



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE MEDICINA

TÍTULO

**Eficacia Anti-Micótica de las hojas de Ruta chalepensis L. “Ruda” sobre
Trichophyton rubrum, comparado con Clotrimazol, estudio in vitro**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO
PROFESIONAL DE MEDICO CIRUJANO**

AUTOR

VERA PUSCAN, JHIMY JHAN FRANCO

ASESORES

DRA. EVELYN GOICOCHEA RIOS

DRA. MARIA SOLEDAD AYALA RAVELO

MG JOSE LUIS FERNADEZ SOSAYA

MG JAIME POLO GAMBOA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRANSMISIBLES

Trujillo – Perú

2018

DEDICATORIA

A Dios.

Por otorgarme la dicha de haber nacido y de llegar hasta este punto, por dirigir mi camino y darme buena salud para lograr mis objetivos y metas, además de llenar mi vida de muchas bendiciones y amor.

A mis Padres Eduardo Vera y Elizabeth Puscan..

Que gracias a ellos y a Dios me dieron la dicha de vivir, por haberme siempre apoyado en momentos buenos y difíciles y ser mis pilares, por sus valores, sus consejos, por el aliento constante de ser una mejor persona para la sociedad y sobre todo por su amor que me brindaron a diario.

A mi novia Tatiana Silva.

Por haber llegado en el mejor momento de mi vida, por alentarme siempre a seguir adelante y a no rendirme a pesar de los problemas, y sobre todo porque me brindó amor incondicional.

Todo este trabajo ha sido posibles gracias a todos ellos y a los que siempre llevo en mi corazón y que no podre mencionar pero saben quiénes son, muchas gracias.

Agradecimiento

Gracias Dios por estar siempre conmigo y en cada etapa importante de mi vida, brindándome y ofreciéndome lo mejor, por tu bondad y tu amor y por permitirme vivir y sonreír al ver que mis logros que se fueron cumpliendo.

Gracias a mis padres Eduardo y Elizabeth por ser el motor y motivo de mis metas y sueños, por cada día creer y confiar en mí, gracias a mi madre por todas las regañadas y por sus muestras de afecto, gracias a mi padre por cada consejo en los momentos que más lo necesite. Gracias a ambos por todas sus palabras que me guiaron, me guían y me seguirán guiando durante toda mi vida.

A novia Tatiana le agradezco por todos los aportes y ayuda no solo para lograr en el desarrollo de mi tesis. Pues ella fue parte de mi motivación como un ingrediente perfecto, para poder alcanzar y lograr mi objetivo que es haber terminado con éxito mi tesis.

Gracias a mi Universidad Cesar Vallejo, a mis maestros que participaron de este proceso de alguna manera directa o no, gracias a mis asesores; la Dra Evelyn Goicochea Ríos por la ayuda y enseñanzas brindadas para la realización de mi tesis a la Dra María Ayala por ayuda en el procesamiento de los datos junto con el Mg Jaime Polo y por ultimo pero no menos Importante el Mg José Fernández Sosaya por sus consejos y correcciones de la tesis que el día de hoy se ve reflejado en la culminación exitosa, además que hoy se termina mi paso por la universidad, a todos ellos muchas gracias.

Este es un momento muy especial mi vida que espero siempre perdure en el tiempo.

Presentación

Yo, Vera Puscan Jhimy Jhan Franco pongo a disposición del jurado mi tesis titulada, Eficacia Anti-Micótica de las hojas de *Ruta chalepensis* L. “Ruda” sobre *Trichophyton rubrum*, comparado con Clotrimazol, estudio in vitro. Para ser evaluada y ser sustentada.

Índice

1. Resumen	8
2. Abstract	9
3. Introducción	
3.1 Realidad Problemática	10
3.2 Trabajos Previos	11
3.3 Teorías Relacionadas al tema	12
3.4 Formulación al Problema	15
3.5 Justificación del estudio	15
3.6 Hipótesis	16
3.7 Objetivo	
4. Método	
4.1. Diseño de investigación	16
4.2. Variables, operacionalización	17
4.3. Población y muestra	19
4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad	20
4.5. Métodos de análisis de datos	21
4.6. Aspectos éticos	21
5. Resultados	22
6. Conclusiones	25
7. Recomendaciones	25
8. Referencias	26
9. Anexos	27

RESUMEN:

Se realizó un estudio experimental durante el 2018 en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Cesar Vallejo Provincia de Trujillo, para establecer la **Eficacia Anti-Micótica de las hojas de Ruta chalepensis L. “Ruda” sobre Trichophyton rubrum, comparado con Clotrimazol, estudio in vitro**. Debido que la tiña pedís es una de las dermatofitosis más frecuentes y comunes de la consulta médica. Por ello se estudió el uso de la ruda, debido a que se encuentra al alcance de toda la población y que ha demostrado eficacia antimicótica frente a *Trichophyton rubrum* en diferentes métodos. Por lo cual se realizó un estudio experimental con múltiples repeticiones luego de una prueba piloto utilizando el extracto etanólico de la ruda. Los resultados demostraron eficacia a concentraciones del 100%, eficacia intermedia al 75%. Así mismo se encontró resistencia a concentraciones del 50% en una muestra de 20 repeticiones de placas petri con una población de 80 placas. Se concluyó que el extracto etanólico al 100% demostró ser eficaz como antimicótico frente al *Trichophyton rubrum* in vitro. Se siguieron las normas éticas para este tipo de investigación.

Palabras clave: Antifúngico, *Ruta chalepensis* L., *Trichophyton rubrum*.

ABSTRACT

An experimental study was carried out during 2018 in the Microbiology laboratory of the Cesar Vallejo University Province of Trujillo, to establish the Anti-Micotic Effectiveness of the Chalepensis l. "Ruda" on *Trichophyton rubrum*, compared with Clotrimazole, in vitro study. Because ringworm pedis is one of the most common and common dermatophytosis of the medical consultation. Therefore, the use of rue was studied, because it is available to the entire population and has demonstrated antifungal efficacy against *Trichophyton rubrum* in different methods. Therefore, an experimental study with multiple repetitions was carried out after a pilot test using the ethanolic extract of rue. The results showed efficacy at 100% concentrations, intermediate efficacy at 75%. Likewise, resistance was found at concentrations of 50% in a sample of 20 repeats of petri dishes with a population of 80 plates. It was concluded that the 100% ethanolic extract proved to be effective as an antifungal agent against *Trichophyton rubrum* in vitro. The ethical standards for this type of research were followed.

Key words: Antifungal, *Ruta chalepensis* L *Trichophyton rubru*.

