

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA CALÉNDULA
(*Caléndula officinalis*, L.), COMO TRATAMIENTO IN VITRO EN LA
DERMATOFITOSIS CAUSADA POR *Trichophyton sp.***

**ERNESTO CAMILO BURGOS GUERRERO
SEGUNDO ALEXANDER RIASCOS CABRERA**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
SAN JUAN DE PASTO
2013**

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LA CALÉNDULA
(*Caléndula officinalis*, L.), COMO TRATAMIENTO IN VITRO EN LA
DERMATOFITOSIS CAUSADA POR *Trichophyton sp.***

**ERNESTO CAMILO BURGOS GUERRERO
SEGUNDO ALEXANDER RIASCOS CABRERA**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Médico Veterinario**

**Presidente:
JUAN MANUEL ASTAIZA MARTÍNEZ
Médico Veterinario Zootecnista Esp.**

**Copresidente
ÁNGEL MARÍA ZAMORA BURBANO
MSc Sistemas de Gestión Ambiental**

**UNIVERSIDAD DE NARIÑO
FACULTAD DE CIENCIAS PECUARIAS
PROGRAMA DE MEDICINA VETERINARIA
SAN JUAN DE PASTO
2013**

“las ideas y conclusiones aportadas en el trabajo de grado son responsabilidad exclusiva de los autores”

Artículo 1 del acuerdo 324 de Octubre 11 de 1966, emanado en el honorable consejo directivo de la Universidad de Nariño

Nota de aceptación:

JUAN MANUEL ASTAIZA MARTÍNEZ
Presidente

ÁNGEL MARÍA ZAMORA-BURBANO
Copresidente

SANDRA XIMENA SALAS
Jurado Delegado

EDMUNDO ANDRÉS TIMARAN
Jurado

San Juan de Pasto, marzo 25 de 2013

AGRADECIMIENTOS

ÁNGEL MARÍA ZAMORA-BURBANO	M. Sc. Sistemas de Gestión Ambiental.
BOLÍVAR LAGOS FIGUEROA	Médico Veterinario Zootecnista. Esp.
EFRÉN INSUASTY SANTACRUZ	Zootecnista M.Sc.
JUAN MANUEL ASTAIZA MARTÍNEZ	Médico Veterinario Zootecnista M.Sc.
KATIA BENAVIDES ROMO	Médico Veterinario.
LESVY RAMOS OBANDO	Zootecnista. IPA.
YANNY MILENA RUIZ	Médico Veterinario. Esp.

DEDICATORIA

A mi Mamá Clementina por su amor, confianza y comprensión.

Mi Hermano Jesús Enrique por apoyarme y acompañarme en este camino.

Y a mi Ángel de la guarda mi abuela María que me cuida todos los días desde el cielo.

ERNESTO CAMILO BURGOS GUERRERO

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso por darme la vida y la salud para cumplir con el sueño más grande en mi vida.

A mi abuela Virginia Pantoja (Q.E.P.D) por darme el mejor ejemplo de cariño y respeto por los animales y su gran amor que aun estando lejos lo siento cerca.

A mis padres por ser el motor y darme el mejor ejemplo.

A mi hermana y mi sobrina por brindarme momentos muy bellos en la vida.

A mis maestros por brindarme el conocimiento.

A mis amigos por los buenos momentos y su ayuda sobre todo a Alejandro Jiménez quien más que un amigo es como un hermano.

A los Doctores Carlos Hernán Vásquez Motoa, Jesús María Vásquez Motoa y a la Ingeniera Mariana García Escobar por darme la oportunidad de aprender de ellos tanto a nivel profesional como personal.

Al señor Jesús Ortega por su gran apoyo a lo largo de mi práctica.

Y a todos los que hicieron posibles cumplir esta meta.

SEGUNDO ALEXANDER RIASCOS CABRERA

RESUMEN

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de Nariño, con el objeto de determinar si la planta medicinal (*Caléndula officinalis*, L.) posee efecto antifúngico *in vitro* útil para el tratamiento de la dermatofitosis causada por *Trichophyton sp.* en el cuy (*Cavia porcellus*).

La determinación de la actividad antifúngica se realizó por el método de difusión en placa empleando microdiscos impregnados con Tintura Madre de *Caléndula officinalis*, L. y sus diluciones al 20, 40 y 60%; nistatina como control positivo y etanol como control negativo

Para evaluar las diferencias estadísticas se utilizó el modelo unifactorial de efectos fijos con 6 tratamientos, cada uno con 14 réplicas, en el análisis estadístico se utilizó la prueba de Tukey.

Los resultados del estudio demostraron que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los tratamientos *Caléndula officinalis*, L., TM y sus diluciones al 20%, 40% y 60%.

Los porcentajes de inhibición relativa (PIR) para los tratamientos fueron los siguientes: *Caléndula officinalis*, L., TM = 0%, dilución al 60% = 0%, dilución al 40% = 0%, dilución al 20% = 0%, etanol 90° = 0%.

Luego de observar los resultados obtenidos en el estudio se concluye que la tintura madre de caléndula (*Caléndula officinalis*, L., TM) y sus diluciones al 20, 40 y 60% como tratamiento *in vitro* contra la dermatofitosis producida por *Trichophyton sp.* no son recomendables, puesto que no poseen actividad antifúngica.

ABSTRACT

The present work was done in the Microbiology Laboratory of Nariño's University, to determine if the medicinal plant (*Calendula officinalis*, L.) has an in vitro useful antifungal effect for the treatment of the dermatofitosis caused by *Trichophyton sp* in the Guinea pig (*Cavia porcellus*).

The determination of the antifungal activity was performed using the disk diffusion test using microdisks impregnated with Mother Tincture of *Calendula officinalis*, L, and its dilutions at 20, 40 and 60%, nystatin as positive control and ethanol as negative control.

An univariate fixed effects model was used to assess the statistical differences with 6 treatments, each with 14 replications. In the statistical analysis we used the Tukey test.

No statistically significant differences were found in the treatments *Calendula officinalis*, L., TM and their dilutions at 20%, 40% and 60%.

Relative inhibition percentages (RIP) for the treatments were: *Calendula officinalis* L., TM = 0%, 60% dilution = 0%, 40% dilution = 0%, 20% dilution = 0%, ethanol 90 ° = 0%.

After observing the results obtained in the survey we conclude that Mother Tincture of *Calendula* (*Calendula officinalis* L., TM) and its dilutions at 20, 40 and 60% as an in vitro treatment against dermatophytosis caused by *Trichophyton sp*. are not recommended, because they do not have antifungal activity.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	
1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	20
2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GENERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. CONTENIDO	
4.1 GENERALIDADES DEL CUY	23
4.1.1 Origen y clasificación zoológica	23
4.1.2 Sistemas de producción	23
Producción familiar	23
Producción familiar comercial	24
Producción comercial	24
4.1.3 Sanidad y enfermedades	24
4.1.3.1 Enfermedades infecciosas	25
4.1.3.2 ENFERMEDADES PARASITARIAS	27

4.2 DERMATOFITOSIS EN EL CUY	28
4.2.1 Etología	28
4.2.2 Transmisión	28
4.2.3 Sintomatología	28
4.2.4 Diagnóstico	29
4.2.5 Tratamiento	31
4.2.6 Identificación	32
4.3 CALÉNDULA	34
4.3.1 Historia y origen del cultivo	34
4.3.2 Descripción botánica	35
4.3.3 Clasificación taxonómica de la caléndula	35
4.3.4 Ecología y adaptabilidad	36
4.3.5 Labores de cultivo	36
4.3.5.1 Elección de semilla	36
4.3.5.2 Siembra	36
4.3.5.3 Labores	36
4.3.6 Enfermedades que pueden afectar a la caléndula	37
4.3.7 Usos y aplicaciones	37
4.3.8 Rendimientos	
4.4 FITOTERAPIA	40
4.5 TINTURAS MADRE	40
4.5.1 Preparación de las tinturas madres (TM)	41
4.5.2 Dilución de tintura madre	41

4.5.3	Recolección y preparación de la caléndula	42
4.6	RESIDUOS DE FÁRMACOS EN ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL	42
4.7	ELABORACIÓN DE LA TM DE <i>Caléndula officinalis</i> , L, Y SUS DILUCIONES.	43
4.7.1	Colecta y extracción del material vegetal	42
4.7.2	Proceso de dilución de la TM de <i>Caléndula officinalis</i> , L.	45
4.8	PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	45
4.9	PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR EL EFECTO ANTIFÚNGICO	45
5.	DISEÑO METODOLÓGICO	47
5.1	Localización	47
5.2	Muestra	47
5.3	Instalaciones y equipos	51
5.4	Diseño experimental	53
5.4.1	Variables a evaluar	55
6.	PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	56
6.1	Medidas de halos inhibitorios	56
6.1.1	Prueba de contraste múltiple de rango (TUKEY)	57
6.2	Porcentajes de inhibición relativa (PIR)	58
7.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	59

