cigarro) y otras redondas u ovales.

Fuente: Hernández F. Esporotricosis. [sede Web]. Ciudad de México: Hernández F; 2015.¹⁷

Los hongos también pueden crecer a través del desarrollo de hifas, que son extensiones de forma tubular de la célula con paredes gruesas y paralelas. Conforme se extienden las hifas, forman una masa entrelazada conocida como micelio. La mayor parte de los hongos forma tabiques en las hifas, que cruzan las paredes en forma perpendicular a la pared celular y dividen a las hifas en subunidades (figura 5). Estos tabiques varían entre las especies y pueden contener poros y paredes incompletas que permiten el movimiento de nutrientes, organelos y del núcleo. ¹⁶



A. Hifa no tabicada con múltiples núcleos. B. Hifas tabicadas que dividen el núcleo en células separadas. C. Micrografía electrónica del tabique con un poro. D. Tabique con múltiples poros.

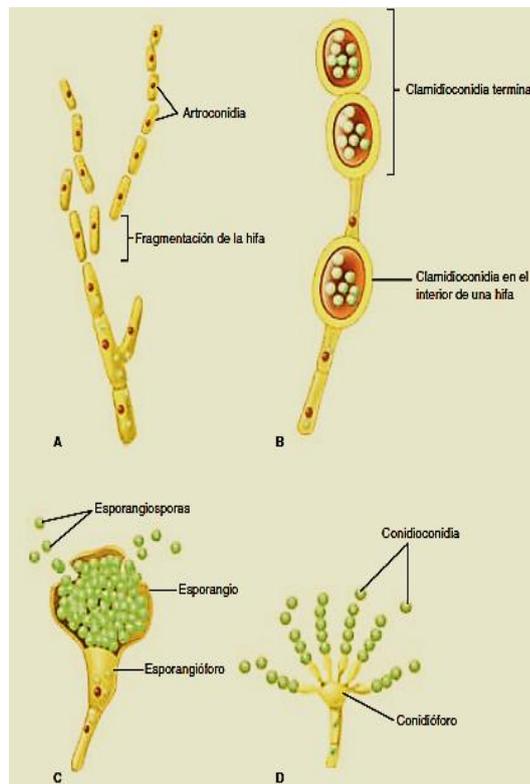
Figura 5: Formas de crecimiento de hongos en levadura y mohos

Fuente: Ryan K, Ray G. Naturaleza de los hongos. En: Ryan K, Ray G, editores. Sherris Microbiología Médica. 5ª ed. Santa Fe: McGraw - Hill Interamericana; 2011: pp. 527. ³⁴

Algunas especies no forman tabiques; forman hifas y micelios como una célula única y continua. En las hifas tabicadas y no tabicadas se observan múltiples núcleos, con flujo libre de citoplasma a lo largo de las hifas o entre éstas, a través de poros en los tabiques. Una porción del micelio (micelio vegetativo) por lo común crece en un medio de cultivo o en un sustrato orgánico (p. ej., subsuelo) y actúa como raíz de las plantas (recolector de nutrientes y de humedad). La superficie más visible de crecimiento puede asumir un aspecto esponjoso conforme el micelio se vuelve aéreo. Las paredes de la hifa son lo suficientemente rígidas para dar sostén a esta red extensa y entrelazada, que por lo común se denomina moho. Las hifas aéreas portan las estructuras reproductoras de esta clase de hongos. Algunos hongos forman estructuras denominadas pseudohifas, que difieren de las hifas verdaderas porque tienen zonas de constricción con aspecto similar a una yema y con paredes celulares menos rígidas.³⁴

Las conidias reproductivas, esporas de los mohos y estructuras que las portan asumen una gran variedad de tamaños, formas y relaciones con la hifa progenitora. La morfología y desarrollo de estas estructuras son la base primaria para la identificación de mohos de importancia médica. La estructura del micelio participa en la identificación, dependiendo de si las hifas son tabicadas o no, pero las diferencias no son lo bastante distintivas para identificar o incluso sugerir una especie o género de hongo.³⁴

Las conidias formadas de manera exógena pueden originarse directamente de la hifa o de una estructura especial en forma de tallo, el conidióforo. En ocasiones se utilizan términos como macroconidia y microconidia para indicar el tamaño y complejidad de éstas. Las conidias que se desarrollan en el interior de la hifa se denominan clamidoconidia o arthroconidia. Las clamidoconidias se vuelven más grandes que la hifa misma; son estructuras redondeadas, de pared gruesa, que pueden ubicarse en el extremo terminal de la hifa o en su trayecto. Las arthroconidias adquieren la forma y tamaño de unidades de hifa, pero se encuentran engrosadas o diferenciadas de alguna otra manera. Las arthroconidias pueden formar un grupo de conidias delicadamente unidas que se separan y diseminan cuando se agitan. Algunas de las formas reproductoras asexuales se ilustran en la figura 6. La espora sexual más común se conoce como ascospora. En el asca, estructura en forma de saco, pueden encontrarse cuatro u ocho ascosporas.³⁴



A. Las artroconidias se desarrollan en el interior de la hifa y finalmente se rompen. **B.** Las clamidioconidias son más grandes que las hifas y se desarrollan en la célula o en sus extremos. **C.** Las esporangioconidias se originan en el saco terminal en un esporangio. **D.** Las conidias simples se originan directamente de un conidióforo.

Figura 6: Formas asexuales de mohos.

Fuente: Ryan K, Ray G. Naturaleza de los hongos. En: Ryan K, Ray G, editores. Sherris Microbiología Médica. 5ª ed. Santa Fe: McGraw - Hill Interamericana; 2011: pp. 527 – 34.³⁴

- **Dimorfismo**

En general, los hongos crecen como levaduras o mohos; estos últimos constituyen la mayor diversidad. Algunas especies pueden crecer ya sea como levadura o en fase de moho, lo que depende de las condiciones ambientales. A éstos se les conoce como hongos dimórficos. Varios patógenos para los humanos muestran dimorfismo; crecen en forma de moho en el medio ambiente y en medios de cultivo a temperatura ambiental, pero se convierten en levaduras o en alguna otra forma en tejidos

infectados. En la mayor parte de los casos, es posible manipular las condiciones de cultivo para que se presenten in vitro las fases de levadura y moho. La fase de levadura requiere condiciones similares a las que se encuentran en condiciones fisiológicas in vivo, por ejemplo, incubación de 35 a 37 °C en un medio enriquecido. El crecimiento en forma de moho requiere nutrientes mínimos y temperatura ambiental. Las conidias producidas en fase de moho pueden ser infecciosas y sirven para diseminar el hongo.³⁴

Los eventos fisiológicos y morfológicos relacionados con la conversión de moho a la fase de levadura se han estudiado ampliamente en el hongo patógeno para humanos, *Histoplasma capsulatum*, el cual es un hongo complejo dado el cambio espectacular en el entorno en que se ha encontrado al hongo cuando las conidias de moho flotan desde la tierra (su hábitat) hasta los alvéolos pulmonares. La conversión a fase de levadura se desencadena con la temperatura del hospedador (37 °C) y tal vez por otros aspectos del nuevo medio ambiente. Estudios in vivo muestran que los eventos iniciales en esta modificación de moho a levadura incluyen la inducción de una respuesta de golpe de calor y desacoplamiento de la fosforilación oxidativa. Esto se continúa con la interrupción en la síntesis de RNA, síntesis de proteínas y metabolismo respiratorio. Las células pasan a través

de un estado de inactividad metabólica e incrementan su capacidad enzimática que incluye compuestos sulfhidrido (ej., cisteína, cistina) que son exclusivos de la etapa de levadura.³⁴

En la etapa de levadura se recupera la actividad mitocondrial y la capacidad de síntesis y se presenta un nuevo grupo de oxidasas, polimerasas, proteínas, glucanos de pared celular y otros compuestos. En conjunto, se expresan más de 500 genes en las fases de mohó y levadura. Un gen global regulador controla el proceso de transformación de mohó a levadura y la expresión de algunos genes de virulencia.³⁴

2.3. *Sporothrix schenckii*

Sporothrix schenckii es un hongo dimórfico que crece como una levadura cilíndrica de 3 a 5 mm en tejidos y en cultivo a 37 °C. El mohó, que crece en cultivo a 25 °C, probablemente es la forma infecciosa. Las hifas son delgadas y tabicadas y producen grupos de conidias en el extremo de conidióforos delicados. *Sporothrix schenckii* es capaz de sintetizar melanina, la cual está presente en las conidias, durante muchos años ha sido considerada como la única especie responsable de esporotricosis, infección subaguda o crónica que afecta a la dermis y al tejido celular subcutáneo y con una distribución mundial. Dicha especie ha sido extensamente estudiada y recientemente se ha demostrado que representa un complejo de especies, siendo las más comunes *Sporothrix schenckii* sensu stricto, *Sporothrix*

globosa y *Sporothrix brasiliensis*, aunque otras especies tales como *Sporothrix mexicana* y *Sporothrix luriei* han sido también descritas. Aunque hacen falta más estudios, los datos disponibles parecen indicar que las nuevas especies del género presentan diferentes distribuciones geográficas; por ejemplo, *Sporothrix brasiliensis* se ha localizado casi exclusivamente en Brasil, mientras que *Sporothrix globosa* presenta una distribución cosmopolita y es de destacar que la mayoría de cepas aisladas de la India pertenecen a esta última especie. Solo la correcta identificación de estas nuevas especies, mediante secuenciación o por técnicas fisiológicas, nos permitirá dilucidar si las diferentes manifestaciones clínicas de esporotricosis son producidas por especies diferentes. Hasta la fecha se ha demostrado que las diferentes especies que integran el complejo presentan diferente sensibilidad a los antifúngicos.^{15,27,39}

2.3.1. Clasificación científica.³

- **Reino:** Fungi
- **División:** Eumycota
- **Sub-división:** Deuteromycotina
- **Clase:** Hyphomycete
- **Familia:** Ophiostomataceae
- **Orden:** Saccharomycetales
- **Género:** *Sporothrix*
- **Especie:** *schenckii*

2.3.2. Epidemiología

La esporotricosis es una enfermedad cosmopolita, se observa tanto en países templados como tropicales. Se ha observado en Norteamérica, Sudamérica, América Central, África del Sur, Egipto, Japón y Australia. Los países con la tasa de infección más alta son México, Brasil, Perú y Sudáfrica. En el Perú es frecuente en Cusco (Quillabamba y Mollepata), Puno (Sandia), Ayacucho (Cangallo, Huanta y La Mar), Apurímac (Tamburso, Abancay y Andahuaylas), La Libertad (Santiago de Chuco y Otuzco), Ancash (Chaquistambo, Pomabamba, Huari y Chiquián), Lima, Cajamarca (San Ignacio, San Miguel, San Marcos), Amazonas (Chachapoyas) y Huánuco (Monzón).^{34,39}

2.3.3. Inmunidad

Algunos estudios indican que la exposición a *Sporothrix schenckii* es bastante común y que existe un alto nivel de inmunidad innata. La respuesta celular a la infección es mixta. El incremento en la frecuencia y gravedad de la enfermedad diseminada en pacientes con trastornos de los linfocitos T apunta a respuestas TH1 como el mecanismo inmunitario primario. Los anticuerpos no participan en la respuesta inmunitaria.³⁴

2.3.4. Patogénesis

El *Sporothrix schenckii* frecuentemente llega al hombre penetrando en la piel a través de una herida, por una espina, astilla, alambre, piedra, arañazo de un gato u otro objeto punzante contaminado, produciendo un chancro esporotricósico, aproximadamente 10 días (3 – 30 días) después de la inoculación traumática.³⁵

Las conidias y las células de levadura de *Sporothrix schenckii* son capaces de unirse a la matriz de proteínas extracelulares, como la fibronectina, laminina y colágeno.³⁵

Dependiendo de la respuesta inmune del huésped, se propaga lentamente a lo largo de los vasos linfáticos que drena la zona, siguiendo el trayecto de la cadena linfática desarrollando lesiones cutáneas secundarias, dando lesiones nodulares gomosas y placas verrucosas crónicas. En pacientes inmunocomprometidos la enfermedad puede diseminarse a otros órganos, produciendo enfermedad cutánea diseminada y sistémica.³⁵

En casos raros la inhalación del hongo puede ocasionar esporotricosis pulmonar, el cual sigue un curso similar al de la tuberculosis, causa una neumopatía primaria, autolimitada y asintomática que ocasiona una hipersensibilidad específica; o es posible que origine una neuropatía limitada y progresiva con posible diseminación hematógena.³⁵

Tabla 1: Clasificación inmunológica de la esporotricosis

I. Normoérgica O Hiperérgica (Esporotricina positiva)
1. Cutáneo linfática
2. Cutáneo fija
3. Pulmonar localizada
4. Mucocutánea
II. Anérgica O Hipoérgica (Esporotricina negativo)
1. Cutáneo superficial cutáneo hematógena
2. Osteoarticular
3. Pulmonar
4. Sistémica

Fuente: Sánchez L, Galarza C, Matos R. Infecciones micóticas subcutáneas. Rev. Dermatología Peruana. [Revista en internet]. 2009; 19 (4): 362 – 87.³⁵

La esporotricosis es una infección muy polimorfa, dependiendo de la respuesta inmune del huésped. De acuerdo con la respuesta inmunológica del huésped reflejada en la intradermorreacción con la esporotricina y parámetros clínicos podemos clasificarla según las tablas 1 y 2.³⁵

2.3.5. Signos clínicos

Las manifestaciones clínicas varían ampliamente dependiendo de las distintas formas clínicas de presentación. (Tabla 2).