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Realidad Problemática:

El Trichophyton rubrum es un microorganismo del tipo hongo antropofílico dermatofito que en su mayoría afecta a seres vivos como el ser humano. Es el origen más común y frecuente de enfermedades dermatológicas uno de las principales afecciones son la que cotidianamente llamamos pie de atleta, tiña y prurito del jockey. Además del causante de otras infecciones dermatológicas conocidas como micosis.^{6,7,8}

Las micosis visibles o también llamadas micosis de la capa exterior son patologías conocidas debido a diferentes conjuntos de hongos dañinos para el ser humano, que irrumpen las partes que contiene queratina en la piel, es decir, las uñas, estrato córneo, cabello y mucosas. Se encuentran colocados extensamente por toda la naturaleza en donde pueden existir y vivir en el cuerpo de la persona y todo nuestro organismo como parásitos o saprofitos. Solamente cierto número de especies de hongos estudiados y reconocidos son dañinos para el organismo humano^{7,8}

Las micosis han sido fraccionadas para ser estudiadas en tres grandes conjuntos o grupos: profundas o sistémicas; los superficiales y subcutáneas. Las formas superficiales abarcan las zonas limitadas por la piel, mucosa, uñas, y pelo. Las cuales son consideradas infecciones comúnmente frecuentes, en su mayoría ocurre en todas los grupos etarios, además, de que algunas son poco frecuentes en niños.

La asignación de la dermatofitosis es a nivel mundial y universal, de las cuales prevalecen las zonas con climas tropicales aceptables, húmedos y cálidos, encontrándose distintas características y diferencias en cuanto a su extensión geográfica, de tipos de dermatofitos, lo cual perjudica y daña tanto a varones como a mujeres y en todos los grupos etarios. La continuidad global sobre la patogenia de la micosis superficial es muy elevada, Según la OMS es del 20 a 25% de la población general, de los cuales el 5 al 10 % son por problemas asociados a dermatofitos. El hombre puede adquirir la patogénesis de distintos animales previamente contaminados o infectados como: ratas, gatos, perros, y entre otros animales que no necesariamente son no domésticos.⁶

La tiña pedis, es una infección dermatológica superficial que perjudica y afecta los pies, en su mayoría sobre todo los pliegues plantares e interdigitales, y con poca frecuencia el dorso,

teniendo un desarrollo en forma crónica, en su mayoría de forma subclínica con prurito y brotes irregulares de intensidad cambiante y variable. Los microorganismos que tienen más frecuencia son: *T. rubrum interdigitale*, *epidermophyton floccosum*, *T. mentagrophytes* y *T. mentagrophytes* var. ^{6,7,8}

El tratamiento ya está especificado para este tipo de problemas dermatológicos pero cierto grupo de personas en su mayoría de las zonas rurales y andinas del Perú no cuentan con la economía suficiente para adquirir medicamentos, no obstante, hacen uso de plantas medicinales para tratar la dermatomicosis, un ejemplo claro es el uso de maceración y de infusión de las hojas de *Ruta chalepensis* l. “ruda”. ^{6,7,8}

1.2. Trabajos Previos.

Cabrera Calderón S ⁹ (México, 2016) realizó un estudio de plantas nativas de la ciudad de México que contenían características y compuestos bioactivos, una de las plantas usadas fue *Ruta chalepensis* l. “ruda” estos compuestos fueron obtenidos por medio de una extracción asistida por ultrasonido con una similitud del 1:5 con etanol al 70% como solvente coadyuvante estableciendo en un tiempo de 30 min. Los estudios y pruebas que se realizaron *in vitro* con un conjunto de cuatro hongos como el: *Trichophyton rubrum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, Los exámenes que se realizaron *in vitro* fueron en tres diferentes concentraciones de extracto (1000, 2000 y 3000 ppm), en el cual se utilizó el procedimiento de prueba de difusión en agar. En los que se demostraron una alteración del estado de su madurez e inactividad o inhibición del desarrollo y crecimiento de los distintos hongos estudiados. Se realizó la incubación con un tiempo límite de 10 días, los extractos obtenidos de *Ruta chalepensis* l. “ruda” demostraron un 8.89% de mayor eficacia de inhibición en el desarrollo y crecimiento micelia.

No obstante, en los grupos estudiados a concentraciones de los extractos en partes por millón, se encontró que el 7.22% tuvo un menor porcentaje de inhibición o inactividad para el grupo de 2000 ppm, así como el 43.9% menor inactivación para los de concentraciones de 1000 ppm en comparación con la máxima inhibición de 3000 ppm de extracto en ambos estados de madurez de la *Ruta chalepensis* l. Observando al final de las comparaciones un efecto provocado por las especies de hongos utilizados, ya que los extractos estudiados presentaron en promedio; de 95.19% en *Trichophyton rubrum*, 85.14% en *A. alternata*,

72.5% de inhibición en *F. oxysporum* y 79% para *C. gloeosporioides*, en un periodo de incubación de 10 días

Reyes-Quintanar C¹⁰ (Mexico 2014) realizó un estudio en la ciudad de Puebla, acerca del efecto micelial de la ruda (*Ruta graveolens*) en el cual empleó un procedimiento de maceración en recipientes de laboratorio de vidrio de 3.78 litros de capacidad, en los cuales se mezclaron alrededor de 2 litros de solución de etanol de 96 °GL para así poder de cubrir o tapar completo el contenido. Se concentró y maceró por un periodo de 24 h a una temperatura 37°C o a temperatura de ambiente, posteriormente se realizó un filtrado. Tras cubrir en reiteradas ocasiones con solución de etanol, se repitió un segundo y tercer filtrado, para posteriormente estudiar y evaluar las cepas de *Trichoderma*.

Respecto al estudio de la cepa *Trichophyton rubrum*, la inhibición sobre la capacidad de su velocidad de desarrollo y crecimiento estuvo seriamente marcada con respecto al testigo desde el primer día hasta el quinto, estableciendo un porcentaje de inactividad del 81.4% el primer día y 51.9% el tercer día, llegando a completar su crecimiento y desarrollo para poder colonizar en su totalidad la caja de Petri hasta el sexto día, incluso 2 días más tarde que el testigo.