7.1 Conclusiones	59
7.2 Recomendaciones	59
BIBLIOGRAFÍA	60
ANEXOS	66

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. Animales y muestras usados en el estudio	46
Cuadro 2. Identificación de muestras para siembra	48
Cuadro 3. Siembras realizadas para el estudio	48
Cuadro 4. Identificación de colonias sembradas para el estudio	49

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Identificación morfológica	33
Figura 2. <i>Caléndula officinalis</i> , L.	34
Figura 3. Lesiones de Dermatofitos en los animales muestreados	47
Figura 4. Lesiones cutáneas en los animales objeto de muestra	47
Figura 5. Caja con siembra de <i>Trichophyton</i> sp.	50

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Determinación del porcentaje de humedad de las flores frescas de caléndula.	42
Tabla 2. Cálculo de la concentración de alcohol para preparar la tintura madre.	43
Tabla 3. Prensado realizado para obtener el número de repeticiones.	54
Tabla 4. Varianza de los datos del pre ensayo.	55
Tabla 5. Halos inhibitorios obtenidos con los tratamientos.	55
Tabla 6. Medias de los tratamientos.	56
Tabla 7. Test Tukey.	57
Tabla 8. Porcentajes de inhibición relativa obtenidos con los tratamientos.	58

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Elaboración de la <i>Caléndula officinalis</i> , L., TM.	65
Anexo B. Elaboración de las diluciones de <i>Caléndula officinalis</i> , L., TM.	65 - 66
Anexo B. Identificación de dermatofitos con KOH.	66 - 67
Anexo C. Equipos.	67 - 68
Anexo D. <i>Trichophyton sp.</i> Vista al microscopio.	69
Anexo E. Control positivo (nistatina).	69
Anexo F. <i>Caléndula officinalis</i> , L., TM y sus diluciones.	70

GLOSARIO

ANTIFÚNGICO: dicho de un medicamento, una sustancia, un procedimiento, etc. Que se utilizan para combatir las infecciones por hongos.

ASCITIS: acumulación de líquido seroso en la cavidad abdominal.

DERMATOFITOS: hongos filamentosos que afectan a la epidermis y anexos cutáneos.

DILUCIÓN: hacer que disminuya la concentración de un soluto, generalmente añadiéndole un solvente u otra sustancia, preferiblemente agua.

CONIDIOS: espora asexual formada de hifas por abstricción, gemación o división septal.

EXTRAETIQUETA: se refiere aquellas situaciones en las que se utiliza un medicamento fuera de lo establecido en su etiqueta.

FITOTERAPIA: (de Fito y terapia). Tratamiento de las enfermedades mediante plantas o sustancias vegetales.

HALO INHIBITORIO: zona de inhibición del crecimiento de hongos.

HIFAS: filamentos que componen el cuerpo de un hongo.

HOSPEDERO: ser vivo que soporta un parásito de manera temporal o permanente (huésped: animal o vegetal a cuya costa vive un parásito).

IN VITRO: producido en el laboratorio por métodos experimentales.

LESIÓN ENDOTRIX: lesión que ocurre al interior del cilindro piloso.

LESIÓN ECTOTRIX: lesión que ocurre al exterior del cilindro piloso.

MACERAR: mantener sumergida alguna sustancia vegetal en un solvente a temperatura ambiente, con el fin de ablandarla para extraer de ella los componentes solubles.

MACROCONIDIO: conidios multinucleados, grandes.

MICELIO: malla constituida de hifas entrelazadas.

MICROCONIDIO: conidios de una célula, pequeños, pueden ser esféricos, elípticos u ovales, piriformes colocados entre las hifas.

NECROPSIA: es un procedimiento científico por el cual se estudia un cadáver animal o humano para tratar de identificar la posible causa de la muerte.

PORTADOR ASINTOMÁTICO: es una persona o animal, aparentemente sano, que no presenta enfermedad clínica aparente, que alberga el agente infeccioso y que puede servir de fuente de contagio.

RESISTENCIA: es la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de un medicamento.

RESPUESTA INMUNOLÓGICA: es la forma como el cuerpo reconoce y se defiende a sí mismo contra bacterias, virus y sustancias que parecen extrañas y dañinas.

TINTURA: solución de cualquier sustancia medicinal simple o compuesta, en un líquido que disuelve de ella ciertos principios. Puede ser acuosa, vinosa, alcohólica o etérea.

TIEMPO DE RETIRO: tiempo transcurrido entre la última aplicación de un medicamento veterinario a un animal determinado, en condiciones normales de uso y el momento de sacrificio del mismo para consumo humano.

INTRODUCCIÓN

El cuy, *Cavia porcellus*, es una especie nativa de los Andes, que constituye una alternativa de sustento para las familias campesinas productoras; así como también una opción de producción a gran escala que se ha venido incrementando en los últimos años en el departamento de Nariño siendo una especie precoz, prolífica, de ciclos reproductivos cortos, y de fácil manejo.

Debido a los sistemas de crianza utilizados en la región el cuy es susceptible a padecer enfermedades que afectan la ganancia de peso, retrasan el crecimiento e incrementan los costos de producción, consumo de alimento y uso de instalaciones.

Una de las enfermedades que más comúnmente afecta a los cuyes es la dermatofitosis, que se presenta más intensamente en época de lluvias trayendo consigo problemas, no solo porque se trata de una zoonosis, sino también por las pérdidas económicas que representa.

Lo anterior se traduce en una preocupación para el sector cuyícola, teniendo en cuenta que los tratamientos que generalmente se utilizan vienen indicados para otras especies y son usados extraetiqueta implicando que los productos sean sobre o sub dosificados ocasionando efectos imprevistos y posibles resistencias. Además, representa un riesgo para el consumidor puesto que muchos de estos medicamentos poseen tiempo de retiro y debido a que el cuy tiene un ciclo de vida corto es posible que la carne contenga residuos químicos.

Por lo tanto las plantas medicinales constituyen una alternativa de tratamiento natural que de la mano con una nutrición adecuada y la prevención de enfermedades, pueden ayudar a proporcionar otra opción de salud animal y evitar los riesgos a que se expone la población humana por el uso inadecuado de productos de la industria farmacéutica, que son recomendados para especies mayores y que por disponibilidad se utilizan en el cuy.

Según estudios realizados en Estados Unidos se ha demostrado que la planta medicinal Caléndula (*Caléndula officinalis*. L.) posee actividad antifúngica frente a infecciones producidas por hongos en humanos. Si bien esta planta es reconocida por sus propiedades, no existen estudios que comprueben su efectividad en la dermatofitosis en cuyes, por lo tanto y a través del presente trabajo se busca dar a conocer los resultados de su utilización como antifúngico para el tratamiento *in vitro* de la dermatofitosis en el cuy.

1. DEFINICIÓN Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

La producción de cuy En Nariño se ha venido incrementado en los últimos años representando una fuente de ingreso para muchas familias, encontrándose en su gran mayoría una producción netamente artesanal, así como también explotaciones extensivas llegando a constituir una importante fuente de trabajo y sustento de las familias.

Las enfermedades más comunes que se observan son las cutáneas en donde se puede tener en cuenta las lesiones por mordeduras debido al hacinamiento, y las dermatofitosis, siendo estas últimas de gran importancia ya que afectan a cuyes de levante y destetos, viéndose afectada la producción.

El aumento en los costos se observa por la disminución en el crecimiento y bajo índice de peso, mayor tiempo de salida afectando la producción en el aumento de los costos por la utilización de medicamentos y un mayor tiempo de alimentación.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Posee la Caléndula (*Caléndula officinalis*, L.) propiedades antifúngicas útiles para el tratamiento de la dermatofitosis causada por *Trichophyton sp*?

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad anti fúngica de la caléndula (*Caléndula officinalis*, L.), como tratamiento in vitro de la dermatofitosis causada por *Trichophyton sp.*

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaboración de la tintura madre de *Caléndula officinalis*, L.
- Aislamiento y cultivo de *Trichophyton sp.* que afecta al cuy (*Cavia porcellus*).
- Determinar el efecto antifúngico *in vitro* de las diluciones al 20, 40 y 60 % a partir de tintura madre de *Caléndula Officinalis*, L. frente al hongo *Trichophyton sp.*

4. MARCO TEÓRICO

4.1 GENERALIDADES DEL CUY (*Cavia porcellus*).

4.1.1 **Origen y clasificación zoológica.** Según Coronado “el cuy (*Cavia porcellus*, B.) es un animal originario de América del sur (Bolivia, Brasil, Colombia, Ecuador, Paraguay, Perú y Venezuela) donde se utiliza para el consumo humano desde la época precolombina, hace más de 5000 años, siendo el único animal doméstico que los nativos tenían dentro de sus chozas”¹.