Tabla 2: Clasificación clínica de la esporotricosis

I. Esporotricosis cutánea.
a. Cutáneo linfática
b. Cutáneo fija
II. Esporotricosis diseminada
a. Esporotricosis cutánea diseminada
b. Esporotricosis sistémica
III. Esporotricosis extracutánea
a. Esporotricosis ósea
b. Esporotricosis articular
c. Esporotricosis de otros órganos

Fuente: Sánchez L, Galarza C, Matos R. Infecciones micóticas subcutáneas. Rev. Dermatología Peruana. [Revista en internet]. 2009; 19 (4): 362 – 87.³⁵

La esporotricosis cutánea linfática, es la forma clásica y frecuente de esta enfermedad, se inicia como una pápula o nódulo subcutáneo pequeño, no doloroso, duro y móvil en el lugar de una herida, posteriormente al cabo de una semana o varios meses después se ulcera, formando el llamado «chancro esporotricósico». (Figura 7).³⁵



Chancro esporotricósico. Se observa nódulo ulcerado en la muñeca izquierda y otra en el dorso de la nariz

Figura 7: Formas asexuales de mohos.

Fuente: Sánchez L, Galarza C, Matos R. Infecciones micóticas subcutáneas. Rev. Dermatología Peruana. [Revista en internet]. 2009; 19 (4): 362 – 87.³⁵

Luego aparecen otras nodulaciones siguiendo el trayecto linfático de la zona afectada, algunas veces acompañada de linfangitis. (Figuras 8 y 9). Estos nódulos se hacen fluctuantes llegando a drenar material purulento al exterior.³⁵



Figura 8: Esporotricosis. Nódulos y placas costrosas confluyentes de trayecto linfático, extendiéndose en el miembro inferior.

Fuente: Sánchez L, Galarza C, Matos R. Infecciones micóticas subcutáneas. Rev. Dermatología Peruana. [Revista en internet]. 2009; 19 (4): 362 – 87.³⁵



Figura 9: Esporotricosis. Lesiones nodulares, ulceradas que siguen el trayecto de los linfáticos localizados en los miembros inferiores y superiores.

Fuente: Sánchez L, Galarza C, Matos R. Infecciones micóticas subcutáneas. Rev. Dermatología Peruana. [Revista en internet]. 2009; 19 (4): 362 – 87.³⁵

Por contigüidad pueden ocasionar placas verrucosas crónicas (Figura 10). La localización más frecuente es en las extremidades superiores e inferiores, iniciándose casi siempre en manos y pies, aunque pueden presentarse en cualquier lugar.³⁵



Figura 10: Esporotricosis. Placas verrucosas crónicas a nivel del tobillo izquierdo

Fuente: Sánchez L, Galarza C, Matos R. Infecciones micóticas subcutáneas. Rev. Dermatología Peruana. [Revista en internet]. 2009; 19 (4): 362 – 87.³⁵

En los niños es también habitual la localización facial. Existe una denominada «esporotricosis gomosa» que se caracteriza por el desarrollo de múltiples ulceraciones bien definidas, en muñecas, piernas o antebrazos.³⁵

La forma de esporotricosis cutánea fija, está confinada al área de inoculación. Consiste en una lesión única, es una forma crónica que no tiende a la diseminación y se forma del mismo chancro esporotricósico. Se inicia como una pápula eritematosa y puede adoptar cualquiera de las siguientes formas clínicas: ulcerativa, verrucosa o vegetante, papulosa, psoriasiforme, acneiforme,

infiltrativas, en placas eritematosas o cicatriciales, cubiertas con escamas y costras melicéricas, generalmente asintomáticas. La esporotricosis cutánea fija por lo general no presenta compromiso ganglionar y es limitada porque el paciente cursa con una buena respuesta inmune, por lo que tiene gran tendencia a la curación espontánea.³⁵

La forma de esporotricosis mucocutánea es más frecuente en niños y se localiza con más frecuencia en la cara, cuello, tronco y manos. Consiste en lesiones eritematosas ulcerativas y supurativas, que eventualmente llegan a formas granulomatosas, vegetantes o papilomatosas, localizadas en mucosas orofaríngea y nasal.^{34,37}

La esporotricosis cutánea superficial, para algunos, es una variedad de la esporotricosis cutánea fija y la denominan superficial dermo-epidérmica o escrofulosa. Está constituida por placas eritemato-escamosas, violáceas y pruriginosas; se presenta en la cara y avanza lentamente sin afectar los linfáticos. La mayoría de los casos son inmunológicamente hipoérgicos o anérgicos (nula reacción del sistema inmunológico), contrario a la esporotricosis cutánea fija que tiene buena respuesta a la intradermorreacción con esporotricina.³⁴

Las formas diseminadas de esporotricosis se producen por diseminación hematógena, quizá de un foco pulmonar o cutáneo

preexistente. Existen dos formas de manifestación de esporotricosis diseminada:³⁵

- Esporotricosis cutánea diseminada
- Esporotricosis sistémica

La esporotricosis cutánea diseminada o llamada también esporotricosis cutánea hematógena, es una variedad rara de esporotricosis, suele ser considerada una infección oportunista porque casi siempre viene asociada a un estado anérgico, frecuentemente una enfermedad que compromete la inmunidad celular, las más frecuentes: diabetes, linfomas, embarazo, SIDA, tratamiento con corticoides sistémicos, alcoholismo y otros. Afecta diferentes regiones del tegumento, sin afectar los órganos extracutáneos. Las lesiones cutáneas consisten en nódulos gomosos, úlceras y placas verrucosas que afectan a la piel y mucosas (boca, faringe y glande). No hay tendencia a la curación y tiene por lo general mal pronóstico. Esta variedad de esporotricosis tiene tendencia a diseminarse a huesos, articulaciones (codos y rodillas) y otros órganos, incluido el sistema nervioso central.³⁵

La esporotricosis sistémica diseminada se considera una infección oportunista grave, afecta órganos internos y puede haber fungemia (presencia de hongos en la sangre). Se observa con mayor frecuencia en alcohólicos crónicos, en pacientes que reciben tratamiento prolongado con inmunosupresores o SIDA. Los pacientes suelen

presentar fiebre, dolor, malestar general y pérdida de peso. En algunos pacientes se ha observado afectación del sistema nervioso central, genitourinario, digestivo, hepático, bazo, páncreas, senos paranasales, testículos y la tiroides.³⁵

La esporotricosis pulmonar, se considera una entidad rara, el hongo penetra por la vía aérea. Se presenta en dos formas; la más común es la forma crónica, siendo en la mayoría de pacientes asintomáticos, de presentación autolimitada con zonas cavitarias semejantes a la tuberculosis. La segunda forma es aguda y progresiva, involucra a los ganglios linfáticos hiliares y en especial traqueobronquiales, pudiendo presentar adenopatías masivas con obstrucción de los bronquios. La sintomatología es variada, con pérdida de peso, tos con expectoración abundante, disnea y fatiga. En ambas formas la diseminación a otros órganos es frecuente.³⁵

2.3.6. Diagnóstico

El diagnóstico se basa en las manifestaciones clínicas, la epidemiología y datos de laboratorio. El método estándar para el diagnóstico laboratorial es el cultivo micológico. Otras técnicas complementarias son la histopatología, el examen directo, la intradermoreacción e Inmunofluorescencia.³⁵

- Diagnóstico por laboratorio

Materiales y toma de muestra: las muestras que se pueden recibir en el laboratorio son pus o escamas de lesiones cutáneas. Antes de tomar la muestra, se limpia la piel con una torunda impregnada con alcohol al 70%, para quitar las bacterias contaminantes de la superficie cutánea. Las escamas se toman con bisturí y se recuperan en una caja Petri o portaobjetos limpios, que se coloca debajo del área afectada; en el segundo caso, se recubren con otro portaobjetos. Las lesiones exudativas se toman con hisopo estéril y humedecido, colocándolo dentro de un tubo de ensayo. Es importante destacar que el material purulento que surge a la digitopresión temprana debe ser descartado, luego de lo cual se procederá a un lavado con solución fisiológica y subsecuentemente se pasará a comprimir nuevamente las lesiones para obtener pus mezclado con exudado serosanguinolento, el cual proviene de los granulomas más profundos.³⁵

Transporte de las muestras: las muestras deben ser transportadas y procesadas rápidamente en el laboratorio.³⁵

- Exámenes directos

Rara vez se logra visualizar, al teñir con Gram o ácido peryódico de Schiff (PAS), las levaduras alargadas con forma de habano intracelulares, en el caso de la esporotricosis son encontradas principalmente en las etapas más tempranas de la infección. Con

más frecuencia están presentes, los cuerpos asteroides, imágenes esféricas de 3 a 6 milímetros, con una sustancia glicoproteica eosinofílica radiada. Los mismos son interpretados como resultado de la relación entre el huésped y el hongo, con producción de un complejo antígeno - anticuerpo. Si bien no son exclusivos de la esporotricosis, su presencia junto con la clínica compatible permite tener un alto índice de sospecha.³⁵

- **Cultivos**

El diagnóstico de certeza se basa en mostrar al agente mediante el cultivo. Todo el complejo *Sporothrix* está compuesto por hongos dimórficos:³⁵

- En medios agar Sabouraud dextrosa a 25 - 28 °C producen colonias filamentosas de color blanco o cremoso que a los pocos días toman color marrón claro o negro y en las que microscópicamente se observan micelios delgados, hialinos, septados y ramificados o en haces. En el caso del *Sporothrix schenckii* las conidias se disponen en flor de durazno (simpodiales) agrupadas sobre un talluelo o conidióforo en ángulo recto o bien pueden ser ovoides y sésiles solitarias conformando radulosporas.³⁵
- En medios ricos de agar gelosa sangre y chocolate a 37 °C dan colonias cremosas, húmedas y blanquecinas de aspecto

bacteriano. Microscópicamente se ven las levaduras o blastoconidias, ovales o globosas con brotes múltiples.³⁵

- **Biopsia**

En la mayoría de los pacientes el hongo no es detectado en los tejidos cutáneos, aun cuando se utilizan tinciones especiales como PAS, Gridley o metenamina de plata. Debe sospecharse de esporotricosis en presencia de hiperplasia pseudoepiteliomatosa y reacción granulomatosa epitelioides – piogénica. Cuando la biopsia se toma de un nódulo o goma, el infiltrado se dispone de una manera clásica: una zona periférica o sifiloide, constituida por plasmocitos, linfocitos, fibroblastos y acentuada neoformación vascular; una zona media o tuberculoide, formada por células epitelioides y algunas células gigantes multinucleadas de tipo Langhans y de cuerpo extraño y finalmente una zona central o supurativa crónica en donde se hallan micro abscesos de polimorfonucleares. Es en esta zona central del granuloma donde pueden encontrarse los cuerpos asteroides.³⁵

- **Inmunofluorescencia**

Las técnicas de anticuerpos fluorescentes son altamente específicas en comparación con las técnicas tradicionales. Pueden utilizarse como un método rápido para la demostración de *Sporothrix schenckii*, en impronta de exudados de las lesiones.³⁵

2.3.7. Métodos antifúngicos

La necesidad de desarrollar métodos estandarizados en las pruebas de susceptibilidad a los antifúngicos fue con la idea de proveer buena concordancia entre los laboratorios y en una mayor y cuidadosa comunicación laboratorio-médico. La estandarización juega también un papel importante en la necesidad de evaluar las correlaciones de la eficacia de la droga in vivo versus in vitro.²⁶

➤ Método de macrodilución

El método de macrodilución es el más ampliamente usado y es el método de referencia para células levaduriformes y es el propuesto por el CLSI.²⁶

Este método es adecuado para probar todos los agentes antifúngicos de cualquier aislamiento fúngico.²⁶

El medio de cultivo que se utiliza, se define como un medio sintético y actualmente se está utilizando el caldo RPMI 1640 con L-glutamina y un indicador de pH sin bicarbonato de sodio. Dicho medio, es bufferizado a pH 7,0 a 25°C. Este medio es apropiado para Anfotericina B, 5-FC y azoles. Es el recomendado a emplear cuando se realiza una prueba de susceptibilidad contra especies de *Candida* y otros hongos.²⁶

En el método de macrodilución se emplea por cada combinación microorganismo/antimicrobiano una batería de tubos. Habitualmente se prepara la batería de tubos con 1mL

de medio estéril sin antimicrobiano. Al primero de ellos se añade 1 mL de la solución inicial del tubo de antimicrobiano hasta conseguir la concentración más alta a estudiar. Tras mezclar adecuadamente, se pasa 1 mL al siguiente tubo; el proceso se repite tantas veces como diluciones se quieran estudiar, eliminando del último tubo de la serie 1 mL de medio con antimicrobiano, con objeto de mantener el volumen final de 1 mL. Para cada paso de dilución se debe emplear una pipeta diferente. La serie de tubos se completa con uno de control sin antimicrobiano que solamente tiene 1 mL de caldo.^{26, 30}

➤ **Método de difusión en disco**

El método de difusión en disco consiste en depositar en la superficie de una placa de agar MH previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel de filtro impregnados con los diferentes antifúngicos, tan pronto el disco impregnado en antifúngico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antimicótico difunde por el agar, formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18 a 24 horas de incubación, los discos pueden o no aparecer rodeados por una zona de inhibición de crecimiento bacteriano.⁵

El fundamento es el mismo que para las bacterias, está basado en el estudio la sensibilidad de las levaduras a los antifúngicos en función del halo de inhibición producido por la difusión del antifúngico en un medio de cultivo sólido. Los pasos a seguir son los mismos que para las bacterias pero con algunas modificaciones.⁵

Se usa el agar Mueller Hinton (MHA) suplementado con 2% de glucosa y 0,5 µg/mL de azul de metileno (pH 7,2 - 7,4). Se puede incorporar los suplementos cuando se prepara el medio o bien incorporar los suplementos a las placas de MHA ya preparadas.⁵

La adición de glucosa proporciona un mejor crecimiento de las levaduras y el azul de metileno aumenta la definición de los halos de inhibición.⁵

Además, el medio MHA con glucosa y azul de metileno permite diferenciar mejor las cepas S y R a fluconazol, presentando buena correlación con el método de macrodilución y con los datos in vivo.⁵

➤ **Método de dilución en agar**

La cuantificación de la actividad in vitro de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante el método de dilución.³⁰