1.3. Teorías Relacionadas al tema

La *Ruta graveolens* L., “Ruda”, procede del griego *REUOI* que tiene el significado de ‘salvar’, ‘liberar’ o ‘proteger’, debido a sus virtudes y características medicinales. Y también del latín *GRAVELENS* que significa “olor pronunciado”. Es una planta exótica original de Asia y del Mediterráneo donde actualmente es el norte de África y Sur de Europa, y fue introducida en el Continente de América luego de la conquista de los colonizadores españoles.^{2,4}

Su uso data de siglo XVI, no obstante en Roma y Grecia la utilizaban como hierba medicinal, como método abortivo y sobre todo de uso culinario. Los frailes la cultivaban por sus conocidas propiedades antiafrodisiacas. Además la combinación de ruda, el ajo y el romero fueron necesarios en la composición del vinagre de los cuatro ladrones, utilizado en la gran epidemia de peste. Leonardo da Vinci y Miguel Ángel declaraban que la ruda les mejoraba la agudeza visual así como el sentido interno de la creatividad.³

En su descripción y características botánicas, se trata de una planta herbácea perenne de 50-90 cm de alto, con sus tallos redondos y una frondosidad verde azulado, con hojas alternas

de color verde azuladas, las cuales están subdivididas por segmentos espatulados u oblongos de aproximadamente unos quince milímetros de largo, en las cuales están sus glándulas translúcidas con el aceite esencial y necesario que es responsable de su aroma inconfundible y característico de sí mismo. Las flores de un color amarillento se agrupan haciendo su aparición o floreciendo dentro de las estaciones de verano y primavera, sus frutos son una especie de cápsulas redondeadas.^{1,2}

Sus hojas presentan dos capas en las cuales están contenidas estomas, la mayoría y se localiza en la parte inferior de los segmentos foliares. Se describe además que las células de la primera capa o capa superior son de un borde ligero y levemente ondulado o rectilíneo, y las de la cara inferior tienen una forma de características sinuosas. El mesófilo está caracterizado por presentar dos especies de capas en empalizada, de células bastante amplias y pequeñas, que presentan un parénquima esponjoso, la cual su capa inferior se acerca nuevamente a la forma en empalizada. En el mesófilo se logran encontrar esparcidas drusas de oxalato por lo que se puede observar grandes cantidades de depósitos de esquizolisígenos de concentración que logran alcanzar la epidermis. Las cuatro células epidérmicas que las cubren tienen normalmente una forma romboidal y están ubicadas por debajo del nivel de las demás.²

Los principales constituyentes y elementos químicos de la *Ruta graveolens* son: El óleo o aceite es entre (0,1-0,6%): combinado con ésteres (que son acetatos de 2-nonilo y 2-undeiclo, etc); no obstante el metilheptilcetona, metilnonil así como monoterpenos (a y b-pineno, limoneno), además de cetonas alifáticas (metilnonilcetona en un porcentaje del 90%), alcoholes como el 2-undecanol, cumarinas y furanocumarinas con proporción del 0,15-0,70% destacando: isoimperatorina, bergapteno, escopoletina, psoraleno, umbeliferona, dafnoretina, , pangelina, y otros más. En los alcaloides furoquinólicos tenemos el: 6-metoxidictamina, arborinina, graveolina, graveolinina, arborotina, rutamina, furoquinolina, además de otros. También están los flavonoides: rutina con un porcentaje del 1 al 2%, quercetina. No obstante hay otras sustancias en la planta como: ácido málico, resina, goma, taninos, lignanos (raíz), ácido ascórbico, sustancias amargas, glucósidos solubles en agua como; , metilpicraquasiósido, el sinapoil-6-feruloilsucrosa, metilcnidiósido, etc.²

Esta planta es cotidianamente conocida con el nombre de “*Ruda*”, “*Ruda Tropical*” “*Ruda Antillana*”, y “*Ruda de la Tierra*”. Es una planta poco exigente y normalmente crece casi en todas partes. Pero no obstante, los mejores resultados son en suelos bien drenados además de crecer incluso en escombros. En el continente se lo puede encontrar en Norte América,

Centro América y América del Sur, encontrándose frecuentemente en los andes. Como es el Perú.⁴

Esta planta ha sido incorporada y cosechada en numerosas países del mundo, gracias a sus resultados beneficiosos para la salud tales como: antiséptico, estimulante, antiespasmódico, favorece la secreción gástrica, favorece la diaforesis, hipotensor, calmante o sedante y también tiene buen efecto cicatrizado las heridas. En la medicina coloquial, esta especie de planta ha sido y es utilizada para mejorar dolencias como la otalgia, la faringitis, rinitis, artralgias, histeria, cólicos, amenorrea y menorragia, cefalea, neuralgias, también como para el meteorismo y, recientemente se estudió su actividad contra las bacterias y hongos.^{3,4}

Según su vía de administración la *Ruta graveolens L.*, “Ruda” por vía oral; también es utilizada para casos como; estimulantes diurético, para hacer gárgaras y desinflamar las amígdalas, en casos de anginas, palpitaciones del corazón, pleuritis, complicaciones respiratorias y calambres musculares.²

En sus efectos biológicos más importantes de la *Ruta graveolens L* tenemos antiparasitarias, espasmolíticas, virtudes venotónicas, foto sensibilizantes y recientemente antibacterianas²

Su uso antibacteriano del extracto acuoso de *Ruta graveolens* ha probado demostrar una acción que inhibe de manera in vitro frente a *Pseudomonas syringae*, *E. carotovora*, *Xanthomonas campestris* y *Erwinia amylovora*. No obstante, demostró actividad sobre *Culex quinquefasciatus* y un efecto inhibitorio en contra de *Popillia japónica*.²

Ruta chalepensis I. tiene acción antimicrobiana contra microorganismos como; *Micrococcus pyogenes var. aureus* y *E. coli*. Con respecto a este última bacteria mencionada, un estudio realizado con el extracto etanólico a partir de las hojas arrojó resultados no favorables y negativos. Pero en cambio frente a bacterias Gram-negativas aerobicas como *Pseudomonas aeruginosa* demostró efectos positivos e inhibitorios en dosis de 25 mg/mL. Asi mismo se observó que el mismo efecto sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* utilizando una dosis aproximada de 12,5 miligramos por decilitro.²

Esta planta ha demostrado no solo tener estos efecto ya mencionados si no ha logrado demostrar tener efectos sobre gran parte de nuestro organismo como a nivel neurológico,, sobre el sistema tegumentario, gastro intestinal y entre otros.

En cuanto al fármaco, el clotrimazol es un medicamento antifúngico imidazólico, que es empleado para tratar las dermatomicosis. Ciertas de las alteraciones producidas por estos agentes patógenos en las que el clotrimazol es eficaz son; la candidiasis oral, la vagina y la dermatofitosis. Debido a su adecuada acción y penetración a través de la piel este medicamento está indicado para tratar de las micosis subcutáneas.