Ortegón y Morales afirman que la clasificación zoológica del cuy (*Cavia porcellus*) es la siguiente:

Reino: Animal
Phylum: Chordata
Subphylum: Vertebrata
Clase: Mamífero
Subclase: Theria
Infraclase: Eutheria
Orden: Rodentia
Suborden: Histrichomorpha
Familia: Caviidae
Género: *Cavia*
Especie: *Porcellus*².

4.1.2 **Sistemas de producción.** Caycedo afirma que la producción de cuyes en Nariño está determinada por tres sistemas:

Producción familiar. Se maneja bajo un sistema tradicional, caracterizado por mantener cuyes criollos de bajos rendimientos con alojamiento en las cocinas con alta humedad, alimentados con pastos de baja calidad nutritiva y condiciones sanitarias inadecuadas, su mano de obra es familiar conformada por la madre y los hijos. El número de animales está determinado básicamente por el recurso alimenticio disponible. Generalmente se mantienen en un solo grupo, en número menor a 50 animales sin tener en cuenta la clase, sexo, variedad, razón por la cual se

¹CORONADO S. Moisés *et al.* Manual técnico para la crianza de cuyes en el Valle del Mantaro. Asociación de productores de cuyes [citado enero 2012] Disponible en internet URL: <http://www.cooru.org.pe/> Manual técnico cuy1.pdf>

² ORTEGON, Margarita y MORALES, Fernando. El cuy (*Cavia porcellus*). Pasto, Colombia: Marmor, 1987. P. 294.

tienen poblaciones con alto grado de consanguinidad y altas mortalidades de crías y adultos.

Producción familiar comercial. En este sistema se utiliza algún grado de tecnificación, trabajando con animales mestizos o cruzados con líneas mejoradas, manteniendo una población con más de 100 animales. Superando muy pocas veces los 500. Las instalaciones son construidas para este fin, utilizando materiales de la zona para la construcción de galpones y alojamientos en jaulas. Los cuyes se manejan en lotes agrupados por edades, sexo y clase. La alimentación es normalmente a base de subproductos agrícolas, pastos cultivados y en algunos casos se suplementa con alimentos balanceados. El control sanitario es más estricto realizando prácticas de desinfección de instalaciones y tratamiento de animales contra enfermedades parasitarias e infecciosas.

Producción comercial. En este sistema se manejan más de 500 cuyes por galpón. Se aplican prácticas de manejo altamente tecnificadas en galpones comerciales. Los animales utilizados son de líneas selectas mejoradas, precoces, prolíficas y eficientes convertidoras de alimento con fines de consumo en asaderos y obtención de pie de cría garantizado.

Trabaja con apareamientos a temprana edad; utiliza galpones comerciales para la producción y levante con alojamientos en jaulas colectivas o individuales o pozas e implementos tales como comederos, tolvas, bebederos automáticos, cercas gazaperas, fuentes de calor para épocas de invierno. Se cuenta con áreas disponibles para la siembra de pastos y emplea subproductos agrícolas, se utiliza además suplementos balanceados y en ocasiones tanto el pasto como el concentrado se suministran a voluntad. El control sanitario es de mayor cuidado estableciendo planes a partir del destete de las crías y un seguimiento estricto de todas las fases productivas del animal³.

4.1.3 Sanidad y enfermedades. Para el instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIA) las consideraciones sanitarias a tener en cuenta son:

- Evitar el ingreso de personas ajenas al criadero, porque además de asustar los animales, pueden ser portadores de enfermedades.
- Control de ratas, ratones y otros animales en las instalaciones y depósitos de alimentos para evitar así el contagio de enfermedades.

³CAYCEDO, Alberto y Colaboradores. Producción sostenible de cuyes, ASINDETEC, Asociación para la investigación y el desarrollo tecnológico, agropecuario y agroindustrial. Vipri. Universidad de Nariño, Primera Edición, 2011.p. 47-48.

- Lavar y desinfectar periódicamente los corrales o instalaciones de manejo con desinfectantes.
- Cuando se suministre agua esta debe estar limpia y fresca, los bebederos deben estar igualmente limpios.
- Tener en observación a los animales que provienen de otros lugares durante ocho días por lo menos y controlar su salud.
- Cuando se desocupen las pozas es conveniente pasar un lanzallamas para desinfectarlas.
- La forma más práctica de apreciar el estado de salud de los cuyes es observando sus cambios de peso, apetito, actividad, y reflejos, color y forma de las heces, la condición de los ojos, orejas, piel, pelo, dientes y extremidades.
- La prevención y el control de las enfermedades más importantes, es más trascendental que el tratamiento curativo. El origen de estos trastornos es por lo general por falta de higiene, demasiado número de animales, ambientes deficientemente ventilados, alta humedad, cambios bruscos de temperatura, alimentación y manejo inadecuado⁴.

Según Chauca “Las causas que predisponen a las enfermedades son los cambios bruscos en el medio ambiente, considerando variaciones de temperatura, alta humedad, exposición directa a corrientes de aire, sobre densidad, falta de limpieza en camas, deficiente alimentación entre otras”⁵.

4.1.3.1 Enfermedades Infecciosas. Coronado asegura que las enfermedades infecciosas son enfermedades causadas por microorganismos (bacterias, hongos, virus, protozoos), que producen alta mortalidad. Las más frecuentes son: la salmonelosis, neumonía, distomatosis, yersiniosis, entre otras.

⁴INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN AGRARIA (INIA), Tecnologías propuestas por el programa de crianzas familiares [On line] Perú. Diciembre 2004. [Citado 25 de enero 2012] Disponible en internet:

<[URL://http://www.perucuy.com/site/modules.php?name=News&file=article&sid=48/](http://www.perucuy.com/site/modules.php?name=News&file=article&sid=48/)>

⁵CHAUCA, Lilia, producción de cuyes (*Cavia porcellus*), [On line], La Molina, Perú., Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1997. [Citado 28 de enero de 2012] Disponible en Internet: <<http://www.fao.org/DOCREP/6562s/6562s00.htm>>

Yersiniosis: Es producida por la bacteria *Yersinia pseudotuberculosis* y en 1989 se identificó como el principal limitante de origen infeccioso para la producción de cuyes en el departamento de Nariño. Esta enfermedad es conocida vulgarmente como “achaque o pepa” es una enfermedad contagiosa que ataca cuyes de cualquier edad, produciendo altas pérdidas económicas. La bacteria puede encontrarse en otros animales como pájaros, gallinas, conejos, ratas y ratones sin causarles daño, sin embargo estas pueden contaminar con las excretas, los pastos, alimentos y utensilios utilizados para el manejo de los cuyes. Una vez la bacteria ingresa por vía oral sobrevive al paso por el estómago y llega al intestino, penetra el epitelio intestinal y se ubica en los órganos linfoides intestinales, placas de peyer, hígado, bazo y pulmón. Las lesiones que se observan son nódulos caseosos purulentos de tamaño variable en estos órganos.

Salmonelosis: Es la enfermedad de mayor incidencia en la explotación de cuyes, se encuentra en estado latente y basta una situación de *estrés* para activarla. La salmonelosis es ocasionada por serotipos del género *Salmonella*.

Esta enfermedad tiene como vía de infección la oral, por el suministro de pasto regado con aguas servidas, agua de riego contaminado, acceso de roedores nocivos y aves silvestres en fase de portadores a los ambientes de crianza que contaminan el alimento con sus deyecciones; el personal que maneja a los animales puede considerarse como transportador cuando pisa el forraje y otros alimentos.

Los principales síntomas son apatía, anorexia, caquexia, adipsia, pelo erizado, diarrea, vómitos, parálisis en miembros posteriores y abortos. Los cuyes lactantes son los más susceptibles, bastando únicamente una situación de estrés para activar la salmonella. En su forma aguda, los animales mueren bruscamente sin mostrar mayor síntoma, luego de 24 a 48 horas.

En forma crónica, hay un adelgazamiento paulatino y pronunciado, pelaje deslucido con un cuadro de aumento del volumen del vientre debido a *ascitis* (acumulación de líquido en el abdomen), parálisis del tren posterior y diarrea.

Neumonía: Se presenta cuando existen cambios bruscos de temperatura, puesto que son poco resistentes a las corrientes de aire y humedad. Normalmente los animales mal alimentados y débiles son los primeros en enfermarse.

Los síntomas son secreciones nasales, se encogen como si tuvieran frío, los ojos tienen aspecto vidrioso, respiración rápida y dificultosa, pérdida de apetito, depresión y pérdida de peso⁶.

4.1.3.2 Enfermedades Parasitarias. Según Chauca las enfermedades parasitarias al contrario de lo que sucede con las infecciosas, se caracterizan por sus manifestaciones lentas e insidiosas, por lo que en la mayoría de las veces pasa desapercibida por los criadores. Las infestaciones severas repercuten negativamente en la producción; los efectos se traducen en pérdidas económicas que los criadores por lo general no cuantifican.