Este método se basa en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar).³⁰

En este método se incorpora el antimicrobiano a evaluar a un medio con agar. El antimicrobiano se añade cuando el medio aún está fundido. Para lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración de antimicrobiano. Las placas se inoculan con un replicador una vez que se haya solidificado el medio de cultivo.³⁰

Se realiza la dilución del antimicrobiano en un medio de cultivo adecuado para el crecimiento del microorganismo que se va a ensayar. Consiste en realizar varias concentraciones (generalmente al doble) de un antimicrobiano, cada una de ellas se mezcla con agar y se vierte en una placa Petri y se deja solidificar. Se inocula el microorganismo, se incuba a una temperatura determinada y se determina la concentración del antimicrobiano que produce la inhibición del crecimiento del microorganismo definida como CIM (Concentración Inhibitoria Mínima).³⁰

La aparición de un sistema de inoculación múltiple para placas de agar popularizó el método de dilución en agar, en el

que cada placa, con una cierta concentración de antimicrobiano, permite inocular simultáneamente un gran número de microorganismos.³⁰

Tradicionalmente este método se ha venido usando para la determinación de la CMI de los antimicrobianos. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocula dicho medio y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del microorganismo se realiza la lectura, determinando qué concentración causa la inhibición del crecimiento del microorganismo.³⁰

2.3.8. Tratamiento

- Yoduro de potasio

El yoduro de potasio es el tratamiento de elección para las formas cutáneas de esporotricosis, debido a que tiene excelente efectividad. La dosis es de 3 a 6 g/día repartidos en tres tomas, iniciándose con 1 g/día para evaluar la tolerancia. La solución se prepara de la siguiente forma: yoduro de potasio 10 g en 100 cc de agua bidestilada en frasco oscuro, de manera que 10 cc (una cucharada) es igual a 1 g. Así se puede manejar tantas cucharadas como gramos se requiera. La dosis en niños es de

1 a 3 g/día. La duración del tratamiento es hasta de 4 semanas después de la desaparición de los síntomas (promedio de 3 meses). Los efectos indeseables son: náuseas, anorexia, diarrea, sialorrea y erupción acneiforme. En general es bien tolerado.^{34,35}

- Antimicóticos sistémicos

Los tratamientos alternativos son los azoles (itraconazol, ketoconazol, fluconazol). También se han empleado griseofulvina y terbinafina como alternativas. El itraconazol a la dosis de 200 a 300 mg/día durante 4 a 6 meses es una de las mejores opciones alternativas para el tratamiento de la esporotricosis. Está indicado en pacientes que desarrollan alergia a los yoduros, respuesta lenta o fracaso terapéutico. También se recomienda el ketoconazol a dosis de 200 mg dos veces al día. En general la respuesta no es tan efectiva como la presentada con el yoduro de potasio, además se requiere tratamiento prolongado. La terbinafina a la dosis de 250 a 500 mg/día ha sido manejada con buenos resultados. Es una buena opción terapéutica, particularmente en niños.^{34,35}

Se reporta el uso del fluconazol a la dosis de 100 a 400 mg/día con remisión de las lesiones. Además la griseofulvina a dosis de 10 a 15 mg/kg (500 mg/día) ha mostrado eficacia en adultos. Requiere tratamiento prolongado de 4 a 6 meses. Generalmente no se recomienda su uso por las molestias gástricas que ocasiona.

Pacientes con SIDA requieren itraconazol en dosis de 200 mg/día durante toda su vida.^{34,35}

- **La anfotericina B**

Debe utilizarse para los casos de esporotricosis sistémica o anérgica, sobre todo cuando hay compromiso óseo, visceral o pulmonar. La dosis es de 0,7 a 1 mg/kg/día. Se inicia con 5 mg cada tres días, hasta alcanzar la dosis máxima de 30 mg. Algunos pacientes han sido tratados con 5- fluorocitosina a la dosis de 100 mg/kg/día.^{34,35}

- **Termoterapia**

La termoterapia se ha utilizado desde hace años. Los primeros reportes fueron hechos en las décadas de 1950 y 1960 por Thomas y Mackinnon. Está indicada en casos de esporotricosis cutánea limitada, preferentemente fija. Se da en forma de baños calientes, controlando la temperatura entre 42 y 45 °C, una vez al día durante 30 minutos o tres veces al día durante 15 minutos.^{34,35}

- **Sulfametoxazol - trimetoprim**

Se ha reportado buenos resultados a la dosis de 4 tab/día (400 mg sulfametoxazol y 80 mg trimetoprim) durante tres a cuatro meses.

Se ha empleado con buenos resultados en la esporotricosis cutánea osterarticular asociada a yoduro de potasio.^{34,35}

2.4. *Salvia sagittata* “salvia azul”

El término salvia proviene de la palabra latina “salvare”, que significa “curar”, en referencia a las propiedades curativas de la hierba^{18,19}

Arbusto de 1 – 1,60 m de alto, perenne de follaje aromático y glutinoso. Hojas opuestas decusadas, simples, peciolo pubescente-glutinoso 1 – 10 cm de largo, limbo sagitado, margen crenado, base sagitada, ápice agudo, superficie rugosa, glutinosa, haz y envés pubescentes.^{6,19}

Salvia sagittata llega a 7,5 pies (2,3 m) de altura en la naturaleza y 2,5 pies (0,76 m), en el cultivo. Cubierta de hojas de color verde amarillento y rugoso en la superficie superior, con la parte inferior cubierta de pelos cortos blancos y fuertemente nervados. Las inflorescencias son muy pegajosas, alcanzando hasta 2 pies (0,61 m) de largo por encima del frondoso tallo.¹⁸

Las flores (2,5 cm), son de color azul brillante, labio superior rostrado, labio inferior trilobulado, lóbulo medio desarrollado y emarginado; estambres, una teca fértil y otra estéril. Fruto tetracelular, clusas obovadas, con la superficie sinuosa ondulada.^{2,19,36}

La planta fue recogida y nombrada en 1798 por Hipólito Ruiz López y José Antonio Pavón Jiménez, dos botánicos españoles, que pasaron diez años en

el Perú y Chile en una comisión por el gobierno de España para ir al Nuevo Mundo en busca de nuevos medicamentos y plantas agrícolas.^{15,22}

Crece en laderas de poca pendiente, formaciones arbustivas de porte bajo, ribera de riachuelos.^{19,31}

Planta herbácea nativa de las montañas de los andes, que crece a elevaciones de 9 500 a 10 500 pies (2 900 a 3 200 m).¹⁸

2.4.1. Clasificación científica¹⁸

- **Nombre Científico:** *Salvia sagittata*
- **Reino:** Plantae
- **Phylum:** Magnoliophyta
- **Clase:** Magnoliopsida
- **Orden:** Lamiales
- **Familia:** Lamiaceae
- **Género:** *Salvia*
- **Epíteto específico:** *sagittata*
- **Nombre común:** salvia azul, jatun ñujchu

2.4.2. Composición química

Todas las salvias presentan una composición química compleja con abundantes metabolitos. Dentro de ello tenemos a los aceites esenciales, que se encuentran en una proporción del 1,5 al 2,0 %.

Los aceites esenciales principalmente se caracterizan por ser líquidos

oleosos de aroma agradable e intenso, por ser volátiles y extraíbles por arrastre de vapor, por ser insolubles en agua y por presentar un índice de refracción elevado.^{1,2}

El aceite esencial está compuesto por un 35 - 60% de tuyona (“alfa” y “beta” tuyona, en proporciones variables según el origen geográfico), un 20 % o más de otros monoterpenos (1,8- cineol, alcanfor, pineno, timol y carvacrol), diterpenos (carnosol, rosmanol, epirosmanol, ácido carnósico, b – D- glucósidos de tuyol y mentol), triterpenos derivados del ursano y oleanano y sesquiterpenos (humuleno, cariofileno y viridifloral).^{2,4,14}

También poseen abundantes compuestos fenólicos: flavonoides con sustituyentes sobre el C-6 y ácidos fenólicos, principalmente ácido rosmarínico.^{4,7}

La salvia posee taninos en abundancia como la luteolina, apigenina y la hispidulina, además de alcaloides, esteroides y saponinas. Estos se encuentran principalmente concentrados en las hojas y en las flores de la planta. Estas sustancias son las responsables de varias propiedades medicinales que tiene la salvia, entre ellas antioxidante, anticanceroso, emenagogo y antimicrobiano.^{4, 14}

2.4.3. Usos y propiedades

Debido a los componentes que posee la salvia, presenta múltiples propiedades medicinales, entre las cuales podemos mencionar el uso

en infusión para dolores de estómago, tratamiento de úlcera gastritis, diarrea y como laxante. ^{4,18}

Las hojas sirven para tratar golpes, además gracias a sus propiedades antisépticas y cicatrizantes, se utiliza para el tratamiento de las anomalías de la piel. ^{4,18}

También es usado para tratar la tos, reumas, resfríos y sinusitis. Tiene efectos antiinflamatorios y analgésicos, que podrían utilizarse para los problemas musculares y articulatorios. Estimula el sistema nervioso central por lo que se usa como activadora de la memoria, tratamiento de parálisis faciales y cefalea. ^{4,18}

Usado además para controlar los bochornos durante la menopausia y secreciones. ^{4,18}

La industria utiliza el aceite esencial de la salvia por sus propiedades antifúngicas y antibacterianas en la composición de productos relacionados con la higiene de la boca. ^{4,18,25}

III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Unidad de análisis, universo y muestra

3.1.1. Unidad de análisis

- Hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”

3.1.2. Universo

- Constituido por plantas de *Salvia sagittata* “salvia azul”

3.1.3. Muestra

- **Muestra**

Se empleó aceite esencial obtenido a partir de 5 kg de las hojas de la especie vegetal *Salvia sagittata* “salvia azul”.

Para la recolección de las hojas se tuvo en cuenta los siguientes criterios:

- **Criterios de inclusión:** Hojas libres de enfermedades, agresiones ambientales y agresiones por insectos.
 - **Criterios de exclusión:** Hojas con presencia de enfermedades, maltratadas, secas y otras observaciones dentro del criterio de
- **Cepas de experimentación**

Las cepas tipificadas de *Sporothrix schenckii*, fueron obtenidas del Laboratorio de Referencia de Salud Pública de la DIRESA - Cajamarca.

- **Criterios de inclusión:** cepas de *Sporothrix schenckii*, que cumplieron con las especificaciones referidas por el INS, los cuales son: aislamiento de cepas de personas enfermas con estos hongos e identificación positiva a pruebas bioquímicas de las cepas.
- **Criterios de exclusión:** aquellos que no cumplieron con los criterios de inclusión.

3.2. Métodos de investigación

3.2.1. De acuerdo al fin que se persigue:

Básica, ya que estuvo encaminada a ampliar el conocimiento científico, explorando nuevas teorías y transformar las ya existentes.

3.2.2. De acuerdo a la técnica de contrastación:

Experimental, porque se analiza el efecto producido por la acción o manipulación de la variable independientes sobre la variable dependiente.

El estudio se realizó en el Laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo y en el Laboratorio de Análisis Clínicos Invbiomed – Cajamarca.

3.3. Técnicas de investigación

3.3.1. Procedimiento para la recolección y preparación de la muestra vegetal

❖ **Recolección y selección de la muestra vegetal:**

- Las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”, fueron adquiridas de la zona denominada el Gavilán, ubicada en el anexo Shin Shin del centro poblado Cashapampa – Cajamarca, utilizando las técnicas de recolección adecuadas: la recolección de la especie vegetal se realizó en la mañana y se guardaron en una bolsa de papel para asegurar su conservación.
- Se tomaron 5 kg de las hojas de la especie vegetal *Salvia sagittata* “salvia azul”, rechazando las hojas que presentaron enfermedades, agresiones ambientales y agresiones por insectos.
- Después fueron lavadas con agua potable.

❖ **Obtención de los aceites esenciales de *Salvia sagittata* “salvia azul”, en el destilador de caldera de acero inoxidable:**

Se pesaron 5 kilogramos de hojas de *Salvia sagittata* y se colocaron en el recipiente para la muestra y se agregaron 20 litros de agua en el tanque generador de vapor, posteriormente se acoplaron los tres componentes del equipo,

dejando correr el agua por el refrigerante, se extrajo el aceite esencial por un tiempo de 4 horas aproximadamente.

Posteriormente se midió y recogió el aceite esencial en frascos de color ámbar con tapa, almacenándolos en refrigeración hasta que fueron utilizados para evitar reacciones oxidativas que podrían alterar su composición.

3.3.2. Determinación del efecto antimicótico mediante métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. ⁵

En el presente estudio se evaluó el efecto antimicótico in vitro, del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” en cepas tipificadas de *Sporothrix schenckii*, obtenidas por cultivo en agar Sabouraud dextrosa (SDA), en el Laboratorio de Referencia de Salud Pública de la DIRESA – Cajamarca. Se emplearon métodos estandarizados por el “Clinical Laboratory Standard Institute” (CLSI, antes NCCLS) para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos.

❖ Método de macrodilución para levaduras ⁵

En este método se utilizaron tubos estériles de 11 x 70 mm y el volumen final en cada tubo fue de 1 mL.