Este fármaco cumple su acción alterando e interviniendo en la membrana sensible de los hongos. Inhibe e impide la síntesis y formación de ergosterol al interactuar y tener una afinidad con la 14-alfa-metilasa, que es nada menos que la enzima conocida del citocromo P450 que es necesaria para convertir el lanosterol en ergosterol, un elemento esencial de la membrana del hongo. El mecanismo de acción del clotrimazol es, pues, relativamente distinta al de la amfotericina B que cumple una función de unirse al ergosterol luego de que haya sido producido y sintetizado. La pérdida y ausencia de síntesis del lanosterol en la capa superficial del microorganismo eleva la penetración y permeabilidad en la célula produciendo un deterioro la pérdida de sustancias esenciales, como son los fosfatos y el potasio que se filtran y se liberan a través de las hendiduras de la membrana. No obstante, se postuló otros tipos de mecanismos de acción para el fármaco, en la cual se habla de la inhibición de la respiración endógena o por otro lado en la que presenta la interacción de los fosfolípidos de la membrana del hongo lo que imposibilita la transformación de los hongos a micelios.

1.4. Formulación del Problema

¿Las hojas de *Ruta chalepensis* L. “ruda” tiene eficacia anti micótica sobre *Trichophyton rubrum*, comparado con Clotrimazol, estudio in vitro?

1.5. Justificación del estudio

La tiña pedis es una patología de distribución mundial y es una de los tipos de dermatofitosis más comunes, encontrándose entre los primeros diez tipos de dermatosis más frecuentes y comunes de la consulta médica. Se cree que un gran número de personas de ambos sexos, presentaran tiña en sus pies, así sea de manera subclínica. La patogénesis por estos microorganismos es de distribución universal, pero destacan en los medios rurales. Daña principalmente a las personas de sexo masculino adultos y jóvenes que usan calzado cerrado, además se puede presentar en ambos sexos y a cualquier grupo etario. ⁷

Se conoce que hoy en día existe múltiples tratamientos farmacológicos para este tipo de problema, uno de ellos es el clotrimazol que tiene efecto antimicótico de amplio espectro contra diferentes hongos patógenos en especial el *Trichophyton rubrum*, no obstante también se ha encontrado un tratamiento de medicina alternativa para este tipo de patología como es la *Ruta chalepensis* L. “ruda” que posee efecto antimicótico frente al microorganismo mencionado

Motivo por el cual, se realizó este proyecto de investigación *in vitro* para demostrar la efectividad de la terapia con *Ruta chalepensis* L. “ruda” considerando que tiene una pertinencia social muy alta ya que se encuentra al alcance de toda la población en las tres regiones de nuestro país. Adicionalmente tiene un costo aceptable y accesible para la población. Es por eso que se desea demostrar la efectividad del aceite esencial de esta planta frente al Clotrimazol. ⁷.

1.6. Hipótesis

H₁: El extracto etanólico de las hojas de *Ruta chalepensis* L. “ruda” tiene eficacia anti micótica sobre *Trichophyton rubrum*, comparado con clotrimazol, estudio *in vitro*.

1.7. Objetivo

1.7.1. Objetivo General:

- A. Determinar la eficacia anti micótica de la ruda sobre *Trichophyton rubrum*, comparado con clotrimazol, estudio *in vitro*.

1.7.2. Objetivos Específicos:

- a. Establecer la eficacia de las hojas de *Ruta chalepensis* L. ruda como antimicótico sobre *Trichophyton rubrum* *in vitro*
- b. Establecer la eficacia del clotrimazol como anti micótico sobre *Trichophyton rubrum in vitro*
- c. Comparar la eficacia de ambos tratamientos

II. MÉTODO

2.1. Diseño de investigación

- 2.1.1 Diseño de Investigación: diseño experimental con múltiples repeticiones

Experimento con múltiples repeticiones con post prueba donde:

RG1 O 1 X1 O1

RG2 O 3 X2 O4

RG3 O 5 X3 O6

RG4 O 7 X4 O8

Donde:

G1: Dilución de la Ruda al 100%

G2: dilución de la Ruda al 75%

G3: dilución de la Ruda al 50%

G2: Tratamiento estándar con Clotrimazol

O: Las observaciones en este caso son posteriores al estímulo, porque no hay medición basal.

FACTOR:	Eficacia Anti-Miótica de la <i>Ruta chalepensis l. "ruda"</i>		
	SI	NO	GRUPO
RG1	A	B	CASO 1
RG2	C	D	CASO 2
RG3	E	F	CASO 3
RG4	G	F	TESTIGO

2.2. Variables operacionalización:

Variable Independiente: tratamiento antimicótico en *Trichophyton rubrum*

- a) No farmacológico: Extracto etanólico de *Ruta chalepensis l. "ruda"*
- b) Farmacológico: Clotrimazol

Variable Dependiente: eficacia antimicótica

- a) Eficaz: sensible al tratamiento anti nicótico.
- b) No eficaz: resistencia al tratamiento anti nicótico..

3.2.1. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

EXPERIMENTAL

VARIABLE	DEFINICION CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
V. I: Esquema de tto para Trichophyton rubrum	Para el tto de Trichophyton rubrumse utiliza: Tratamiento no farmacológico con Ruta chalepensis l. “ruda” Tratamiento farmacológico con Clotrimazol	La población fue dividida en los siguientes grupos: a) Ruda al 100% b) Ruda al 75% c) Ruda al 50% d) Clotrimazol e) Control negativo(agua destilada)	G1 G2 G3 G4	Cualitativa nominal
V. D: eficaz del tto	Es la disminución de de la patogenia de Trichophyton rubrum	Se consideró el diámetro del halo de inhibición en mm considerando eficaz cuando se halla sensibilidad en el producto anti-micotico : 1. Sensible 2. Intermedio 3. Resistente	≥15 mm 10-14 mm ≤10 mm	Cualitativa nominal

2.3. Población y muestra

2.3.1.- Población:

Estuvo constituida por 80 placas Petri cultivadas de *Trichophyton rubrum* en el laboratorio.