El mismo autor afirma que los factores epidemiológicos que contribuyen a la elevada prevalencia de ecto y endoparásitos en cuyes en las crianzas familiares son las deficientes condiciones higiénicas y sanitarias de los corrales, sobrepoblación animal, crianza con otras especies domésticas. Existe una alta susceptibilidad de los cuyes a infecciones parasitarias en ausencia de programas de prevención y control.

Protozoos: La especie económicamente importante es la coccidia producida por *Eimeria caviae*. Los animales más susceptibles son los cuyes jóvenes, principalmente después del destete. La sintomatología en los casos agudos se manifiesta por una rápida pérdida de peso, diarrea mucosa con estrías sanguinolentas y muerte, la cual puede suceder incluso en forma repentina sin la presentación de síntomas clínicos.

Trematodos: La *Fasciola hepática*, llamada vulgarmente «alicuya», se aloja en estado adulto en los conductos biliares. Este parásito es hematófago y sus formas inmaduras durante su migración producen una destrucción masiva de parénquima hemático. La infección se produce mediante la alimentación con pastos recolectados en zonas infestadas.

El cuadro clínico se manifiesta por anorexia, debilidad y muerte repentina. A la necropsia se observa ascitis, hígado congestionado y hemorrágico.

Nematodos: La *paraspidodera*, el *trichuris* y el *passalurus* son parásitos específicos de los cuyes. Las infecciones parasitarias son mixtas, es decir, por varias especies parasitarias, cada una de las cuales ocupa un lugar determinado del tracto intestinal, produciendo trastornos con efectos nutritivos y fisiológicos variados.

⁶CORONADO S., Op. Cit. P. 29-31.

Ectoparásitos: Los parásitos externos constituyen otro de los factores importantes dentro de las enfermedades parasitarias. El grado de infección es intenso en las crías familiares, lo cual repercute negativamente en la producción, Existen tres grupos importantes de ectoparásitos en cuyes.

Piojos: Los piojos masticadores, *Gyropusovalis*, *Gliricolaporcelliy* *Menacanthustramineus*. Se alimentan de células epiteliales descamadas o de la epidermis de la piel, algunas sin embargo se alimentan de sangre.

Pulgas: Entre las pulgas más frecuentemente encontradas en cuyes se mencionan al *Echidnophaga gallinacia*, la *Ctenocephalides canisy*, *Pulex irritans*, pulga de las gallinas, perro y hombre, respectivamente. Las pulgas causan severa irritación de la piel, anemia, intranquilidad, que en infestaciones masivas pueden producir la muerte de los animales.

Ácaros: Son ectoparásitos microscópicos, o apenas visibles a simple vista, responsable de la sarna de los cuyes. El ciclo de vida tiene una duración de pocos días. Se alimentan de sangre y linfa de aquí que la anemia sea el síntoma constante. Además, las picaduras les provocan irritación, intranquilidad, pérdida de sueño y caída de pelo⁷.

4.2 DERMATOFITOSIS EN EL CUY

4.2.1 Etiología: Según Moya “las infecciones producidas por los dermatofitos presentan un cuadro anatomoclínico bastante variado. La intensidad de las lesiones depende de la respuesta inmunológica del hospedero, del sitio de la infección y del hábitat natural del hongo. Entre los animales de laboratorio, los más afectados son los conejos y cobayos, siendo el principal agente causal *Trichophyton mentagrophytes (T. mentagrophytes)*”⁸.

4.2.2 Transmisión: Según Foster y Smith las esporas de los animales infectados pueden ser arrojadas en el medio ambiente y viven más de 18 meses. Los gatos, conejos y cobayos son a menudo la fuente de infección debido a que pueden ser portadores asintomáticos y eliminar el microorganismo sin mostrar signos de infección. El hongo se puede transmitir por contacto directo con un animal infectado, o por contacto con un objeto que está contaminado con las esporas. La incidencia de la infección varía con la zona geográfica y el medio ambiente. Los animales jóvenes y los sometidos a niveles de estrés (por ejemplo, el hacinamiento, la

⁷CHAUCA L., Op. Cit. P. 232-240.

⁸MOYA, Manuel. Dermatomofitosis en cobayos de bioterio convencional de la Granja experimental “La Torcaz” [On line]. Agosto de 2005 [Citado 28 de enero 2012] p. 84 Disponible en internet: <<http://72.14.209.104/search?q=cache:t8lakb2q97KJ:bibliofcv.veter.ucv.ve/revistafcv/pdf/Moyanew.pdf+dermatofitosis+cobayos&hl=es&ct=dak&cd=28gl=co>>

alta humedad, la falta de saneamiento, la malnutrición) presentan un mayor riesgo de desarrollar la enfermedad⁹.

4.2.3 Sintomatología: Samus dice que los síntomas típicos de tiña son zonas alopecias en la cara, manos, orejas y con menor frecuencia en el resto del cuerpo.

El mismo autor también asegura que la zona afectada muestra la piel enrojecida, rosada o con una costra fina que no debe confundirse con la sarna que es mucho más gruesa. Pero los primeros síntomas son más importantes, ya que nos permiten hacer un diagnóstico temprano de la enfermedad, muchas veces los gazapos antes del destete muestran un material pastoso, pegajoso en el pelo desde la raíz, en el hocico, cara, orejas, que en pocos días se caerá dejando la zona depilada con forma circular¹⁰.

Según Leonart los animales afectados manifiestan clínicamente la enfermedad con alteraciones superficiales, además de causar una reducción del crecimiento. A pesar de las lesiones, los gazapos no muestran los síntomas de prurito ni suelen rascarse con intensidad. Los reproductores soportan mejor la enfermedad, y aparentemente son menos susceptibles a la misma. En ocasiones las dermatofitosis extensas y graves determinan incluso inflamación ganglionar en la zona afectada¹¹.

4.2.4 Diagnóstico: Según Foster y Smith “el diagnóstico básicamente se constituye de dos elementos fundamentales, la visualización de síntomas y en el diagnóstico de laboratorio donde se realiza un estudio micológico que consta del examen directo y el cultivo”¹².

Según Rezusta: “Para alcanzar el éxito en el diagnóstico micológico es fundamental realizar adecuadamente la recogida de la muestra, su transporte y procesamiento, la siembra de la misma en los medios idóneos y a la temperatura adecuada, así como la identificación e interpretación correcta de los aislamientos”¹³.

⁹FOSTER & SMITH. Ringworm in Rabbits & Guinea Pigs. Holly nash, DVD, MS. Veterinary services department. PetEducation.com [On line] 2007. [Citado 29 enero de 2012] Disponible en internet: <URL:<http://www.peteducation.com/article.cfm?articleid=2494>>

¹⁰SAMUS, Sergio. Dermatofitosis. Revistas de Cabaña Lagunita N° 15. [On line] Jujuy, Argentina 2006. [Citado el 28 de febrero 2012]. Disponible en internet: <URL:<http://www.pyme.mendoza.gov.ar/pdf/cursos/conejos%20Lagunita.pdf>>

¹¹LLEONART, F. Dermatocosis. Conejos y algo más[On line] Buenos Aires (Argentina) [Citado 24 de enero 2012] Disponible en internet: <URL:<http://www.conejosyalgomas.com.ar/articulos023.asp?ootkey=228&ootest=3>>

¹²FOSTER Y SMITH, Op. Cit.

¹³ REZUSTA LÓPEZ, Antonio. SÁNCHEZ SOUZA, Aurora. Y GIL TOMAS, Joaquina. Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico. Guía práctica de identificación y

Para murillo este diagnóstico consta de: examen directo, cultivo y posterior identificación del dermatofito. En el examen directo se hacen montajes microscópicos de las muestras de piel sacadas por medio de raspados, muestras de uñas y pelos con hidróxido de potasio (KOH), la maceración del material queratinizado puede aumentarse con rápidos pasajes sobre el fuego de un mechero o dejándolo reposar por un periodo de 15 a 30 minutos, en el caso de pelos, y 1-2 en el caso de uñas¹⁴.

Rezusta afirma: La observación microscópica se realiza con bajo aumento, seguida de alto aumento en seco y, si es necesario, con objetivo de inmersión. Las dos formas observadas habitualmente son levaduras y/o elementos miceliares. Aunque es muy difícil identificar una especie fúngica por la morfología observada en el examen microscópico directo de la muestra, algunas imágenes pueden asociarse a ciertos géneros o especies.

Es aconsejable utilizar periódicamente controles positivos y negativos y, si una tinción se emplea ocasionalmente, deben incluirse siempre controles que aseguren su correcta utilización¹⁵.

Según el laboratorio veterinario especializado VetLab®: La estructura básica de este tipo de hongos incluye un cuerpo o talo vegetativo filamentosos llamado Micelio. Las ramas de este micelio se denominan Hifas, que crecen en todas direcciones. Las Septas o tabiques corresponden a paredes celulares fúngicas entre cuyas cavidades se generan Esporas o células vegetativas hijas. Las Conidias son las esporas asexuales. Las hifas "viejas" presentan septos frágiles que se fragmentan, formando esporas redondeadas o en forma de barriles, denominadas Arthroconidias.