➤ Preparación de diluciones del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”

Antifúngico insoluble en agua

- Se colocó 1 mL de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) a cada uno de los seis tubos de prueba (tubo 2 al 6), previamente rotulados excepto el tubo N° 1 (dilución 100%).
- Se colocó 2 mL de aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” al tubo N° 01. Se tomó 1 mL de este tubo, se llevó al tubo N° 02 y se mezcló (dilución 50%).
- Se tomó 1 mL de la dilución anterior (tubo N° 02), se agregó al tubo N° 03 y se mezcló (dilución 25%).
- Se realizó el mismo procedimiento hasta el tubo N° 05
- Al tubo N° 06, se le colocó 0,5 mL de RPMI y 0,5 mL de solución de itraconazol (100 µg/100 µL)
- Al tubo N° 07, se le colocó 0,5 mL de RPMI y 0,5 mL de solución de fluconazol (100 µg/100 µL)
- Al tubo N° 08 se le colocó 0,5 mL de RPMI (control de crecimiento)
- Y al tubo N° 09 se le colocó 1 mL de RPMI (control de esterilidad)

➤ **Preparación del inóculo**

Se preparó tocando con el asa de cultivo aproximadamente 5 colonias > 1 mm y de 24 horas de crecimiento en placa de SDA que se resuspendieron en un tubo de solución

salina (NaCl 0,85 %). Se agitó bien y con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda: 530 nm), se ajustó a una densidad óptica 0,5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina. Esta solución tuvo una concentración aproximada de $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/mL.

Posteriormente se realizó una dilución 1:2000 con medio RPMI (concentración de $0,5 - 2,5 \times 10^3$ UFC/mL). Esta última dilución es la que se utilizó para inocular las placas.

La concentración final de levaduras en las placas fue de $0,5 \times 10^3 - 2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

➤ **Inoculación de los tubos**

Se inocularon con 100 μ L de la suspensión de levadura desde el tubo N° 01 hasta el N° 08, excepto el tubo N° 09 que se utilizó para el control de esterilidad del medio. El tubo N° 08, fue el control de crecimiento.

➤ **Incubación de los tubos**

Los tubos se incubaron a $36 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta las 72 h.

➤ **Lectura de los resultados**

La lectura se realizó visualmente a las 72 h de incubación comparando la turbidez de los tubos con la del control diluido 1/20 (0,2 mL del tubo control más 0,8 mL de RPMI).

Fue conveniente hacer un control del crecimiento en cada uno de los tubos inoculando 10 μ L en una placa de SDA y a las 72 horas, se evaluó el crecimiento micótico. De esta forma se confirmó la inhibición o no inhibición del aceite esencial previa identificación de la cepa si fuese necesario.

❖ **Método de difusión en disco para levaduras** ⁵

➤ **Medio de cultivo**

Se utilizó Agar Mueller Hinton (MHA) suplementado (pH 7,2 – 7,4).

➤ **Preparación del medio de cultivo**

- Se preparó el medio de MHA siguiendo las indicaciones del fabricante: se resuspendieron 19 g de Agar Mueller Hinton en 500 mL de agua destilada. Se puso a hervir por 1 minuto para disolver completamente. Se autoclavó a 121 °C por 15 minutos a 15 lbs de presión.
- Se añadió 10 g de glucosa para el volumen requerido.
- Se agregó 50 μ L de la solución de azul de metileno (5 mg/mL) para los 500 mL de medio.
- Se esterilizó en el autoclave
- Se dejó enfriar el medio a 45 – 50 °C y se procedió a llenar las placas a razón de 28 mL de medio para placas de 90 x 100 mm de diámetro (altura de la capa de agar 4 mm).

- Se dejó enfriar y se refrigeró.

➤ **Preparación del inóculo**

Se preparó tocando con el asa de cultivo 5 colonias ≥ 1 mm y de 24 horas de crecimiento en placa de SDA que se resuspendieron en un tubo de solución salina estéril (NaCl 0,85%). Se agitó bien y con ayuda de un espectrofotómetro (longitud de onda: 530 nm), se ajustó a una densidad óptica 0,5 McFarland, y se añadió la cantidad necesaria de solución salina. Esta solución tuvo una concentración aproximada de $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ UFC/mL.

➤ **Inoculación de las placas**

- Se sumergió una torunda de algodón en la suspensión del inóculo de 0,5 McFarland.
- Se retiró el exceso de líquido rozando la torunda con las paredes del tubo.
- Se sembró la placa uniformemente.
- Se dejó secar de 3-5 min.
- Se aplicaron los discos (previamente empapados a las diluciones preparadas en el método de macrodilución)

➤ **Temperatura y tiempo de incubación**

Se incubaron a $35 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta las 72 horas.

➤ **Lectura**

- Se realizó la lectura a las 24 horas como no hubo suficiente crecimiento, se reincubó y se hizo las lecturas a las 48 y 72 horas.
- Se midió el halo de inhibición haciendo uso del pie de rey.
- La lectura fue subjetiva y se requirió la experiencia de un experto para dar medidas exactas.
- La presencia de micro colonias en el borde del halo de inhibición fueron ignoradas.

➤ **Puntos de corte**

En la tabla siguiente se especifican los diámetros equivalentes a los puntos de corte.

Tabla 3: Puntos de corte y equivalencia diámetro – CMI para *Candida* spp

Antifúngico	Carga del disco	Diámetro (mm)		
		R	I	S
Fluconazol/ Itraconazol	25 µg	≤ 14	15 – 18	≥ 19
Voriconazol	1 µg	≤ 13	14 – 16	≥ 17
Caspofungina	5 µg	≤ 10	-----	≥ 11

S, sensible. I, intermedio. R, resistente

Fuente: Cantón E, Martín E, Espinel A. 15a métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). [sede Web]. [s.l.]: Cantón E, Martín E, Espinel A; 2014.⁵

3.3.3. Determinación del efecto antimicótico mediante el método de dilución en agar

Para este método se trabajó por quintuplicado. Se distribuyeron en grupos control (esterilidad y crecimiento) y grupos problema a concentraciones de 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ y 80 $\mu\text{L}/\text{mL}$ del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”.

❖ Preparación del agar Sabouraud:

Se elaboró diluyendo 65 g del agar en 1000 mL de agua destilada y se procedió al autoclave para luego ser servidas en placas Petri estériles, posteriormente se realizó la prueba de calidad.

❖ Siembra de la cepa de *Sporothrix schenckii* para la forma levaduriforme.

La siembra se realizó inoculando 100 μL de la suspensión de levaduras desde la placa N° 01 hasta la N° 06, excepto la placa N° 07 que se utilizó para el control de esterilidad del medio. En la placa N° 06 fue el control de crecimiento.

❖ Lectura de resultados

La lectura de los resultados se realizó a las 24, 48 y 72 horas para determinar si existe presencia de crecimiento del hongo (*Sporothrix schenckii*), en todas las placas estudiadas.

❖ Diseño experimental

- **Grupos control:**

En las placas servidas con SDA se sembraron las cepas de *Sporothrix schenckii*, para la forma levaduriforme para su posterior comparación. También se consideró un control de esterilidad.

- **Grupo problema 1:**

Se colocaron 5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”, a cada una de las placas previamente esterilizadas, luego se agregó SDA y se uniformizó el medio hasta su solidificación, se procedió a sembrar las cepas de *Sporothrix schenckii*; en placas, las cuales fueron incubadas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las lecturas se realizaron hasta las 72 horas.

- **Grupo problema 2:**

Se colocaron 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”, en las placas previamente esterilizadas, luego se agregó SDA y se uniformizó el medio hasta su solidificación, se procedió a sembrar las cepas de *Sporothrix schenckii*; en placas, las cuales fueron incubadas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las lecturas se realizaron hasta las 72 horas.

- **Grupo problema 3:**

Se colocaron 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”, a cada una de las placas previamente esterilizadas, luego se agregó SDA y se uniformizó el medio hasta su solidificación, se procedió a sembrar las cepas de *Sporothrix schenckii*; en placas, las cuales fueron incubadas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las lecturas se realizaron hasta las 72 horas.

- **Grupo problema 4:**

Se colocaron 40 $\mu\text{L}/\text{mL}$ del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”, a cada una de las placas previamente esterilizadas, luego se agregó SDA y se uniformizó el medio hasta su solidificación, se procedió a sembrar las cepas de *Sporothrix schenckii*; en placas, las cuales fueron incubadas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$.

Las lecturas se realizaron hasta las 72 horas.

- **Grupo problema 5:**

Se colocaron 80 $\mu\text{L}/\text{mL}$ del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”, a cada una de las placas previamente esterilizadas, luego se agregó SDA y se uniformizó el medio hasta su solidificación, se procedió a sembrar las cepas de *Sporothrix schenckii*; en placas, las cuales fueron incubadas a $36\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las lecturas se realizaron hasta las 72 horas.

3.4. Instrumentos, equipos, materiales y reactivos

3.4.1. Instrumentos

- Microsoft Excel
- SSPS (Statistical Package for the Social Sciences).

3.4.2. Equipos

- Destilador de caldera de acero inoxidable (INDUSTRIAL)
- Balanza analítica (ADVENTURER O AUS)
- Estufa (MEMMERT)
- Autoclave (H.W. KESELL)
- Refrigerador. (COLDEX)

3.4.3. Materiales

- De uso común en el laboratorio.

3.4.4. Reactivos

- Alcohol 96° marca: Medofarma
- Agar Sabouraud- dextrosa- marca Merck. Proveedor: Quimelad
- Agar Mueller Hinton- marca Merck. Proveedor: Quimelad
- Azul de metileno- marca Biodisc SAC
- Glucosa al 5%
- RPMI- marca Merck. Proveedor: Quimelad
- Solución salina fisiológica

3.5. Técnica de análisis de datos

Los resultados obtenidos por el método de difusión en disco, fueron analizados a través del test estadístico no paramétrico de U de Mann-Whitney; y para los métodos de macrodilución y dilución en agar, se utilizó el test estadístico de chi – cuadrado. Estos resultados fueron expresados en cuadros y tablas; considerando la siguiente base de interpretación para el valor de p:

- Si $p > 0,05$; la diferencia no es significativa, IC = 95%.
- Si $p \leq 0,05$; la diferencia es significativa, IC = 95%.

IV. RESULTADOS

4.1. Método de Macrodilución para la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*.

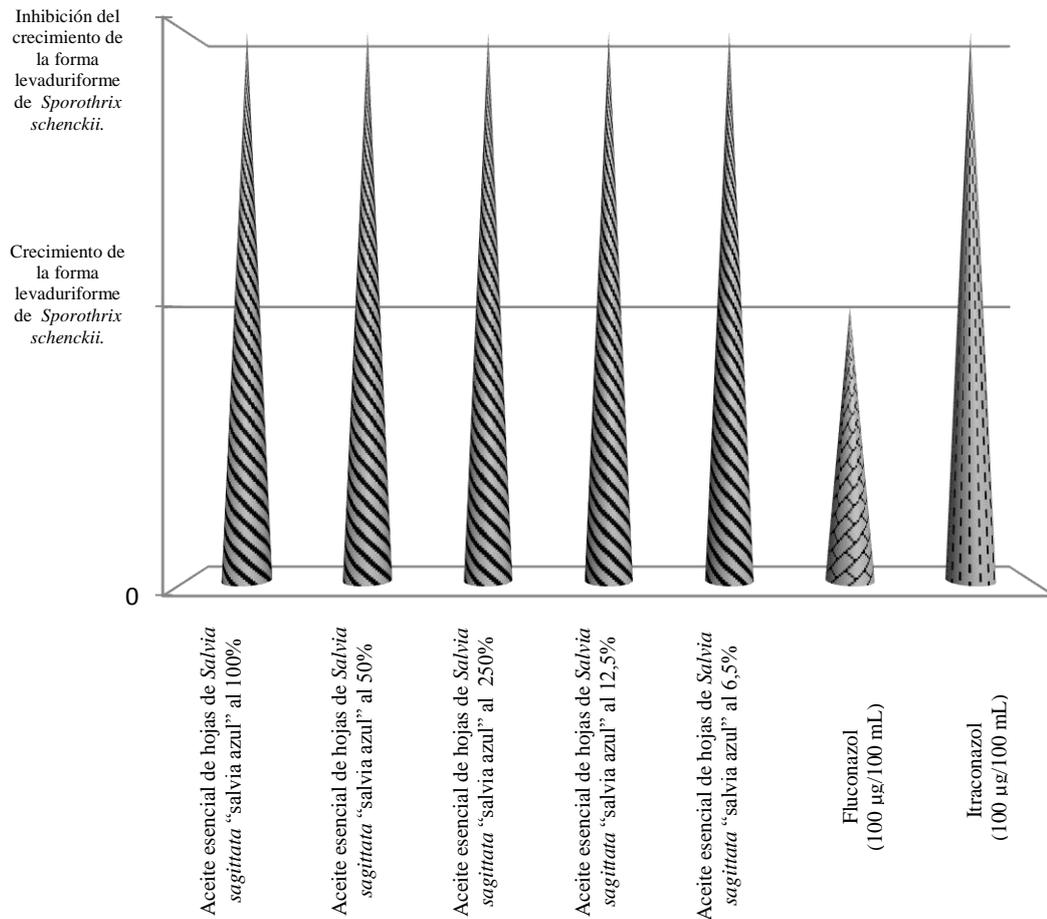
Tabla 4: Inhibición de la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii* a diferentes concentraciones del aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”.

Inhibición del crecimiento de la forma levaduriforme de <i>Sporothrix schenckii</i> . (Método de Macrodilución)						
Grupo	Tubo N° 1	Tubo N° 2	Tubo N° 3	Tubo N° 4	Tubo N° 5	PROMEDIO
PROBLEMA	Aceite esencial de hojas de <i>Salvia sagittata</i> “salvia azul” al 100%	+	+	+	+	+
	Aceite esencial de hojas de <i>Salvia sagittata</i> “salvia azul” al 50%	+	+	+	+	+
	Aceite esencial de hojas de <i>Salvia sagittata</i> “salvia azul” al 25%	+	+	+	+	+
	Aceite esencial de hojas de <i>Salvia sagittata</i> “salvia azul” al 12.5%	+	+	+	+	+
	Aceite esencial de hojas de <i>Salvia sagittata</i> “salvia azul” al 6.25%	+	+	+	+	+
CONTROL	Fluconazol (100 µg/100 mL)	-	-	-	-	-
	Itraconazol (100 µg/100 mL)	+	+	+	+	+

Fuente: Resultados obtenidos en el laboratorio

• **Leyenda:**

- (+), significa que hay inhibición del crecimiento de la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*.
- (-), significa que no hay inhibición del crecimiento de la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*.