Por ser un estudio experimental se calculó con la fórmula estadística de estimación de comparación de dos proporciones sobre halos de inhibición en una prueba piloto para hallar el número de placas Petri necesarias que validen y verifiquen la investigación, por lo que se utilizara la siguiente fórmula.

$$n \geq \frac{\left(Z_{1-\frac{\alpha}{2}} + Z_{1-\beta} \right)^2 (\sigma_1^2 + \sigma_2^2 / r)}{(\mu_1 - \mu_2)^2} = 3$$

$Z_{1-\alpha/2} = 2.58$ (asumiendo un nivel de confianza del 99%)

$Z_{1-\beta} = 2.33$ (asumiendo una potencia estadística del 99%)

Promedio de grupo 1 (μ_1) = 16.8

Desviación estándar en el grupo 1 (σ_1) = 0.8

Promedio de grupo 2 (μ_2) = 2,3

Desviación estándar en el grupo 2 (σ_2) = 1.8

Tasa (grupo 2/grupo1) = 1

Luego de realizar una prueba piloto y obtener su promedio y su desviación estándar correspondiente se utilizó la fórmula de comparación de dos Promedios de la concentración al 75% de la muestra piloto y la del clotrimazol, en el cual se obtuvo como resultado que el tamaño de la muestra como mínimo sería 3 repeticiones de cada concentración de ruda y del clotrimazol.

2.3.2.- Muestra:

Las 20 repeticiones de cada placa petri de *Trichophyton rubrum* trabajada en el laboratorio de la Universidad Cesar Vallejo.

2.3.3.- Unidad de análisis:

Cada placa Petri de *Trichophyton rubrum* analizada en el laboratorio.

2.3.4.- Muestreo:

El muestreo es aleatorio simple ya que se trabajó con todas las Placas Petri de *Trichophyton rubrum* en el laboratorio.

2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad

2.4.1 La Técnica:

Se realizó por medio de la observación del experimento sobre si las hojas de *Ruta chalepensis* l. “ruda” tuvo eficacia anti micotica sobre *Trichophyton rubrum*, comparado con Clotrimazol.

2.4.2 Instrumento:

Se observó cada placa Petri, tomando en cuenta la concentración de cada muestra del extracto etanólico extraído de las hojas de la Ruda, además se observó y se tomó en cuenta el halo de inhibición de cada unidad de análisis que fue trabajada en el laboratorio de la universidad Cesar Vallejo, mediante nuestro instrumento de recolección de datos, el instrumento es una ficha simple de observación experimental (ver Anexo 01).

2.4.3.- Procedimiento de Recolección de Datos

Material Vegetal; se compró alrededor de 15 kilos de Ruda en el mercado “La Hermelinda” que posteriormente fueron llevados al laboratorio de la Universidad Cesar Vallejo, luego se realizó una limpieza ligera y superficial pero en seco, para poder eliminar restos de otras plantas ajenas, impurezas e insectos. Una vez realizado la limpieza se procedió a deshidratar a temperatura ambiente bajo sombra por alrededor 15 días aproximadamente. Una vez deshidratada la Ruda se empezó el procedimiento.

Modo de extracción; Se utilizó una técnica de maceración en unos frascos de vidrio de 3.78 L aproximadamente, en el cual se colocaron las hojas de Ruda deshidratada y luego en el mismo recipiente se le agregó 2 L aproximadamente de un solvente de etanol al 96 °GL cubriendo todo el contenido de las hojas, posterior a eso se dejó macerar por alrededor de 24 h a temperatura ambiente, se filtró con un tipo de papel filtro y luego se volvió a cubrir nuevamente el recipiente con el mismo solvente para macerar por otras 24 h para un segundo y tercer filtrado. El extracto filtrado que se obtuvo se mantuvo en una zona oscura a 4 °C. Una vez obtenido el total del extracto, se colocó en un rotavapor a 100 rpm a menos de 40

°C. Luego se secó a temperatura de ambiente y se mantuvo refrigerado hasta el momento de su uso.

Para analizar y evaluar las cepas de *Trichophyton rubrum* se empleó un medio de cultivo PDA, en las concentraciones establecidas de al 100%, 75%, y 50% de extracto extraído de la ruda. Luego se suspendió en 30 mililitros de agua destilada estéril aproximadamente en un agitador rotatorio a 110 rpm a una temperatura de alrededor de 35 °C por un tiempo de 45 min aproximadamente además de que fue centrifugado a 10 000 rpm, por un promedio de 5 min. La cepa utilizada fue la de *Trichophyton rubrum*. Para la cual se evaluó su crecimiento micelial, la cual se inoculó en un medio de cultivo PDA con extracto de ruda. Se colocó un disco de micelio de alrededor de 0.5 cm de diámetro y se midió el desarrollo micelial de forma radial y parcial a las 72 horas.

Luego de obtener resultados se procedió a tomar nota en nuestro instrumento de recolección de datos.

2.5. Métodos de análisis de datos

La información transcrita en la ficha de recolección de datos, fue procesada en la base de datos en el programa SPSS 20.0 versión para Windows, además la información fue presentada en las tablas de frecuencias simples y porcentajes. Para el análisis de la información se aplicaron las estadísticas de estimación de comparación de dos proporciones: como promedios, media, desviación estándar en los casos que corresponda.

Para el análisis inferencial se aplicó primero las pruebas de normalidad de Shapiro Wilks por ser una muestra pequeña con un total de 20 placas petri.

2.6. Aspectos éticos.

El estudio se realizó respetando los criterios de la Normas de Ética en la investigación considerados en la Declaración de Helsinsky, considerando que es un estudio experimental, se preservó la información obtenida que sólo tendrá acceso a ella el personal investigador

Se presentó al comité de ética para ser revaluado.

La bio eliminación de las placas petri se llevó a cabo con la observación de los asesores mencionados, para evitar problemas de contaminación en el ambiente a trabajar.

III. RESULTADOS

Tabla 1

Descriptivos									
HALO									
	N	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo	
					Límite inferior	Límite superior			
RUDA AL 100 %	20	22.10	2.075	0.464	21.13	23.07	19	25	
RUDA AL 75 %	20	15.25	1.618	0.362	14.49	16.01	13	18	
RUDA AL 50 %	20	10.20	1.508	0.337	9.49	10.91	8	12	
CLOTRIMAZOL	20	21.75	2.099	0.469	20.77	22.73	19	25	
Total	80	17.33	5.286	0.591	16.15	18.50	8	25	