Al examen microscópico directo, en la raíz del pelo pueden observarse la posición de las arthroconidias en relación con la estructura capilar. Las arthroconidias pueden encontrarse fuera del hilo del pelo y dispuestas en cadena, o en mosaico (patrón ectotrix), o intracapilarmente, ocupando la médula del pelo (patrón endotrix)¹⁶.

En cuanto al cultivo de dermatofitos cervantes declara: La piel de los animales esta normalmente contaminada, especialmente por esporas y

diagnostico en micología clínica. Revista iberoamericana de micología. [on line]. Bilbao, junio del 2006. Cap. 3. [citado 22 febrero de 2013] disponible en internet <URL:<http://www.guia.reviberoammicol.com/cap3.pdf>> ISBN: 84 – 607 -3050 - 6

¹⁴ MURILLO NEUFELD, Paulo. Diagnostico laboratorial de las Dermatofitosis. Revista del colegio de microbiólogos. [on line]. Rio de janeiro, Brasil, 2001 [citado 22 febrero de 2013] disponible en internet <URL:<http://www.colegiomicrobilogoscrl.org/revista/2001-5%20Diagn%F3stico%20Laboratorial%20de%20las%20Dermatofitosis.doc>>

¹⁵ REZUSTA, A. Op. Cit. Pág. 6

¹⁶ LABORATORIO VETERINARIO ESPECIALIZADO Vetlab®. Conceptos para el diagnostico microscópico de micosis dérmica en medicina veterinaria. [on line] Santiago, chile. Septiembre de 2005 [citado 22 febrero de 2013]. Disponible en internet <URL:http://www.vetlab.blogspot.com/2005_09_01_archive.html>

conidias micóticas y bacterias. Se requiere de paciencia para obtener un aislamiento de dermatofitos que son de lento crecimiento y se requiere de usar medios que ayuden a prevenir el sobre crecimiento de hongos saprófitos o bacterias. Los micólogos frecuentemente utilizan una receta personal para cultivar dermatofitos, pero existen una buena cantidad de medios comerciales disponibles que contienen los ingredientes básicos. Estos incluyen: 4% de Glucosa, 1% de Peptona, 2% de agar (agar dextrosa Sabouraud o SDA) además de quimioterapéuticos antibacterianos como son cloranfenicol o la combinación de penicilina-estreptomina y también cicloheximida esta última sirve para detener el crecimiento de hongos saprófitos de rápido crecimiento¹⁷.

4.2.5 Tratamiento: Los mismos autores afirman que “las lesiones pueden someterse a un tratamiento con champús queratolíticos, povidona-yodo agentes de limpieza, baños de cal, azufre, y/o fungicidas tópicos (por ej., miconazol o clotrimazol crema)”¹⁸.

Tratamiento tópico:

“Reduce la cantidad de esporas en la epidermis y porción distal del pelo, disminuyendo el riesgo de contagio. En animales de pelo largo es recomendable el rasurado previo con cuidado de no producir micro traumatismos que puedan extender la infección.

La aplicación debe realizarse en forma de baños o pulverizaciones”¹⁹. Abarcando toda la superficie de la piel, no siendo recomendable tratar solo las lesiones localizadas ya que el material infeccioso se encuentra presente también en áreas no lesionadas. Sin embargo en lesiones muy localizadas y queriones con frecuencia se usan solo pomadas a base de derivados imidazólicos, como el miconazol o el triconazol.

En el caso de aplicar baños, se recomienda cortar previamente el pelo sin llegar a rasurarlo, ya que los pequeños traumatismos en la piel debidos al rasurado favorecen la diseminación de la infección. El mejor producto tópico en dermatofitosis es el enilconazol, aplicado dos veces a la semana, aunque en gatos citan casos de toxicidad, posiblemente por ingesta debido a

¹⁷ CERVANTES OLIVARES, R. Tiñas (Ringworm) en perros y gatos. [on line]. Departamento de microbiología e inmunología, laboratorio de micología, Universidad Nacional Autónoma de México. México DF, México, 2 marzo de 2004. [citado 22 febrero 2013] Disponible en internet <URL:http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carmichael/cervantes_es/ivis.pdf> pág. 4

¹⁸ FOSTER Y SMITH, Op. Cit.

¹⁹ FRAILE OCAÑA, cristeta, ZURUTUZA, ione, Valdivieso, paula, Dermatofitosis en animales de compañía: riesgo zoonótico. Trabajo científico [on line]. [citado 16 abril 2013] disponible en internet <URL:http://www.axoncomunicacion.net/centroveterinario/revistas/44/cv_44_Dermatofitosis%20en%20animales%20de%20compania.pdf>

acicalado. La clorhexidina es menos efectiva que el anterior. También puede usarse la nistatina como tratamiento tópico.

Tratamiento sistémico:

La griseofulvina es el tratamiento de primera elección. Solo cuando esta no funciona se puede escoger otro anti fúngico. La griseofulvina se debe administrar conjuntamente a alimentos grasos, ya que así se incrementa su absorción a nivel intestinal.

Es importante saber que este fármaco se debe administrar durante un tiempo más o menos largo, y que los efectos secundarios pueden llegar a ser importantes, (vómitos, diarrea, anorexia y otros menos frecuentes) por lo que nunca se debe tratar un animal en el que no se haya diagnosticado certeramente la enfermedad. Además nunca se debe administrar en hembras gestantes durante los dos primeros tercios de la gestación, ya que es teratogenica, es decir que puede causar mal formaciones en los fetos²⁰.

4.2.5 Identificación:

Para la identificación morfológica a partir de aislamientos de dermatofitos se tiene en cuenta las características macroscópicas y microscópicas como lo afirma cabañez:

Características macroscópicas: A partir de los cultivos realizados en medios selectivos para el aislamiento de dermatofitos, se pueden identificar las especies más frecuentes. Los dermatofitos son hongos hialinos que forman colonias que presentan en general colores claros, con gamas de color restringidas a tonos blanquecinos amarillentos y marronaceos. En pocas ocasiones se observan colonias con colores oscuros u otras tonalidades (azules, verdosas, negras, etc.). Si bien la coloración de las colonias y su textura pueden ayudar a identificar estas especies, las características microscópicas son las que determinan su identificación en la mayoría de los casos.

Características microscópicas: existen diferentes estructuras microscópicas a tener en cuenta para la identificación de estos hongos (clamidosporas, distintos tipos de hifas, etc.). No obstante, la forma y distribución de macroconidios y microconidios es fundamental a la hora de definir los géneros y especies. Para determinar la presencia de estas estructuras a partir del cultivo, se realiza una preparación entre porta y cubre con un pequeño fragmento de una de las colonias con el fin de observarla al

²⁰ REJAS LÓPEZ, Juan. Dermatología clínica veterinaria. Facultad de veterinaria universidad de león. [on line]. España, 2003. [citado 17 abril 2013]. Disponible en internet <URL:<http://www3.unileon.es/personal/wwdmvjr/dermatopatias/dermatofitosis.html>>

microscopio. Se aconseja líquidos de montaje tipo lactofenol de amman, lactofenol azul de algodón o lactofucsina²¹.

Jawetz *et al.* Aseguran:

Características de los dermatofitos: trichophyton, microsporum y epidermophyton, se identifican por sobre todo por lo tipos de macro y microconidias (llamadas también macro y microaleurisporas) que se forman al cultivarse sobre agar saboraud dextrosa o agar de mycosel.

1 Trichophyton. Las colonias presentan hifas septadas, muchas microconidias y algunas macroconidias largas y delgadas similares a un cigarro, cuando se cultivan con agra saboraud dextrosa la apariencia de la parte inferior de la masa fúngica sobre el agar ayuda a identificar ciertas especies. Ver figura 1(d, e, i, j, l, n, p, o).