Fuente: Registro de resultados elaborado por las tesis para el presente estudio

Figura 11: Inhibición de la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii* a diferentes concentraciones del aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”.

Tabla 5: Resumen estadístico de método de Macrodilución

ASOCIACIÓN	COMPARACIÓN ESTADÍSTICA			Decisión
	Chi-cuadrado	p-valor		
		Valor	Significancia al 95%	
GRUPOS Y CRECIMIENTO DE LA CEPA	35	0,000	p < 0,05	Hay diferencia significativa

4.2. Método de difusión en disco para la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*

Tabla 6: Medidas de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” frente a la forma levaduriforme de la cepa de *Sporothrix schenckii*.

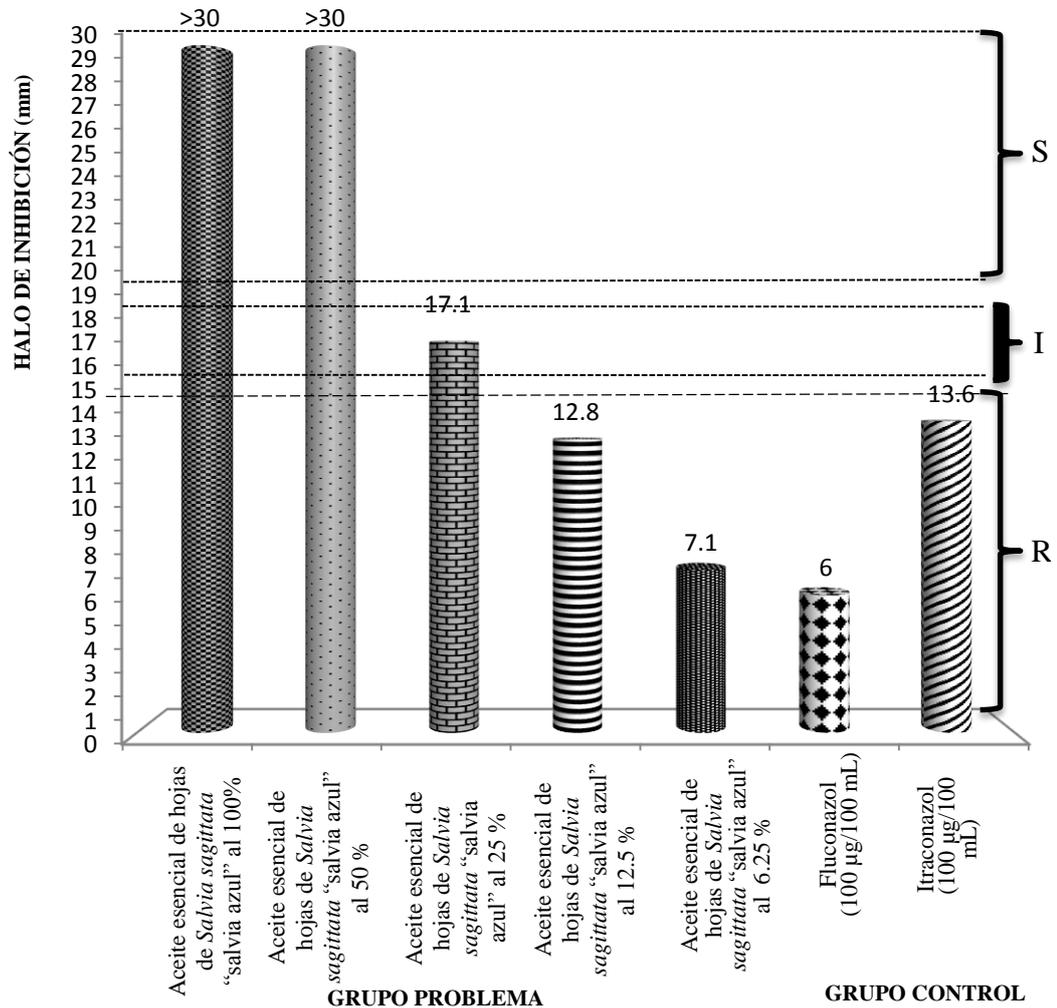
(Método de difusión en disco)							
Halo de inhibición en mm (Diámetro)							
Grupo	Disco (Cc del aceite)	Placa N° 1	Placa N° 2	Placa N° 3	Placa N° 4	Placa N° 5	Promedio
PROBLEMA	Aceite esencial de hojas de <i>Salvia sagittata</i> “salvia azul” al 100 %	>30	>30	>30	>30	>30	>30 mm
	Aceite esencial de hojas de <i>Salvia sagittata</i> “salvia azul” al 50 %	>30	>30	>30	>30	>30	>30 mm
	Aceite esencial de hojas de <i>Salvia sagittata</i> “salvia azul” al 25 %	13.3	16.9	17.7	14.0	16.8	17.1 mm
	Aceite esencial de hojas de <i>Salvia sagittata</i> “salvia azul” al 12.5 %	13.5	13.3	14.0	9.8	14.0	12.8 mm
	Aceite esencial de hojas de <i>Salvia sagittata</i> “salvia azul” al 6.25 %	7.1	7.2	7.1	7.1	7.0	7.1 mm
CONTROL	Fluconazol (100 µg/100 mL)	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6 mm
	Itraconazol (100 µg/100 mL)	15.8	18.8	11.0	11.00	11.4	13.6 mm

Fuente: Datos obtenidos en el laboratorio

• **Leyenda:**

- R: Resistente (≤ 14)
- I: Intermedio (15 - 18)
- S: Sensible (≥ 19)

Interpretación: El aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”, a mayor concentración, el halo de inhibición es mayor en la cepa de *Sporothrix schenckii*. Por otro lado se observó que a concentraciones del 50% y 100% del aceite esencial el hongo es sensible.



Fuente: Registro de resultados elaborado por las tesis para el presente estudio

Figura 12: Comparación de los promedios de las medidas de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones del aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” frente a la forma levaduriforme de la cepa de *Sporothrix schenckii*, según puntos de corte.

Tabla 7: Resumen estadístico de método de difusión en disco

GRUPOS	COMPARACIÓN ESTADÍSTICA			Decisión
	U DE MANN-WHITNEY	p-valor		
		Valor	Significancia al 95%	
PROBLEMA VS CONTROL	57,500	0,012	p < 0,05	Hay diferencia significativa

4.3. Método de dilución en agar para la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*

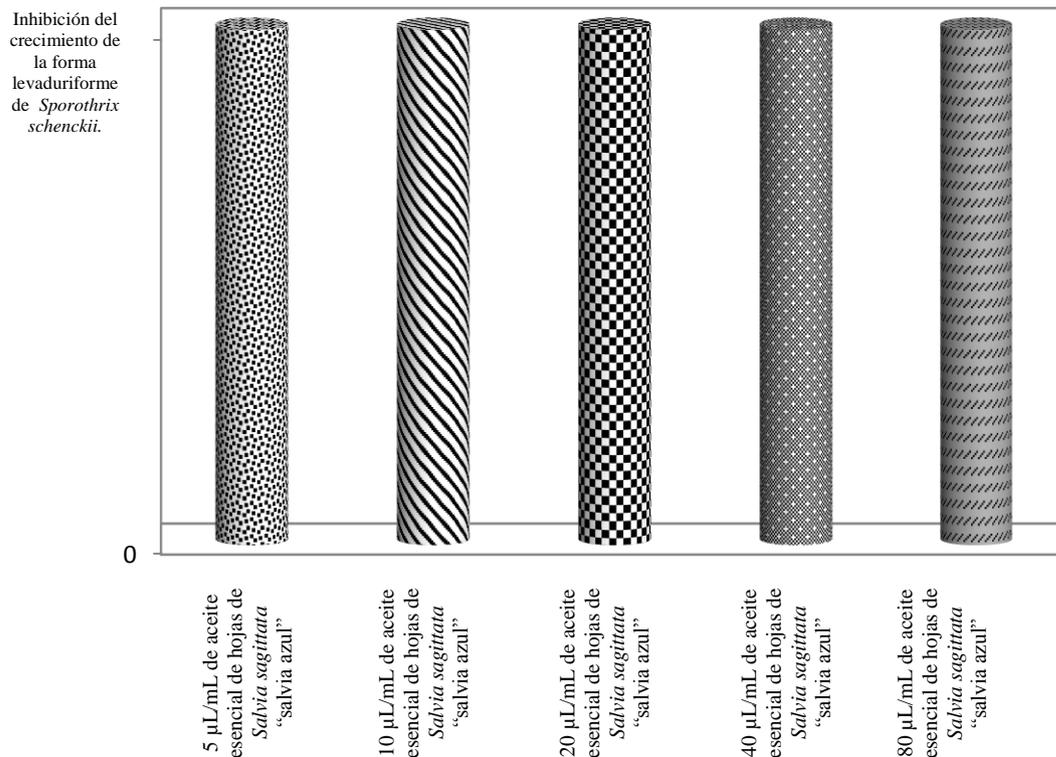
Tabla 8: Sensibilidad de las diferentes volúmenes del aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” frente a la forma levaduriforme de la cepa de *Sporothrix schenckii*.

Inhibición del crecimiento de la forma levaduriforme de <i>Sporothrix schenckii</i> (Método de dilución en agar)							
Grupo	Concentración en placa del aceite	Placa N° 1	Placa N° 2	Placa N° 3	Placa N° 4	Placa N° 5	PROMEDIO
PROBLEMA	5 µL/mL de aceite esencial de hojas de <i>Salvia sagittata</i> “salvia azul”	+	+	+	+	+	+
	10 µL/mL de aceite esencial de hojas de <i>Salvia sagittata</i> “salvia azul”	+	+	+	+	+	+
	20 µL/mL de aceite esencial de hojas de <i>Salvia sagittata</i> “salvia azul”	+	+	+	+	+	+
	40 µL/mL de aceite esencial de hojas de <i>Salvia sagittata</i> “salvia azul”	+	+	+	+	+	+
	80 µL/mL de aceite esencial de hojas de <i>Salvia sagittata</i> “salvia azul”	+	+	+	+	+	+

Fuente: Datos obtenidos en el laboratorio

- **Leyenda:**

- (+), significa que hay inhibición del crecimiento de la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*.



Fuente: Registro de resultados elaborado por las tesis para el presente estudio

Figura 13: Sensibilidad de las diferentes volúmenes del aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” frente a la forma levaduriforme de la cepa de *Sporothrix schenckii*.

Tabla 9: Resumen estadístico de método de dilución en agar

ASOCIACIÓN	COMPARACIÓN ESTADÍSTICA			Decisión
	Chi-cuadrado	p-valor		
		Valor	Significancia al 95%	
CRECIMIENTO DE LA CEPA	25	0,000	p < 0,05	Hay diferencia significativa

V. DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación tuvo por finalidad determinar la actividad antimicótica in vitro del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” sobre *Sporothrix schenckii*, el cual es un hongo patógeno que ocasiona la esporotricosis, afectando a una gran parte del país, si a esto se suma la resistencia microbiana, se convierte en un problema de salud pública. Ryan K y Ray G (2011)³⁴, en el capítulo “Naturaleza de los hongos”, mencionan que esporotricosis es adquirida por inoculación traumática a través de la piel por medio de material que contiene el microorganismo (*Sporothrix schenckii*). La exposición es en gran medida ocupacional o relacionada con actividades recreativas. De igual forma Risi Y (2014)³³, en su revisión “Esporitricosis”, indican que los factores de virulencia del *Sporothrix schenckii* son la termotolerancia, los antígenos celulares, la presencia de moléculas de adhesión, la producción de melanina y peróxido de ergosterol, los cuales juegan un rol importante en el desarrollo de la esporotricosis.

Según el método de Macrodilución, se observa que el aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”, a concentraciones de 100%, 50%, 25%, 12,5% y 6,25%, inhiben el crecimiento de la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii* (tabla 4); a la vez se denota que el fluconazol no inhibe el crecimiento de la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*, caso contrario sucedió con el itraconazol; estos resultados confirman lo referido por Ryan K y Ray G (2011)³⁴, quienes

indican que el tratamiento más idóneo para eliminar *Sporothrix schenckii*, es el itraconazol. Además, se interpreta que todas las concentraciones estudiadas inhiben el crecimiento de *Sporothrix schenckii* a comparación del fluconazol que no mostró este efecto, revelando así que el aceite esencial posee actividad antimicótica frente a la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*, siendo validado por diferentes estudios científicos que dan fe de esto, como el de Dulger B, Hacioglu N (2008)¹², quienes indican en su estudio titulado “Actividad antifúngica de la especie *Salvia tigrina*”, que los extractos alcohólicos del género *Salvia* presentan actividad antifúngica. De igual manera, Rashidi A et al (2011)³², en su estudio “Evaluación del efecto antifúngico de los extractos de *Lavándula officinalis*, *Salvia officinalis*, *Rhus coriaria* (Zumaque), *Glycyrrhiza glabra* y *Althaea officinalis* sobre *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*”, concluyen que el género *Salvia*, presenta efecto antimicótico; además, Jirovetz L et al (2007)¹⁹, en su investigación “Actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Salvia lavandulifolia*, *Salvia officinalis* y *Salvia sclarea* contra diversas especies de *Candida* patógena”, refieren que el aceite esencial de los tres tipos del género *Salvia*, presentan actividad antimicótica.