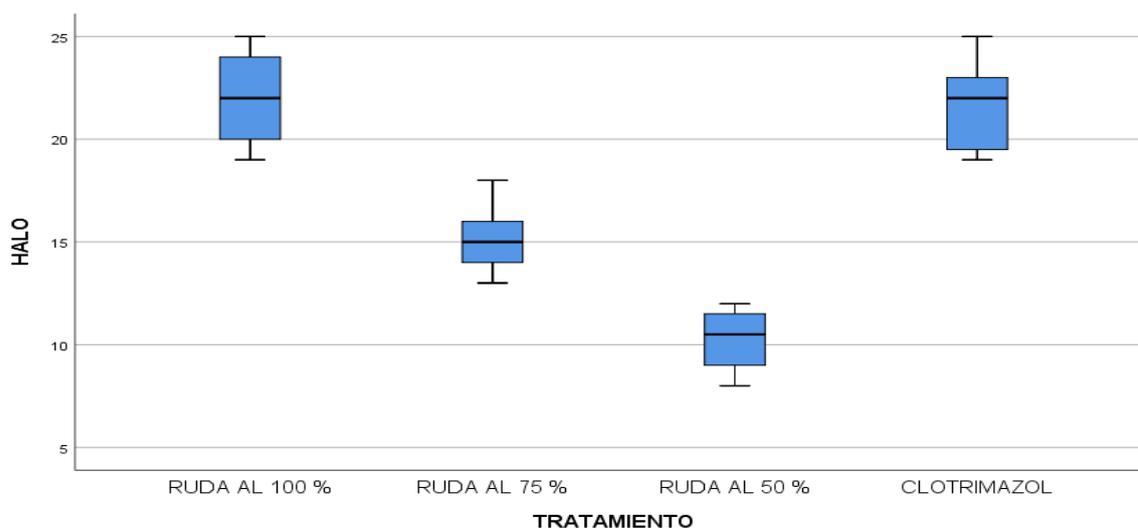
Esta tabla muestra los resultados obtenidos de cada concentración de ruda demostrando el máximo y el mínimo halo de inhibición según los indicadores establecidos, demostrando así la eficacia de la ruda en concentraciones al 100% en comparación con el clotrimazol,

Tabla 2

ANOVA						
HALO						
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.	
Entre grupos	1949.050	3	649.683	191.009	0.000	
Dentro de grupos	258.500	76	3.401			
Total	2207.550	79				

Como se observa en el cuadro estadístico el resultado de la significancia del ANOVA es menor que 0.05 lo que hace referencia a que existe una homogeneidad del tratamiento establecido que es la ruda frente al medicamento utilizado que el clotrimazol.

Grafico N° 1



Se observó que la ruda presenta un buena eficacia inhibitoria frente al *Trichophyton rubrum*. No obstante, se logró establecer la eficacia de ambos tratamientos por separado, demostrando que ambos que tanto la ruda como el Clotrimazol son tratamientos eficaces inhibiendo al microorganismo sobre todo mostrando mayor eficacia la concentración de ruda al 100% sin muestra de resistencia.

Tabla 3

**Pruebas post hoc
Subconjuntos homogéneos**

HALO				
Duncan _a				
TRATAMIENTO	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
RUDA AL 50 %	20	10.20		
RUDA AL 75 %	20		15.25	
CLOTRIMAZOL	20			21.75
RUDA AL 100 %	20			22.10
Sig.		1.000	1.000	0.550

Se realizó una la prueba post hoc en la cual se observó que el clotrimazol y la concentración de extracto de ruda al 100% tienen una homogeneidad muy significativa demostrando así que su eficacia comparativa fue similar frente a la inhibición contra el *Trichophyton rubrum*, por otro lado se observó que las concentraciones de ruda al 50% el patógeno mostró una resistencia y como resultado intermedio se encontró las concentraciones de ruda al 75%.

IV. DISCUSIÓN

La prueba in vitro mostró la eficacia de la ruda a diferentes concentraciones sobre la inhibición y el crecimiento micelial del *Trichophyton rubrum*, en un tiempo de incubación de 72 horas, tiempo correspondiente a la tasa de crecimiento mínimo de la mayoría de los hongos.

En lo que se refiere a las concentraciones del extracto de la ruda al 100 % se obtuvo una inhibición micelial favorable con un halo de inhibición mayor a 15 mm, según los indicadores establecidos donde se explica que un halo de inhibición mayor a ≥ 15 mm demostrará ser eficaz con una sensibilidad al tratamiento anti-micótico. No obstante, las concentraciones de ruda al 75% se obtuvieron resultados con un halo de inhibición entre 10 y 14 mm los cuales reflejan que hay una inhibición a nivel intermedio, por otro lado las concentraciones de ruda al 50% demostró no ser tan eficaz como lo esperado por presentar halos de inhibición < 10 mm reflejando una resistencia del patógeno frente al tratamiento establecido.

El estudio y análisis estadístico demostró una diferencia significativa menor ($p \leq 0.05$) entre las concentraciones del extracto de ruda al 100%, al 75% y al 50% frente a *Trichophyton rubrum*, además que si cumplió con la regla de normalidad, no obstante se logró demostrar que el tratamiento alternativo usado presentó una homogeneidad similar en la eficacia entre la concentración de ruda al 100% con el clotrimazol e incluso demostró ser superior al medicamento, (gráfico N°1 y tabla 3).

Por ello los resultados obtenidos concuerdan con los estudios realizados por Cabrera Calderón S.⁹ (México, 2016) que reportaron la inhibición de crecimiento micelial de *Trichophyton rubrum*, por medio de una extracción asistida por ultrasonido con una similitud del 1:5 con etanol al 70% en tres diferentes concentraciones de extracto (1000, 2000 y 3000 ppm), el cual demostró que los extractos estudiados presentaron en promedio una inhibición micelial de un 95.19%. Así mismo Reyes-Quintanar C. (México 2014) realizó un estudio utilizando la maceración de la ruda con solución de etanol de 96 °GL, los resultados demostraron que para la cepa *Trichophyton rubrum*, la inhibición sobre la capacidad de su velocidad de desarrollo y crecimiento micelial fue seriamente marcada con respecto al testigo desde el primer día, con un porcentaje de inactividad del 81.4%, Estos estudios previos reflejan y avalan los resultados obtenidos en el proyecto de investigación realizados,

V. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de *Ruta chalepensis* L. demostró ser eficaz como antimicótico frente al *Trichophyton rubrum* en pruebas in vitro.
2. Se observó también que el *Trichophyton rubrum* mostró una resistencia al extracto etanólico de *Ruta chalepensis* L. en concentraciones del 50%
3. Se demostró que la ruda al 100% es eficaz con respecto al crecimiento micelia en comparación con el clotrimazol.