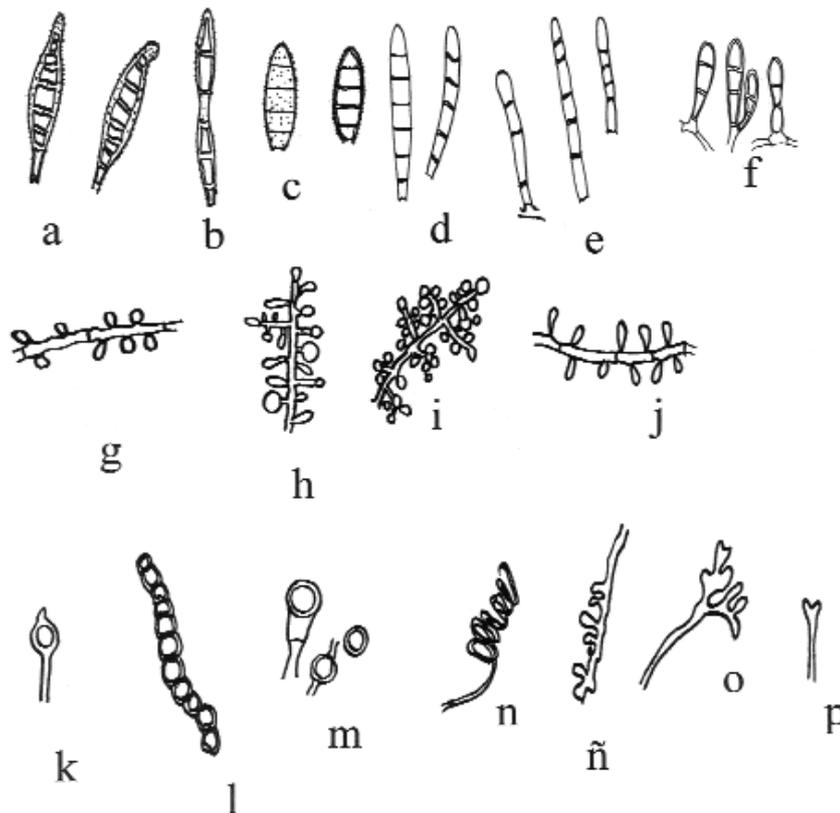
2 Microsporum. Las especies de microsporum se desarrollan como hifas septadas con muchas macroconidas burdas, de gran tamaño y algunas microconidias. Aunque no afectan uñas, si infectan el exterior del cabello. Las especies son microsporum canis, microsporum gypseum y microsporum audouinii ver figura 1 (a, b, c, g, k, ñ).

3 Epidermophyton. Carece de microconidias y forma macizos de macroconidias lisas de gran tamaño semejante a plátanos. Ver figura 1 (f)²².

²¹ CABAÑEZ SÁENZ, Javier. Identificación de hongos dermatofitos. Guía práctica de identificación y diagnostico en micología clínica. Revista iberoamericana de micología [on line]. Bilbao, 2001. Cap. 12 [citado22 febrero 2013] disponible en internet <URL: <http://www.guia.reviberoammicol.com/cap12.pdf>>

²² JAWETZ. MELNICK. Y ADELBERG. Microbiología Médica. México. Editorial Manual Moderno. 2002. Pag. 844

Figura 1. Identificación morfológica de Dermatofitos.



Diferentes tipos de macroconidios (a-f), microconidios (g-j), clamidosporas (k-m) e hifas (n-p) fuente Cabañez.

4.3 CALÉNDULA (*Caléndula officinalis*, L.)

4.3.1 Historia y origen del cultivo. Bakó *et al* afirma que La *Caléndula officinalis*, L., *Asteraceae*, es una planta muy cultivada como especie ornamental y sus flores se utilizan frecuentemente en Europa y Asia occidental en medicina popular. Conocida vulgarmente como “maravilla de los jardines”, la palabra “caléndula” viene del latín *calenda* que designaba el primer día del mes. Los romanos, sin embargo, la llamaban *Solsequium*, que quiere decir “que sigue al sol”, acción que realizan las flores de la Caléndula al igual que los girasoles²³.

²³BAKÓ E, DELI J, TOTH G. HPLC Study on the carotenoid composition of Calendula products. Journal of Biochemical and Biophysical methods, 2002. Citadopor: JIMENEZ MEDINA, Eva Maria. Estudio de las actividades antitumorales de un extracto de caléndula: propiedades inmuno moduladoras y citotóxicas. [On line] Granada [Citado 24 de enero 2012] Disponible en internet: <<http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/978/1/16129921.pdf>>

Figura 2. *Caléndula officinalis*, L.



Fuente: Botanical.com

4.3.2 Descripción Botánica. Según Herbotecnia Desde el punto de vista botánico, en Herbotecnia.com se describe a esta especie como una planta herbácea anual (en raras ocasiones también bianual), de tallo robusto, anguloso, tomentoso, y que alcanza una altura de 40 a 60 cm. Sus hojas son oblanceoladas o espatuladas las inferiores, con bordes levemente dentados. Las flores se presentan en cabezuelas solitarias terminales de unos 5 cm de ancho con flores tubulosas en el disco y de color amarillo anaranjado. El fruto es un aquenio²⁴.

4.3.3 Clasificación taxonómica de la caléndula.

Reino:	Vegetal
Subreino:	Tracheobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Asterales
Familia:	Asteraceae
Tribu:	Calenduleae
Género:	<i>Caléndula</i>
Especie:	<i>C. officinalis</i> ²⁵ .

²⁴HERBOTECNIA- TECNOLOGÍA EN PRODUCCIÓN DE PLANTAS MEDICINALES, AROMATICAS Y TINTOREAS. Caléndula, [On line] Argentina 2006 [Citado 25 de enero de 2012] Disponible en internet: <URL: http://herbotecnia.com.ar/aut_calen.html>

²⁵WIKIPEDIA, The free encyclopedia. [Citado 16 de marzo 2012] Disponible en internet: <http://en.wikipedia.org/wiki/Calendula_officinalis>

4.3.4 Ecología y adaptabilidad. Tomás y Sánchez afirman que el cultivo de la *caléndula* se lleva a cabo con éxito en climas templados, y en general tiene buena resistencia al frío y a las sequías. Es poco exigente en cuanto a tipo de suelo, pero siempre son preferibles aquellos con buen contenido de materia orgánica. Debido a que es una planta que sufre el anegamiento, es muy importante la nivelación del terreno antes de hacer ninguna otra labor.

4.3.5 Labores de cultivo.

- **Elección de semilla:** Los mismos autores sostienen que la elección de la semilla es un paso muy importante tanto para el cultivo de la *caléndula* como para cualquier otro cultivo. Es conveniente elegir semilla identificada y certificada.

Se calcula que 1000 semillas de *caléndula* pesan aproximadamente 8,5 a 9 g. El poder germinativo suele ser de un 85%, aunque este va disminuyendo conforme pasa el tiempo, y a los dos años de cosechadas se considera que las semillas pierden totalmente el poder germinativo.

- **Siembra:** Tomás y Sánchez también afirman que la siembra se realiza en forma directa, por lo común en filas distancias entre 50 y 70 cm., a chorrillo, con posterior raleo. Según las experiencias en el Municipio de Malvinas Argentinas, se observó que la distancia entre surcos puede reducirse a menos de 50 cm, incrementándose así el rendimiento del cultivo por unidad de superficie. Una vez sembrada la semilla, se debe cubrir suavemente con una capa de 2-3 cm. de tierra.
- **Cosecha:** Tomás *et al* afirma que la recolección se realiza cuando los capítulos se hallan en plena floración. La eliminación de cabezuelas muertas es una práctica muy importante para la prolongación de la cosecha. La cosecha de los capítulos se realiza en forma manual y escalonada, a medida que estos se abren. Aunque eso puede depender de la superficie del cultivo, la disponibilidad de mano de obra al momento de la cosecha, la disponibilidad de maquinaria y, por supuesto, los costos.

Se considera que un 10 % de floración ocurre aproximadamente a los 70 días de realizada la siembra directa, o a los 45 días del trasplante. La recolección se realiza a medida que las flores se abren con el sol y se ha eliminado el rocío. Se calcula que a lo largo de todo el cultivo se efectúan entre 10 y 12 recolecciones. Para obtención de semilla, se cosechan los frutos aproximadamente de 90 a 100 días del trasplante²⁶.

²⁶ TOMÁS Moore, SÁNCHEZ Luz, DESMARCHELIER Cristian. Manual de Cultivo y Manejo de Caléndula [On line], Buenos aires Argentina [Citado 25 de enero de 2012] Disponible en internet:

<http://www.google.com.co/#hl=es&q=calendula+officinalis+pdf&oq=calendula+off&aq=4&aqi=g1>

4.3.6. Enfermedades que pueden afectar la caléndula: Según Clemente las plagas animales más comunes que afectan a la *caléndula* son los pulgones, las cochinillas, la mosca blanca, las chinches y las larvas minadoras. Por otro lado, las enfermedades más comunes que se pueden presentar en un cultivo son las “manchas de las hojas”, que pueden ser producidas por los hongos *Cercospora*, *Colletotricum* y *Alternaria*; el “oídio” (formación de un micelio blanquecino sobre las hojas), podredumbre del tallo, producida por los géneros *Rhizoctonia* o *Sclerotinia*, y la “roya”, que se manifiesta a través de pústulas de color pardo-rojizas producidas por el género *Puccinia*.

Clemente también afirma que desde el punto de vista preventivo, para garantizar la sanidad del cultivo de *caléndula* existen varias acciones a seguir. En primer lugar, es fundamental la elección de una semilla sana, identificada y certificada, que no traiga con ella ni plagas ni enfermedades. Otra herramienta a manejar es la correcta fecha de siembra (la más propicia), según el “Calendario Biodinámico”, para la obtención de flores (la biodinámica clasifica a las plantas para las distintas labores a realizar según el órgano a cosechar: raíz, hojas, flores, y frutos).