Los resultados obtenidos por el método de difusión en disco para la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*, afianzan el efecto antimicótico del aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”, ya que a las concentraciones de 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 % y 6,25%; presentaron mejor efecto que el fluconazol (tabla 4 y gráfica 1), frente a *Sporothrix schenckii*, a la vez el efecto antimicótico que presenta el aceite esencial a las concentraciones 25%, 50% y 100% muestra

halos inhibición con diámetros mayores que el itraconazol; este efecto se debería a los fitocomponentes que posee el género *Salvia*, como mencionan Ortega T et al (2002)²⁹, en su estudio “*Salvia*: Fitoquímica, farmacología y terapéutica”, que el género *Salvia* presenta un elevado número de compuestos terpénicos, los cuales le confieren una importante actividad antiséptica y antifúngica. Yuce E et al (2014)³⁸, en su estudio “Composición de aceites esenciales y actividad antioxidantes y antifúngica de *Salvia sclarea*” y Jirovetz L et al (2013)¹⁹, en su estudio mencionado anteriormente, indican que el género *Salvia* presenta un buen efecto antifúngico y antioxidante gracias a sus diferentes compuestos químicos que poseen como son: Óxido de cariofileno, esclareol, spathulenol, 1H-nafto (2,1,6) pirano y b-cariofileno; de igual manera Dulger B, Hacioglu N (2008)¹² en su estudio ya mencionado, indican que los compuestos que están relacionados con el efecto antimicótico son α -pineno, β -pineno, β -thuyone, alcanfor, carvacrol, acetato de linalal, acetato de sabinilo y 1,8-cineol.

Según el método de dilución en agar, observamos que las concentraciones ensayadas (5 μ L/mL, 10 μ L/mL, 20 μ L/mL, 40 μ L/mL y 80 μ L/mL), del aceite esencial de *Salvia sagittata* “salvia azul” son capaces de inhibir el crecimiento de la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii* (Tabla 5), este efecto se debería a los fitocomponentes antes mencionados, como lo refiere Córdova I et al (2016)⁹, en el estudio “Actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de *Salvia apiana* frente a microorganismos de importancia clínica”, indican que el posible mecanismo de acción de estos compuestos es el daño a la integridad de la membrana celular, la actividad antimetabolito y la lisis celular. Kalemba D,

Kunicka A (2003)²⁰, en el estudio “Las propiedades antibacterianas y antifúngicas de aceites esenciales” indican que la actividad antimicótica del aceite esencial (AE), depende de sus propiedades lipofílicas o hidrofílicas. Los terpenoides pueden servir como un ejemplo de agentes liposolubles, quienes afectan la actividad de las enzimas catalizadoras a nivel de membrana, por ejemplo ciertos componentes del AE pueden actuar como desacopladores interfiriendo en la translocación de protones sobre la membrana y subsecuentemente la interrupción de la fosforilación del ADP. Lambert R et al (2001)²¹, en el estudio “Concentración mínima inhibitoria y modo de acción del aceite esencial de orégano, timol y carvacrol”, mencionan que el carvacrol, uno de los compuestos de salvia, daña la membrana celular; provocando la disipación de dos componentes de la fuerza motriz del protón: el gradiente de pH y el potencial eléctrico, pudiendo ser mayor el daño a la membrana en presencia de nutrientes, síntesis de ácidos nucleicos y actividad de las enzimas ATPasas, entre otros, Así mismo, Conner D et al (1984)⁸, en su estudio “Efectos de aceites esenciales de plantas en el deterioro del crecimiento de las levaduras”, señalaron que el carvacrol disminuye la actividad respiratoria de *Saccharomyces cerevisiae*. Por otro lado, mencionan que la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales en levaduras se debe al daño ocasionado a algunos sistemas enzimáticos involucrados con la producción de la energía y síntesis de componentes estructurales. Algunos compuestos fenólicos cruzan la membrana citoplasmática e interaccionan con proteínas y enzimas de membrana, causando un flujo opuesto de protones afectando la actividad celular. Cui H et al (2015)¹¹, en el estudio

“Actividad antimicrobiana y mecanismos del aceite esencial de *Salvia sclarea*”, indican que el aceite esencial de *Salvia sclarea* daña la membrana celular y cambia la permeabilidad de la membrana celular, llevando a la liberación del citoplasma, sustancias macromoleculares, ATP y ADN.

VI. CONCLUSIONES

- El aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” posee actividad antimicótica in vitro frente a la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*.
- Al comparar el efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”, a través del método de macrodilución se obtuvo que el fluconazol no presentó efecto antimicótico; el aceite esencial en sus diferentes concentraciones presentó efecto antimicótico similar al itraconazol frente a la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*.
- Al comparar el efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”, a través del método de difusión en disco se obtuvo que el fluconazol no presentó efecto antimicótico; el aceite esencial a la concentración del 12,5% presentó efecto antimicótico similar al itraconazol y a las concentraciones de 25%, 50% y 100% el efecto antimicótico fue mayor frente a la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*.
- Se evidenció el efecto antimicótico en todas las concentraciones (5 µg/mL, 10 µg/mL, 20 µg/mL, 40 µg/mL, 80 µg/mL) del aceite esencial de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” sobre la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii* por el método de dilución en agar.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar más estudios sobre *Salvia sagittata* “salvia azul”, incorporando otras partes de la planta para determinar si estas contiene también efecto antimicótico.
- Realizar más estudios utilizando otros métodos de extracción en *Salvia sagittata* “salvia azul”.
- Realizar la caracterización química del aceite esencial de *Salvia sagittata* “salvia azul”.
- Continuar estudios citotóxicos del aceite esencial de *Salvia sagittata* “salvia azul”
- Continuar las investigaciones con *Salvia sagittata* “salvia azul” respecto a su efecto “in vivo”.
- Realizar estudios sobre la forma farmacéutica más adecuada para su aplicación.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albarracín G, Gallo G. Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial utilizando *Piper aduncum* (Cordoncillo), procedente de la zona cafetera. [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; 2008. [Citado el 20 de julio del 2016]. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/11051423.pdf>
2. Amani S, Tracanna M, González A, Rodríguez A, Poch M, Schuff C, et al. Composición química y actividad biológica del aceite esencial de *Salvia Sp.* (Lamiaceae) de Tucumán, Argentina. Rev. Bol. Lat. Car. Plant. [Revista en Internet]. 2007; 6 (5): 282 – 3. [Citado 20 de abril del 2016]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/856/85617508075.pdf>
3. Ayats J. *Sporothrix schenckii*. [sede Web]. [s.l.]: Ayats J; 2000. [Citado 26 de abril del 2016]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/micologia/esporo.pdf>
4. Botanical-online.com. Aceite esencial de salvia. [Sede Web]. Madrid: botanical-online.com, 2016. [Citado 20 de abril del 2016]. Disponible en: <http://www.botanical-online.com/aceiteesencialsalvia.htm>

5. Cantón E, Martín E, Espinel A. 15a métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). [sede Web]. [s.l.]: Cantón E, Martín E, Espinel A; 2014. [Citado 26 de abril del 2016]. Disponible en:
<http://www.guia.reviberoammicol.com/Capitulo15.pdf>
6. Cerón E. Plantas medicinales de los andes ecuatorianos. [Sede Web]. Quito: Cerón E, 2006. [Citado 20 de abril del 2016]. Disponible en:
<http://www.beisa.dk/Publications/BEISA%20Book%20pdfer/Capitulo%2018.pdf>
7. Cerutti M, Neumayer F. Introducción a la obtención de aceite esencial de limón. Rev. Dialnet. [Revista en Internet]. 2004; 1 (5): 149 – 55. [Citado 20 de abril del 2016]. Disponible en:
<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/3331453.pdf>
8. Conner D, Beuchat L. Effects of essential oils from plants on growth of food spoilage yeasts. Rev. J. Food. Science. [Revista en internet]. 1984; 49 (2): 429 – 34. [Citado 20 de julio del 2016]. Disponible en:
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.1984.tb12437.x/abstract>
9. Córdova I, Aragon O, Díaz L, Franco S, Serafín S, Pozos A, Soto T, et al. Actividad antibacteriana y antifúngica de un extracto de *Salvia apiana* frente a microorganismos de importancia clínica. Rev. Argent. Microbiol. [Revista en internet]. 2016; 48 (3): 217 – 21. [Citado 20 de julio del 2016]. Disponible en:
<http://www.scielo.org.ar/pdf/ram/v48n3/v48n3a08.pdf>

10. Cruz F. Micosis [sede Web]. Ciudad de México: Cruz F; 2005. [Citado 22 de abril del 2016]. Disponible en:
<http://www.ammveb.net/clinica/micosis.pdf>
11. Cui H, Zhang X, Zhou H, Zhao C, Lin L. Antimicrobial activity and mechanisms of *Salvia sclarea* essential oil. Rev. Bot Stud. [Revista en internet]. 2015; 56 (16): 2 – 8. [Citado 20 de julio del 2016]. Disponible en:
<http://as-botanicalstudies.springeropen.com/articles/10.1186/s40529-015-0096-4>
12. Dulger B, Hacioglu N. Antifungal activity of endemic *Salvia tigrina* in Turkey. Rev. Trop J Pharm Res. [Revista en internet]. 2008; 7 (3): 1051 – 4. [Citado 20 de julio del 2016]. Disponible en:
<http://www.ajol.info/index.php/tjpr/article/viewFile/14690/2770>
13. Fbioyf.unr.edu.ar, Clasificación de las micosis. [sede Web]. [s.l.]: Fbioyf.unr.edu.ar; 2015. [Citado 26 de abril del 2016]. Disponible en:
<http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/pluginfile.php/4130/course/section/1519/Micosis-apunte-Farmacia-2014.pdf>
14. González F. Interés farmacéutico de la "*Salvia officinalis*" y de la "*Euphrasia officinalis*". Rev. Dialnet. [Revista en internet]. 2009; 1 (1): 157 – 71. [Citado 20 de julio del 2016]. Disponible en:
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=3760677>
15. Gregorí B. Estructura y actividad de los antifúngicos. Rev. Cubana Farm. [Revista en Internet]. 2005; 39 (2): 1 – 5. [Citado 20 de abril del 2016]. Disponible en:

http://www.bvs.sld.cu/revistas/far/vol39_2_05/far12205.htm

16. Guarro J. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. Rev. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. [Revista en internet]. 2012; 30 (1): 33 – 9. [Citado 19 de julio del 2016]. Disponible en:

<http://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-taxonomia-biologia-los-hongos-causantes-infeccion-humanos-90093120>

17. Hernández F. Esporotricosis. [sede Web]. Ciudad de México: Hernández F; 2015. [Citado 24 de abril del 2016]. Disponible en:

<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/ esporotricosis.html>

18. Instituto de Ciencias Naturales. *Salvia sagittata*. [Sede Web]. Bogotá: Instituto de Ciencias Naturales; 2014. [Citado 15 de abril del 2016]. Disponible en:

<http://www.biovirtual.unal.edu.co/ICN/?controlador=ShowObject&accion=show&id=342286>

19. Jirovetz L, Wlcek K, Buchbauer G, Geissler M. Antifungal activities of essential oils of *Salvia lavandulifolia*, *Salvia officinalis* and *Salvia sclarea* against various pathogenic *Candida* species. Rev. Journal of essential oil-bearing plants. [Revista en internet]. 2013; 10 (5): 430 – 39. [Citado 19 de julio del 2016]. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/261594249_Antifungal_Activities_of_Essential_Oils_of_Salvia_lavandulifolia_Salvia_officinalis_and_Salvia_sclarea_against_Various_Pathogenic_Candida_species

20. Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Rev. Curr. Med. Chem. [Revista en internet]. 2003; 10 (10): 813 – 29. [Citado 20 de julio del 2016]. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12678685>
21. Lambert R, Skandamis P, Coote P, Nychas G. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. Rev. J Appl. Microbiol. [Revista en internet]. 2001; 91 (3): 453 – 62. [Citado 20 de julio del 2016]. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11556910>
22. Loja B. Contribución al estudio florístico de la provincia de concepción, Junín. Dicotiledóneas. [Tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología; [Tesis en internet]; 2012. [citado 13 de abril del 2016]. Disponible en:
http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/basic/loja_h_b/t_completo.pdf
23. Marca M. Actividad Antimicótica “In Vitro” del aceite esencial *Cinnamomum zeylanicum* Breyn “canela” frente a *Cándida albicans* ATCC 6538, Tacna, 2012. [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna, Facultad de Ciencias de la Salud, [Tesis en internet]; 2012. [Citado 20 de abril del 2016]. Disponible en:
http://tesis.unjbg.edu.pe:8080/bitstream/handle/unjbg/202/87_2013_Marca_Cu ello_MR_FACS_Farmacia_y_Bioquimica_2013_resumen.pdf?sequence=2

24. Martínez C, Carnot J, De Castro R, Muñío J, Torres W. Tratamiento de las micosis profundas. Estado actual. Rev. Acta médica. [Revista en internet]. 1998; 8 (1): 80 – 5 [Citado 20 de julio del 2016]. Disponible en:
http://bvs.sld.cu/revistas/act/vol8_1_98/act12198.pdf
25. Martínez P. Evaluación del poder antifúngico de los extractos de romero, menta y salvia sobre hongos que atacan a las naranjas. Rev. Estudios e Investigaciones del Saber Académico. [Revista en internet]. 2013; 7 (7): 28 – 32 [Citado 19 de julio del 2016]. Disponible en:
<http://publicaciones.uni.edu.py/index.php/eisa/article/view/38/26>
26. Méndez J, Herrera M. Métodos de susceptibilidad antifúngica: revisión metodológica. Rev. Méd. Hosp. Nac. [Revista en internet]. 2001; 36 (2): 37 – 44. [Citado 20 de julio del 2016]. Disponible en:
http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85462001000100005
27. Micofbioyf. Esporotricosis. [sede Web]. [s.l.]: micofbioyf; 2000. [Citado 26 de abril del 2016]. Disponible en:
<https://micofbioyf.com/file/view/ esporotricosis+TEORIA.pdf>
28. Ochoa K, Paredes L, Bejarano D, Silva R. Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Senecio graveolens* Wedd (Wiskataya). Rev. Sci. Agro. [Revista en Internet]. 2012; 3 (5): 291 – 302. [Citado 20 de abril del 2016]. Disponible en:
<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5113830.pdf>