Vi. Recomendaciones

- _ Aplicar y realizar un estudio enfocado en las características del extracto etanólico de *Ruta chalepensis* L. Ruda para poder determinar su mecanismo de acción y eficacia en otros hongos que tengan importancia médica.
- _ Evaluar la actividad anti fúngica de extracto etanólico de *Ruta chalepensis* L. Ruda en comparación con otros fármacos antifúngicos.
- _ Se recomienda realizar y aplicar pruebas in vivo para valorar y estimar la eficacia del extracto etanólico para determinar sus dosis terapéuticas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Escamilla B, Pérez C. Guía Manual de plantas medicinales de La Matamba y El Piñonal, Municipio de Jamapa, Veracruz, , primera edición, Instituto de Ecología A. C. (INECOL), Mexico, 2015
2. Grigorjev C, Nilda Y, Guía manual, Ruta graveolens L, “Ruda”, Instituto nacional de Chile
3. Revista de la Facultad de Ciencias Médicas, Sobre el efecto de la “RUDA” sobre la actividad del musculo liso, Universidad de Cordova 2010.
4. Instituto de Investigaciones de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Estudio del aceite esencial de Ruta graveolens L.,Med, Universidad de Los Andes Venezuela. Febrero 2009.
5. Ochaita P, Micosis superficiales cutáneas. Dermatología texto y atlas, 3ra. ed. Madrid. Ed.Meditecnica S.A. 2003:
6. Héctor K, Rebeca M, Leonardo S, Infecciones Micóticas Superficiales, Dermatología Peruana 2009, Vol 19(3)
7. Grupo Saned, Guía, Tiña interdigital de los pies “Pie de Atleta diagnóstico y últimos avances en su tratamiento, Madrid España2008
8. Ollague A, Calero H, Micosis Sub Cutáneas, superficiales y sistémicas. En Dermatología práctica. 2da. ed Guayaquil. 2007:
9. Cabrera A, Efecto Antifúngico del extracto de *Ruta chalepensis* sobre hongos. ed 1, (2016)
10. Reyes C, Martínez D, Morales P, Sobal M, Escudero A, Ávila J, Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en el crecimiento micelial de *Trichoderma*, , Rev. Mex. Cienc. Agríc. Diciembre 2014, 5.
11. Jimenez P, Efectos de los Extractos Polares de *Ruta graveolens*, *Nicotiana tabacum* y *Chrysanthemum morifolium* SOBRE EL HONGO *Botrytis cinerea* De La Mora De Castilla (*Rubus glaucus* Benth), [Tesis de bachiller] México, Universidad Tecnológica de Pereira, México 2013.
12. Goodman y Gilman, Laurence L, Brunton, Jhon S, Lazo, Keint L, Parker, Bases Farmacológicas de la Terapéutica, 12 ed, México: ED MC Graw Hill L Interamericana Editores, S.A.,2009

ANEXOS

Cuadro de la prueba piloto

Datos obtenidos del plan piloto			
EFECTO INHIBITORIO EN (mm)			
100%	75%	50%	Clotrimazol
22	18	12	24
21	16	9	20
20	17	9	23
25	17	8	23
25	16	10	25

Cuadro de promedio y desviación estándar según porcentajes para obtener el número de muestra

Promedio	22.6	16.8	9.6	23
Desviación Estandar	2.30	0.84	1.52	1.87

Instrumentos

ANEXO 01

Instrumento de recolección de Datos de cada placa Petri

Población de placas Petri	EFECTO INHIBITORIO EN (mm)				
	Extracto etanólico de Ruda				
	100%	75%	50%	Clotrimazol	DMSO
1					
2:					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					

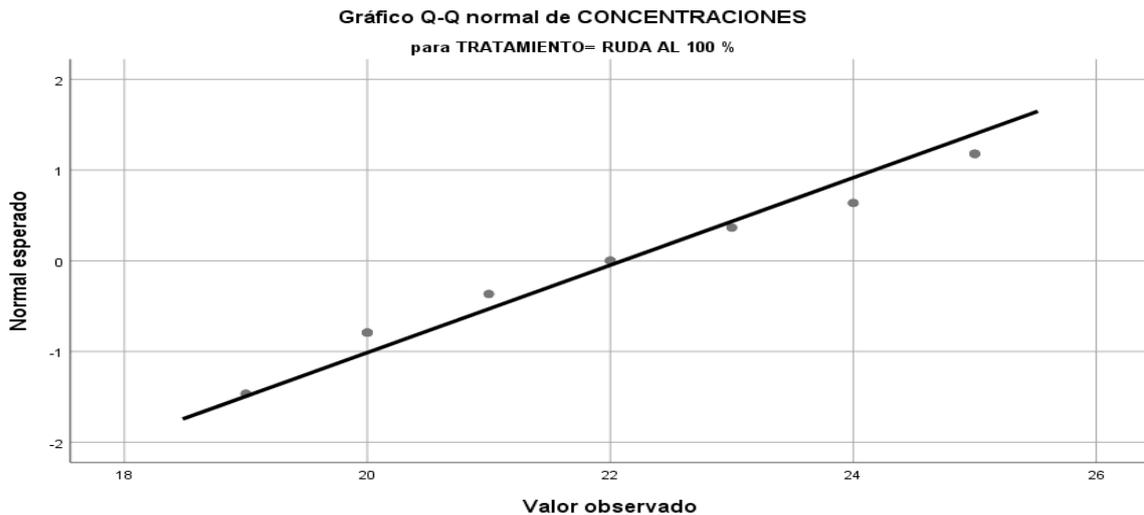
Instrumento de recolección con datos de cada placa Petri