La rotación de cultivos en un mismo cuadro también es una técnica eficaz para la prevención de enfermedades, ya que no permite que las plagas se establezcan, cortando su ciclo de un año para el otro. Esta es una práctica muy importante ya que sirve también para mantener la fertilidad del suelo. Se trata de no repetir de un año para el otro especies que pertenezcan a la misma familia e intercalar en invierno o verano lo que se llaman “abonos verdes” (cultivos como haba, poroto, arveja, lupinus, todas de la familia de las leguminosas, que incorporan nitrógeno al suelo)²⁷.

4.3.7. Usos y aplicaciones: Los estudios farmacológicos han confirmado que *C. officinalis* exhibe una amplia gama de efectos biológicos:

Ukiya *et al* afirma que “*C. officinalis* posee actividad antiinflamatoria en experimentos realizados en orejas de ratones. Además afirma que la actividad antiinflamatoria es producida principalmente por el triterpeno glucósido encontrado en la planta”²⁸.

0&aql=&gs_sm=c&gs_upl=2980199988101070741471451113131914331751417.14.17.1.114110&bav=on.2.or.r_gc.r_pw.,cf.osb&fp=7e997f58300d40ba&biw=1249&bih=574

²⁷ Clemente semillas y plantas. Disponible en internet:

http://blog.clementeviven.com/?page_id=83

²⁸ Ukiya M, Akihisa T, Yasukawa K, Tokuda H, Suzuki T, Kimura Y. Antiinflammatory, anti-Tumor-

Promoting and Cytotoxic Activities of Constituents of Marigold (*Calendula officinalis*) Flowers. J Nat Prod, 2006; 69: 1692-1696.

Kalvatene afirma que “el extracto de *C. officinalis* posee una potente actividad Anti-VIH. Esta actividad se atribuyó a la inhibición de VIH1-RT a una concentración de 1.000 mg / ml en estudios *in vitro*”²⁹.

Lauk afirma que “el extracto de metanol al 10% y la decocción de las flores de Caléndula tienen actividad antibacteriana contra bacterias periodontales aerobias”.

El mismo autor también afirma que “cuando el aceite esencial de las flores de Caléndula fue probado (usando la técnica de difusión en disco) contra varias cepas de hongos, (*Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*) aislados de seres humanos mostró una buena actividad antifúngica”³⁰.

Por otra parte Ukiya afirma que “la fracción soluble del extracto de metanol de flores de *C. officinalis*, ha mostrado actividad citotóxica *in vitro*”³¹.

Lin reporta que “el extracto hidroalcohólico de las flores de *C. officinalis*, posee propiedades hepatoprotectoras debido a la reducción en la enzima glutamato-oxalato-transaminasa (GOT) y glutamato-piruvato-transaminasa (GPT)”³². Popovic sostiene que “extracciones de *C. officinalis*, realizadas con éter, butanol y agua poseen gran cantidad de flavonoides y muestran gran actividad antioxidante”,³³. por otro lado Frankic afirma que “extracciones con propilenglicol de los pétalos y cabezuelas de flores de *C. officinalis*, poseen una fuerte actividad antioxidante”³⁴.

Con respecto a la actividad cicatrizante de la *C. officinalis*, Leach afirma que el “extracto etanólico de estas flores a una dosis de 200 mg / kg mostro una mejora significativa en la curación de heridas térmicas en ratas. A demás el mismo autor asegura que la aplicación diaria de gel de caléndula al 2%

²⁹ Kalvatene Z, Walder R, Gabzaro D. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. *Biomed & Pharmacother*, 1997; 51: 176-180.

³⁰ Lauk L, Lo-Bue AM, Milazzo I, Rapisarda A, Blandino G. Antibacterial Activity of Medicinal Plant Extracts Against Periodontopathic Bacteria. *Phytother Res*, 2003; 17: 599-604.

³¹ LAUK *et al*, Op. Cit.

³² Lin LT, Liu LT, Chiang LC, Lin CC. In vitro antihepatoma activity of fifteen natural medicines from Canada. *Phytother Res*, 2002; 16: 440- 444.

³³ Popovic M, Kaurinovic B, Mimica-Dukic N, Vojinovic-Miloradov M, Cupic V.. Combined effects of plant extracts and xenobiotics on liposomal lipid peroxidation. Part 1. Marigold extract-ciprofloxacin/pyralene. *Oxidation Commum*, 1999; 22: 487-494.

³⁴ Frankic T, Salobir K, Salobir J. The comparison of in vivo antigenotoxic antioxidative capacity of two propylene glycol extracts of *Calendula officinalis* (Marigold) and vitamin E in young growing pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 2008; 41: 1-7.

resultó en un mayor número de cicatrización de heridas debido a su propiedad antimicrobiana y antioxidante”³⁵.

Pérez afirma que “el extracto acuoso de *C. officinalis*, posee actividad en la inhibición de la frecuencia cardíaca puesto que fue probado en el corazón de ratas Wistar macho y se encontró que puede inhibir la contractilidad cardíaca hasta en un 100% a una dosis de 0,3 mg / L”³⁶.

4.3.8 Aspectos Químicos. Ociosziynska afirma que “las flores de Caléndula presentan un amplio espectro de tipos de compuestos químicos, lo cual está en concordancia con la diversidad de acciones farmacológicas que presenta la planta, Entre los compuestos más investigados dado su interés farmacológico están los carotenoides y los flavonoides”³⁷.

Karamaya “plantea un contenido de 0,078 y 0,017 % de carotenoides totales en las flores liguladas y en los receptáculos respectivamente, y de los compuestos identificados alfa, beta y gama-caroteno, violaxantina, rubixantina, citroxantina, flavocromo, flavoxantina, galenina, luteína, licopeno, valentixantina, auroxantina, microxantina, 5,6 epoxicaroteno, beta-zeacaroteno, mutatoxantina y lutein epóxido”³⁸.

“En relación con los flavonoides se plantea un contenido de 0,88 y 0,33 % de flavonoides totales en las flores liguladas y receptáculos respectivamente, y de los compuestos identificados se encuentran isorhamnetina glicósido, isorhamnetina, rutinósido, isorhamnetina neohesperidósido, quercetina glucósido, calendoflosido, calendoflavosido, calendoflavobiosido, narcisina, isoquercetina, quercetina, rutosido y kaemferol, etcétera”³⁹.

“Otros compuestos de interés en las flores de Caléndula son los triterpenos, de los cuales han sido identificados por diversos investigadores. El 3,16,21 trihidroxi-ursaeno, el ursadiol, los heliantriol A0 B1, B2 y C, el 3,16,28 trihidroxi olean- 12- eno, el 3,16,28 trihidroxi lup-20, el 3,16,22 trihidroxi tarax-20-eno, el 3,16,30 trihidroxi tarax-20-eno y calendulosido F”^{40 41}.

³⁵ Leach MJ. Calendula officinalis and wound healing:A systematic review. Wounds, 2008; 20(8): 1-7.

³⁶ Perez-Guitierrez S, Vargas-Solis R, Miguel ZS, Perez-G C, Perez-G RM. Inhibitory effect of five plant extracts on heart rates of rats. Phytother Res, 1998; 12: S49-50.

³⁷ Ociosziynska Y. Study of the chemistry of *C. officinalis* inflorescences. Herba Pol 1977;23(3):191-9.

³⁸ Karamaya MS. Study of b-carotene in certain Egyptian vegetable organs. Egypt J Pharm Sci 1976;16(3):399-404.

³⁹ Ociosziynska, Op. Cit. pag 30

⁴⁰ Kaspezyk Z. Structure of a new triterpene triol from *C.officinalis* flowers. Phytochemistry 1973;12(9):2999-3000.

“Otros compuestos presentes son las Saponinas”⁴². “ácidos fenólicos, taninos y cumarinas”⁴³.

4.4 FITOTERAPIA

Según Varcacel “la fitoterapia es la utilización de plantas o partes de ellas con fines terapéuticos y viene siendo utilizada por los animales y el hombre desde la prehistoria, de hecho la mayor parte de los fármacos actuales están basados en los principios activos de las plantas”⁴⁴.

Por otro lado Saz afirma que “la fitoterapia se utiliza en dos sentidos: como terapia específica e inespecífica. Específica: por acciones farmacológicas aisladas sobre un órgano. Inespecífica: por la acción general sobre el organismo debido al complejo sistema de reacción de las plantas, donde muchos de los componentes o metabolitos poseen un efecto sinérgico entre sí”⁴⁵.