29. Ortega T, Carretero E, Villar A. Salvia. Fitoquímica, farmacología y terapéutica. Rev. Far. Prof. [Revista en internet]. 2002; 16 (7): 59 – 64. [Citado 20 de julio del 2016]. Disponible en:
<http://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-articulo-salvia-fitoquimica-farmacologia-terapeutica-13034818>
30. Picazo J. Procedimientos en microbiología clínica. [sede Web]. [s. l.]: Picazo J; 2000. [Citado 26 de abril del 2016]. Disponible en:
<http://coesant-seimc.org/documents/M%C3%A9todosB%C3%A1sicosSensibilidadAntibi%C3%B3ticos.pdf>
31. Plantas.fac.com. Salvia. [sede Web]. [s.l.]: plantas.fac.com; 2000. [Citado 26 de abril del 2016]. Disponible en:
<http://plantas.fac.com/salvia-perenne>
32. Rashidi A, Mousavi B, Reza M, Ali M, Hosaini W, Motaharinia Y, et al. Evaluation of antifungal effect of *Lavandula officinalis*, *Salvia officinalis* L., Sumac, *Glycyrrhiza glabra*, and *Althaea officinalis* extracts on *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, and *Aspergillus flavus* species. Rev. J. Med. Plants Res. [Revista en internet]. 2011; 6 (2): 309 – 13. [Citado 15 de julio del 2016]. Disponible en:
<http://www.academicjournals.org/journal/JMPR/article-full-text-pdf/606E2C219048>
33. Risi Y. Esporotricosis. [Tesis para optar el Título Profesional de Dermatólogo]. Río de Plata: Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Médicas; [Tesis en Internet]; 2014. [Citado 20 de julio del 2016]. Disponible en:

<http://www.postgradofcm.edu.ar/ProduccionCientifica/TrabajosCientificos/117.pdf>

34. Ryan K, Ray G. Naturaleza de los hongos. En: Ryan K, Ray G, editores. Sherris Microbiología Médica. 5ª ed. Santa Fe: McGraw - Hill Interamericana; 2011: pp. 527 – 34.
35. Sánchez L, Galarza C, Matos R. Infecciones micóticas subcutáneas. Rev. Dermatología Peruana. [Revista en internet]. 2009; 19 (4): 362 – 87. [Citado 19 de julio del 2016]. Disponible en:
http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v19_n4/pdf/a11v19n4.pdf
36. Taco E, Cañizares I. Plantas Medicinales del Mercado de la Magdalena Ubicado al Sur de Quito. [Sede web]. Quito: Taco E, Cañizares I; 2013. [Citado 20 de abril del 2016]. Disponible en:
<http://es.slideshare.net/ERICKATACO/investigacin-e-informacin-sobre-plantas-medicinales>
37. Universidad Cesar Vallejo. Morfología y estructura de los microorganismos [sede Web]. Trujillo: Universidad Cesar Vallejo; 2002. [Citado 26 de abril del 2016]. Disponible en:
http://www.ucv.pe/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/08_Tema_2_morfologia.pdf
38. Yuce E, Yildirim N, Yildirim N, Paksoy M, Bagci E. Essential Oil composition, antioxidant and antifungal activities of *Salvia sclarea* L. from Munzur valley in Tunceli, Turkey. Rev. Cell. Mol. Biol. [Revista en internet]. 2014; 60 (2): 1 – 5. [Citado 20 de julio del 2016]. Disponible en:

http://www.cellmolbiol.com/admin/articles_generaux/YUCEcmb2014.60.2.1.pdf

39. Zurita S. Esporotricosis y paracoccidioidomicosis en Perú: experiencias en prevención y control. Rev. Perú. Med. Exp. Salud pública. [Revista en internet]. 2014; 31 (2): 352 – 7. [Citado 20 de julio del 2016]. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342014000200025

ANEXOS

Anexo 1: Recolección de la especie vegetal de *Salvia sagittata* “salvia azul”



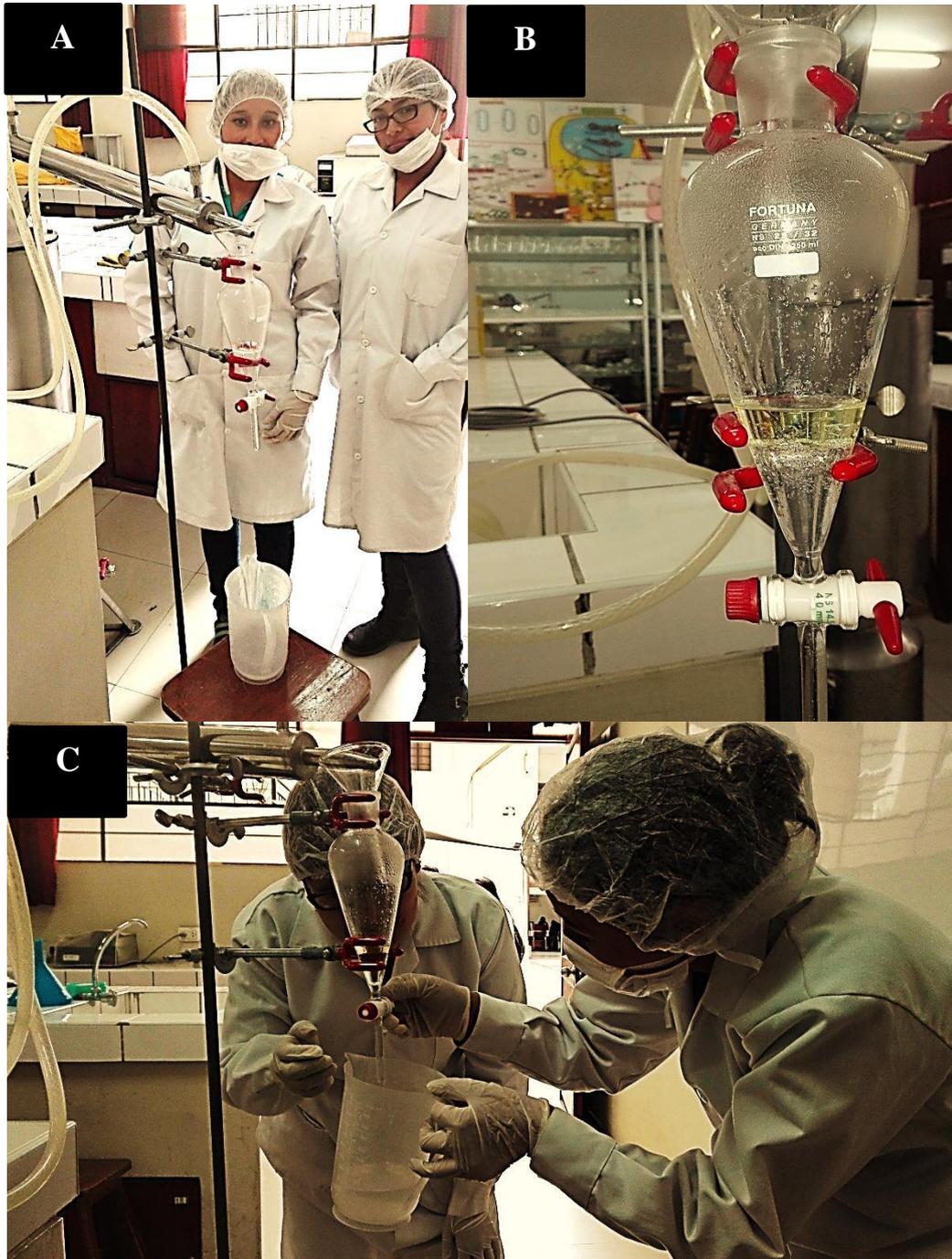
A. Tesista recolectando *Salvia sagittata* “salvia azul”; **B.** *Salvia sagittata* “salvia azul” y **C.** *Salvia sagittata* “salvia azul” recolectada por las tesisistas

Anexo 2: Selección de las hojas de la especie vegetal de *Salvia sagittata* “salvia azul”



A. Tesistas seleccionando las hojas recolectadas de *Salvia sagittata* “salvia azul”; B. Hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” que no cumplen con los criterios de inclusión y C. Hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” que cumplen con los criterios de inclusión

Anexo 3: Extracción del aceite esencial de las hojas de la especie vegetal de *Salvia sagittata* “salvia azul”

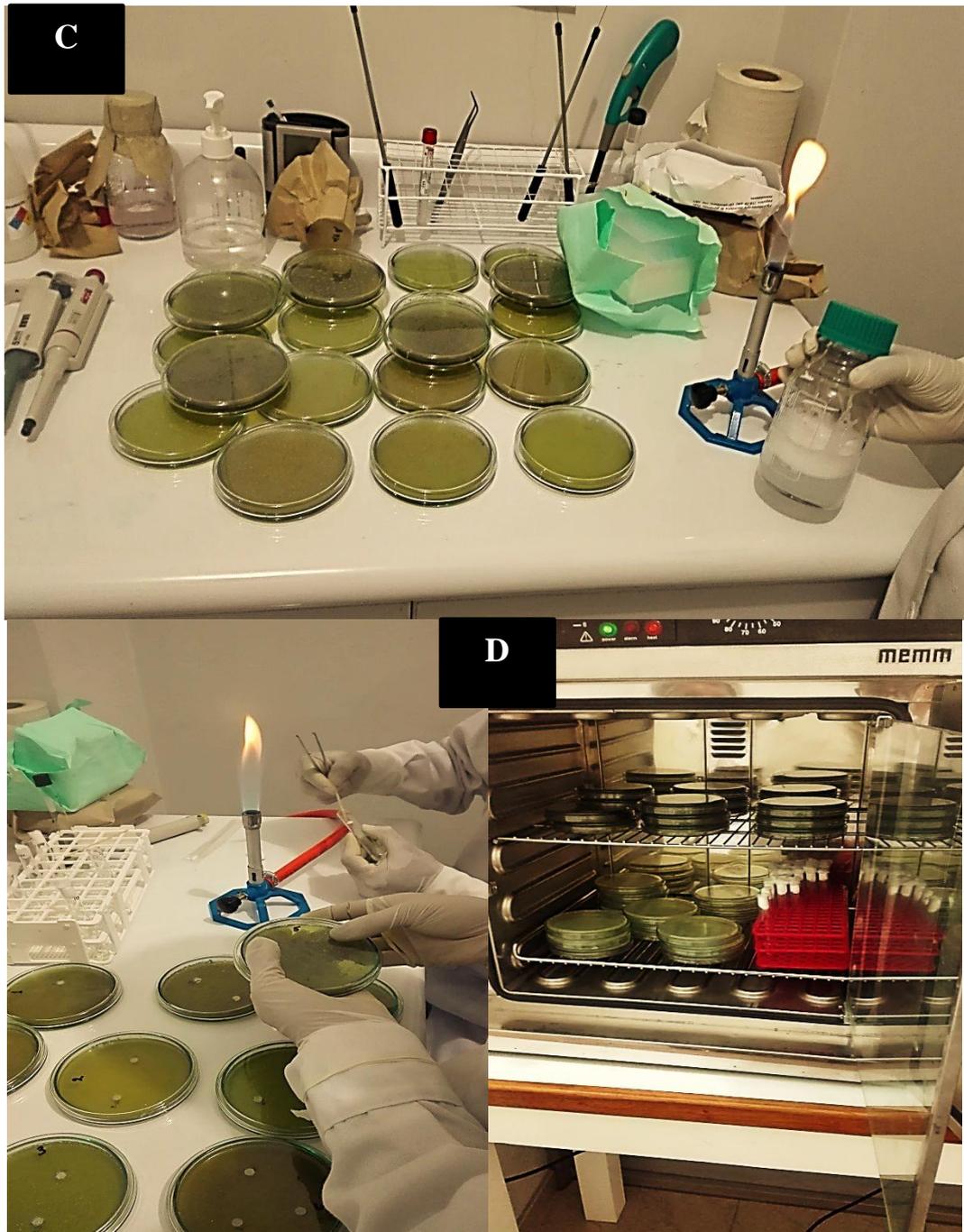


A. Tesistas con el equipo de caldera de acero inoxidable; B. Aceite esencial obtenido de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”, con ayuda del equipo de caldera de acero inoxidable y C. Recolección del aceite obtenido de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”

Anexo 4: Procedimiento para determinar el efecto antimicótico del aceite esencial de las hojas de la especie vegetal de *Salvia sagittata* “salvia azul” frente a la forma levaduriforme de *Sporothrix schenckii*.

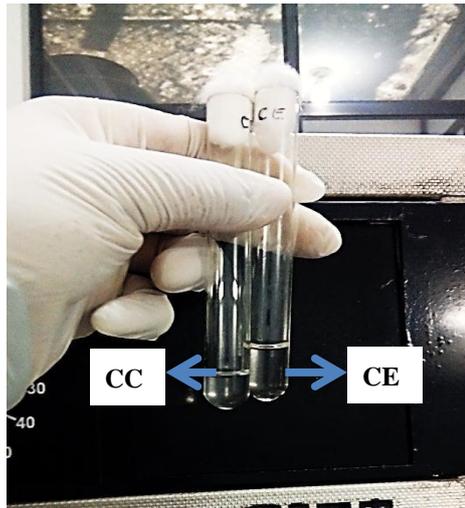


A. Preparación de los medios de cultivo; **B.** Siembra de la cepa de *Sporothrix schenckii*.

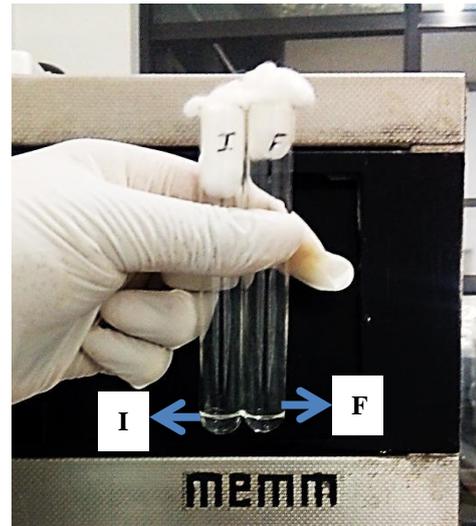


C. Placas con *Sporothrix schenckii* y D. Placas que contienen el aceite obtenido de las hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul”, para determinar su efecto antimicótico.