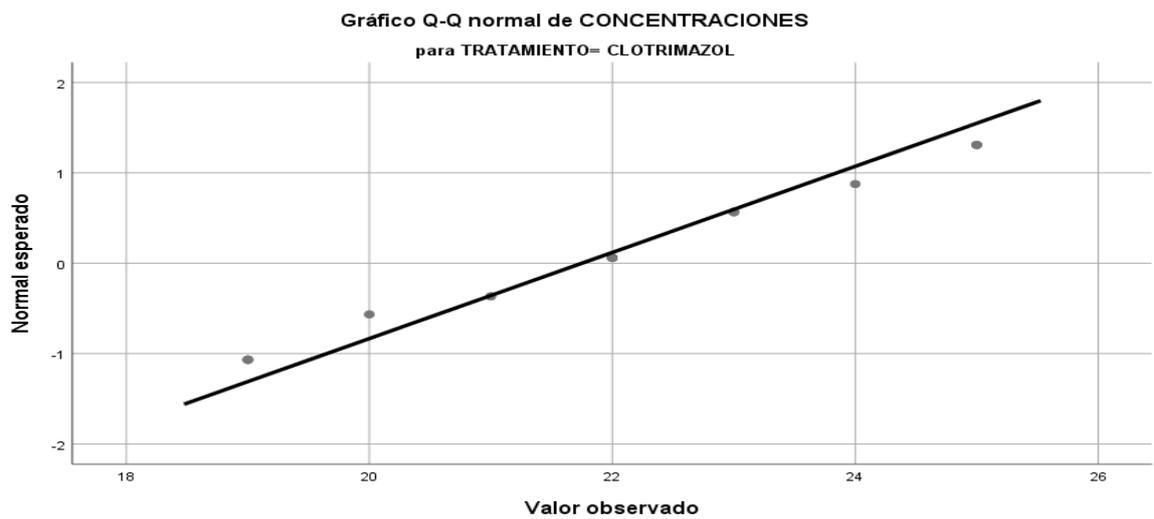
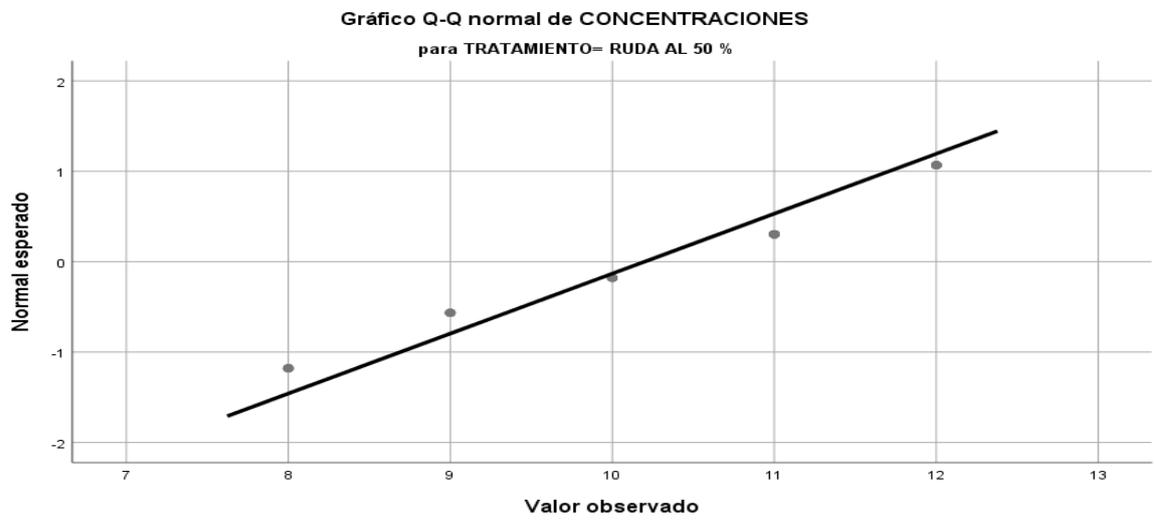
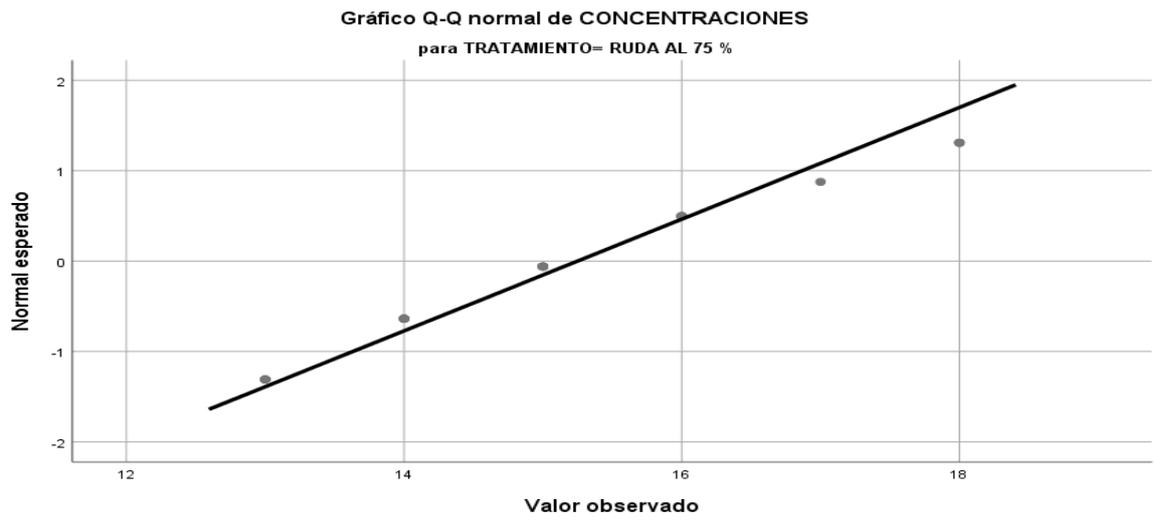
Poblacion de placas Petri	EFECTO INHIBITORIO EN (mm)				
	Extracto etanólico de Ruda			Clotrimazol	DMSO
	100%	75%	50%		
1	25	15	11	22	0
2	20	18	8	19	0
3	20	14	9	22	0
4	20	17	11	22	0
5	19	14	10	23	0
6	22	16	12	22	0
7	24	15	9	19	0
8	22	16	10	23	0
9	20	13	11	24	0
10	22	13	8	25	0
11	19	15	11	25	0
12	21	16	12	22	0
13	24	16	10	21	0
14	25	18	11	19	0
15	25	18	9	19	0
16	22	14	12	19	0
17	23	14	8	20	0
18	23	13	8	21	0
19	21	15	12	23	0
20	25	15	12	25	0

Pruebas de normalidad

TRATAMIENTO		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
CONCENTRACIONES	RUDA AL 100 %	0.144	20	,200*	0.914	20	0.075
	RUDA AL 75 %	0.161	20	0.183	0.918	20	0.090
	RUDA AL 50 %	0.202	20	0.032	0.873	20	0.013
	CLOTRIMAZOL	0.155	20	,200*	0.903	20	0.047

Según la reglas de normalidad usando la fórmula de Shapiro-Wilk por ser una muestra pequeña y teniendo en cuenta los resultados se concluye que cumple con la regla de normalidad y que se ajustan a una distribución normal y estándar ya que el valor "P" es mayor de 0.5 en su nivel de significancia.





Prueba de homogeneidad de varianzas

		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
HALO	Se basa en la media	1.153	3	76	0.333
	Se basa en la mediana	0.961	3	76	0.416
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	0.961	3	68.591	0.416
	Se basa en la media recortada	1.194	3	76	0.318