Anexo 5: Resultados obtenidos de las diferentes concentraciones del aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* "salvia azul" frente a la forma levaduriforme de la cepa de *Sporothrix schenckii* por el método de Macrodilución



CONTROLES
CC: Control de crecimiento
CE: Control de esterilidad



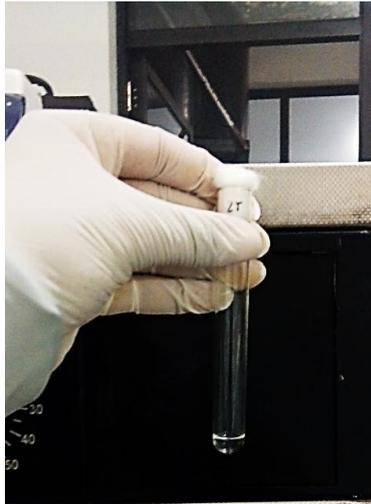
CONTROLES
I: Itraconazol (100 µg/100 mL)
F: Fluconazol (100 µg/100 mL)



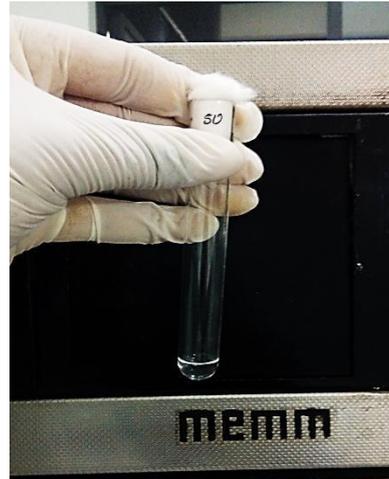
Aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* "salvia azul" al 6.25%



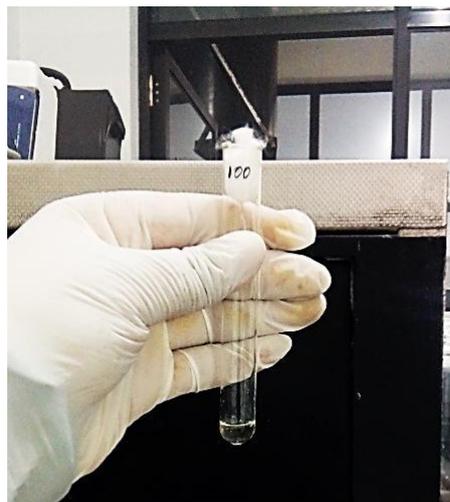
Aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* "salvia azul" al 12.5%



Aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” al 25%



Aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” al 50%

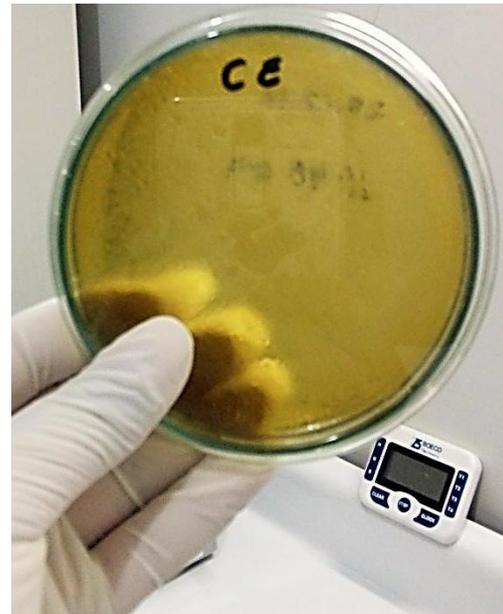


Aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” al 100%

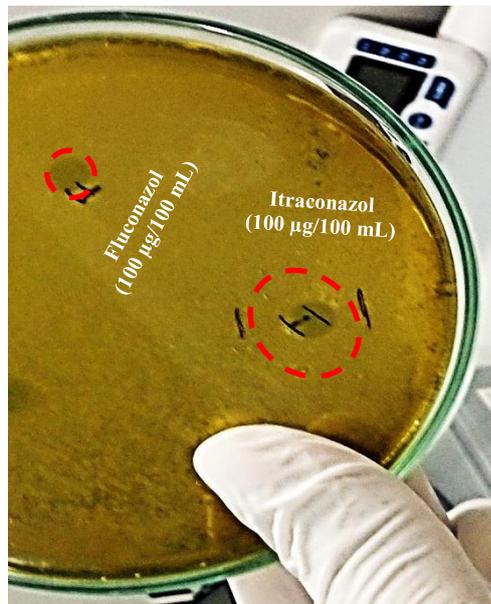
Anexo 6: Resultados obtenidos de las diferentes concentraciones del aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” frente a la forma levaduriforme de la cepa de *Sporothrix schenckii* por el método de difusión en disco.

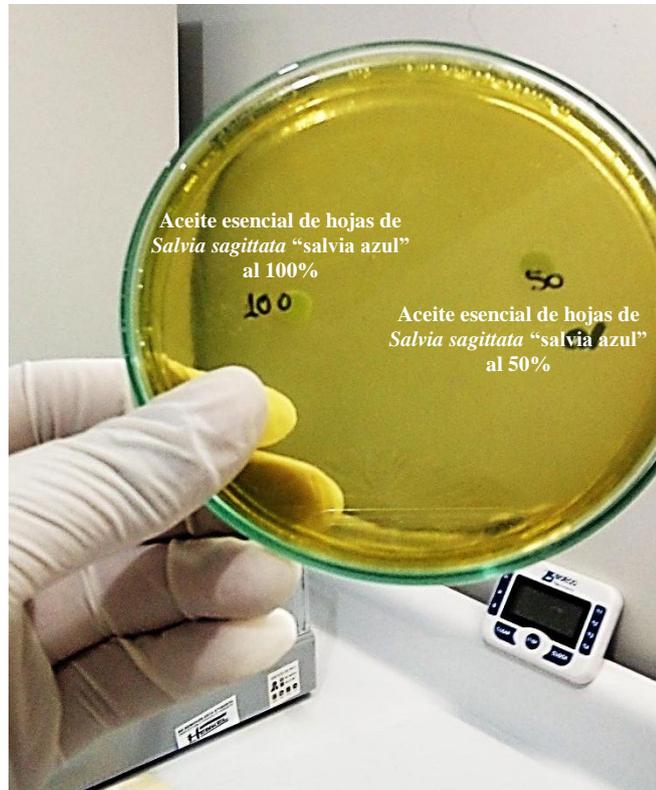
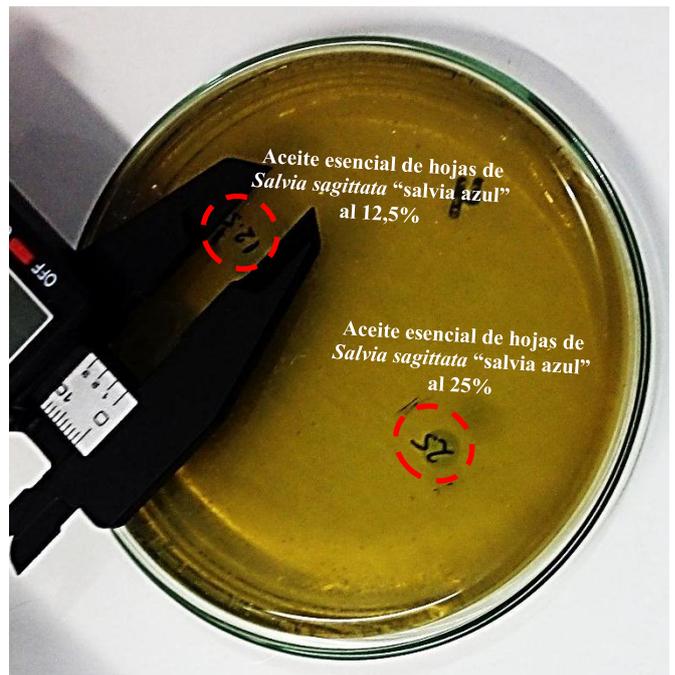


Control de crecimiento

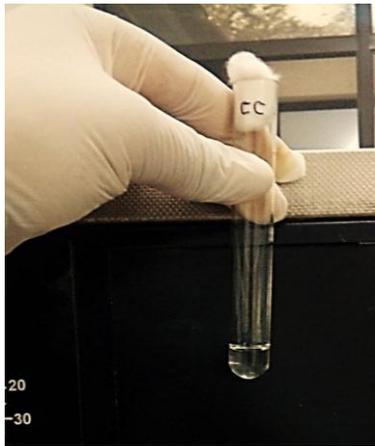


Control de esterilidad





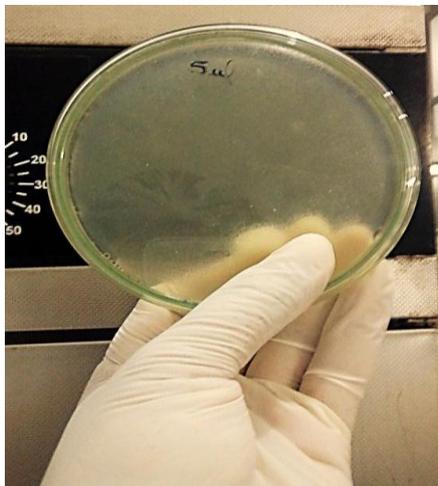
Anexo 7: Resultados obtenidos de las diferentes concentraciones del aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* “salvia azul” frente a la forma levaduriforme de la cepa de *Sporothrix schenckii* por el método de dilución en agar.



Control de crecimiento



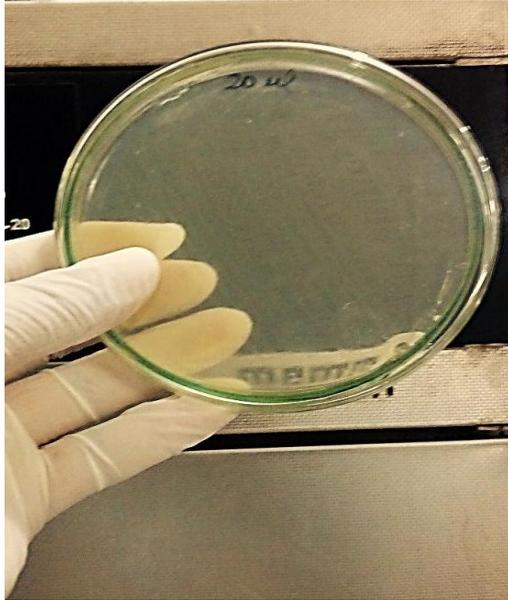
Control de esterilidad



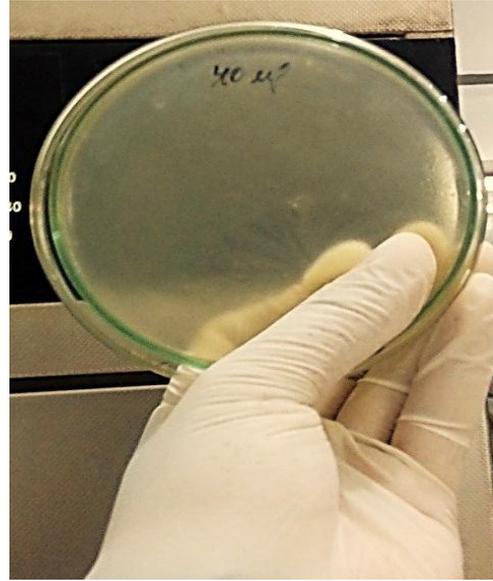
5 µL/mL de aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* “Salvia azul”



10 µL/mL de aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* “Salvia azul”



20 µL/mL de aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* "Salvia azul"



40 µL/mL de aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* "Salvia azul"



80 µL/mL de aceite esencial de hojas de *Salvia sagittata* "Salvia azul"

Anexo 8: Resultados del análisis estadístico

PRUEBA DE CHI CUADRADO PARA EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN PARA LA FORMA LEVADURIFORME DE *Sporothrix schenckii*

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
GRUPOS * CRECIMIENTO DE LA CEPA	35	100,0%	0	0,0%	35	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	35,000^a	6	0,000
Razón de verosimilitudes	28,708	6	0,000
Asociación lineal por lineal	5,667	1	0,017
N de casos válidos	35		

a. 14 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,71.

PRUEBA DE MANN-WHITNEY PARA DIFUSIÓN EN DISCO

Rangos

	GRUPOS	N	Rango promedio	Suma de rangos
HALOS DE INHIBICIÓN	PROBLEMA	25	20,70	517,50
	CONTROL	10	11,25	112,50
	Total	35		

Estadísticos de contraste^a

	halo de inhibi
U de Mann-Whitney	57,500
W de Wilcoxon	112,500
Z	-2,525
Sig. asintót. (bilateral)	0,012
Sig. exacta [2*(Sig. unilateral)]	0,012 ^b

a. Variable de agrupación: GRUPOS

b. No corregidos para los empates.

**PRUEBA DE CHI CUADRADO PARA EL MÉTODO DE DILUCIÓN EN
AGAR PARA LA FORMA LEVADURIFORME DE *Sporothrix schenckii***

Resumen del procesamiento de los casos

	Casos					
	Válidos		Perdidos		Total	
	N	Porcentaje	N	Porcentaje	N	Porcentaje
GRUPOS * CRECIMIENTO DE LA CEPA	25	100,0%	0	0,0%	25	100,0%

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	25,000^a	6	0,000
Razón de verosimilitudes	28,708	6	0,000
Asociación lineal por lineal	5,667	1	0,017
N de casos válidos	25		

a. 14 casillas (100,0%) tienen una frecuencia esperada inferior a 5. La frecuencia mínima esperada es ,71.

Anexo 9: Identificación de *Salvia sagittata* "salvia azul", en el herbario de la Universidad Nacional de Cajamarca