4.5 TINTURAS MADRES

Sharapin define “las tinturas madres como preparaciones líquidas que resultan de la acción disolvente y/o extractiva de un solvente inerte hidroalcohólico sobre la droga vegetal. Estas tinturas madres, se pueden representar utilizando los símbolos TM, o Δ, colocado después del nombre científico de la planta, *Caléndula officinales*, L. TM o *Caléndula officinales*, L. Δ. Las tinturas madres se clasifican como provenientes de materia prima vegetal o animal”⁴⁶.

4.5.1. Preparación de las Tinturas Madres (TM). La farmacopea homeopática Brasileña recomienda “la preparación de las tinturas madres a partir de plantas frescas o de plantas secas. Las plantas frescas se extraen por maceración después de determinar la humedad contenida en la planta, utilizando para su cálculo el secado de una muestra de la misma hasta alcanzar un peso constante. Con esta información se calculan el volumen y

⁴¹ Sliworski J, Dzlewanowska K, Kasprk Z. Ursadiol. New triterpene diol from *C.officinalis* flowers. *Phytochemistry* 1973;12(1):157-60.

⁴² Vidal Ollivier F. Flavonol glycoside from *C.officinalis* flowers. *Planta Med* 1988;55(1):73-4.

⁴³ Istudor V. Chemical study of *Calendula* flower products, preparation of the type extract and determination of the control methodology. *Farmacia (Bucharest)* 1981;29(1):41-8.

⁴⁴ VARCACEL, María. *Fitoterapia*. [on line]. 2005 España. [Citado 14 marzo 2012] Disponible en internet: URL: <http://dsalud.com/fitoterapia-numero_17.htm>

⁴⁵ SAZ, Pablo. *Fitoterapia y Medicina Naturista*. [online] México 2003 [Citado 14 marzo 2012] Disponible en internet: <URL: http://www.unizar.es/med_naturista/plantas/plantas%20y%20mn.pdf>

⁴⁶ SHARAPIN Nikolai et al. *Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos*.

concentración de alcohol y la cantidad de agua que deberán ser utilizados en la extracción”⁴⁷.

4.5.2. Dilución de tinturas madres. Las formas farmacéuticas líquidas pueden ser preparadas a partir de tinturas o extractos vegetales. Los tinturas madres como la *Caléndula Officinalis*, L. TM, deben de diluirse y los extractos blandos y secos deben ser disueltos en el solvente de los jarabes o las gotas. Esta es la etapa más difícil de la fabricación, porque pueden formarse precipitados como consecuencia de la solubilidad poco satisfactoria de los principios activos o de los componentes secundarios en el componente escogido para dicho proceso. Para evitar este problema, deben tomarse algunas medidas:

- Para diluir un extracto fluido o una tintura o para disolver un extracto blando o seco, se debe emplear el mismo solvente empleado en su fabricación.
- Cuando esto no sea posible, se puede conseguir una mayor solubilidad utilizando co-solventes, como por ejemplo, glicerina, sorbitol, jarabe de glucosa, glicoles y poliglicoles.
- El uso de cosolventes no siempre da resultados satisfactorios; a veces, para conseguir la solubilización se deben de emplear cantidades elevadas de los mismos, lo que no siempre es posible en una formulación específica. En estos casos se pueden utilizar surfactantes no iónicos, como por ejemplo, los polisorbatos y derivados del ácido oleico y aceite de ricino.
- Cuando se trata de principios activos cuya solubilidad aumenta cuando estos forman sales, las variaciones de pH pueden mejorar la solubilidad y la estabilidad de algunos extractos.
- La filtración es un proceso que remueve todas las sustancias insolubles de un extracto. Sin embargo, es necesario considerar que la filtración también puede remover los principios activos. Siendo así esta operación debe de limitarse para aquellos productos que son fácilmente solubles en el solvente escogido y que no sufren pérdidas en el proceso de filtración⁴⁸.

4.5.3 Recolección y preparación de la caléndula. Fonnegra afirma “que la recolección se hace a mano antes de la floración. Los pétalos se secan a la sombra o a cielo abierto a una temperatura máxima de 35 °C para conservar su color y propiedades. Las cabezuelas de color naranja oscuro o rojizo son las

⁴⁷ SCHWAB, W. Pharmacopea Homeopathica Poliglota, Leipzig.1929.

⁴⁸ GALEANO Elkin *et al.* Formulación farmacéutica de productos fitoterapéuticos.

mejores para medicina natural ya que contienen más altas concentraciones de las sustancias activas”⁴⁹.

4.6 RESIDUOS DE FÁRMACOS EN ALIMENTOS DE ORIGEN ANIMAL

De acuerdo con los organismos mundiales de referencia, los residuos de fármacos en alimentos de origen animal son considerados como un factor de riesgo en la salud pública y como limitante en el desarrollo económico de cualquier país. Los residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal generan productos de baja calidad y constituyen un riesgo para la salud de los consumidores, produciendo toxicidad aguda o crónica, efectos teratogénicos y carcinogénicos, desórdenes en el desarrollo corporal, reacciones alérgicas y fenómenos de resistencia bacteriana, entre otros.² Estos efectos adversos han hecho que organizaciones internacionales regulen con fundamento científico los residuos de fármacos de uso veterinario potencialmente peligrosos para la salud humana⁵⁰.

Según el Consejo Nacional de Política Económica y Social de la República de Colombia a pesar de la antigüedad de las regulaciones internacionales existentes, sólo hasta hace poco en Colombia, dada la actual situación económica y comercial, se está prestando atención a esta problemática sanitaria y se han comenzado a adoptar nuevas medidas para reconocer la residualidad de fármacos y de otras sustancias en los alimentos de origen animal producidos en el país, con lo cual se pretende lograr mayor competitividad de los productos pecuarios en los mercados internacionales⁵¹.

Según la Asociación Nacional de Laboratorios de Productos Veterinarios tanto el *Codex Alimentarius* como la EMEA “han elaborado su propia lista de fármacos regulados, esta incluye los límites de residuos máximos para cada principio activo detallando en qué especie animal, tejido o subproducto de esta se establece dicho límite”⁵².

⁴⁹ FONNEGRA G. Ramiro, JIMENEZ R. Silvia Luz. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 2.a ed. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 2006. p. 73-74.

⁵⁰ Lozano María, MV, Arias Diana. Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia, [On line], Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia, 2008. [Citado 20 de octubre de 2012] Disponible en Internet: : <<http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/view/337> >

⁵¹ CONPES. Consejo Nacional de Política Económica y Social, República de Colombia, Departamento Nacional de Planeación, Documento Conpes 3376: Política Sanitaria de Inocuidad para las Cadenas de la Carne Bovina y de la Leche. 2005; [Agosto 2006] URL: <http://www.dnp.gov.co/archivos/documentos/Subdireccion_Conpes/3376.pdf. >

⁵² APROVET (Asociación Nacional de Laboratorios de Productos Veterinarios). Vademécum Veterinario Aprovet. Bogotá: Aprovet; 2002.

4.7 ELABORACIÓN DE LA TM DE *Caléndula officinalis*, L, Y SUS DILUCIONES.

4.7.1. Colecta y extracción del material vegetal. La recolección de las flores se realizó antes de su floración y se seleccionaron las cabezuelas de color naranja oscuro o rojizo. Después se separaron manualmente los materiales extraños como pedazos de madera, de metal o materiales de otra naturaleza. La tierra, arena y el polvo muy fino se separaron por medio de lavado con agua potable.

Para la extracción se utilizó etanol ya que es un solvente de naturaleza general, de alta polaridad que permite obtener un extracto cuya composición química contenga la mayor parte de los constituyentes químicos de la planta.

La elaboración de la *Caléndula officinalis*, L., TM, se basó en el método descrito por la Farmacopea Homeopática Brasileña para plantas frescas.

Para calcular la concentración y la cantidad de alcohol que se necesitaría se determinó primero el porcentaje de humedad de las flores de la siguiente manera:

Se tomaron tres muestras de 10 g de flores frescas y se llevaron a un horno a 40 °C hasta alcanzar un peso constante.

Tabla 1. Determinación del porcentaje de humedad de las flores frescas de caléndula.

Muestra	W1	W2	W3	W4(w3-w1)	W5 (w2-w4)	% Humedad
1	1,75 g	11,75 g	3,69 g	1,94 g	8,06 g	86
2	1,94 g	11,94 g	3,62 g	1,68 g	8,32 g	83,2
3	1,90 g	11,90 g	3,79 g	1,89 g	8,11 g	81,1
Promedio % de humedad						83,43%
Residuo seco						16,57%

Una vez determinado el porcentaje de humedad y el residuo seco se acudió a la tabla 2 para determinar la concentración de etanol que se debía utilizar y establecer el grado alcohólico final de la tintura madre.

Tabla 2. Cálculo de la concentración de alcohol para preparar la tintura madre.

Residuo seco	Alcohol que se debe utilizar	Grado de alcohol final de la tintura madre
Hasta 25%	90%	54 a 63%
30 a 35%	80%	61 a 65%
40 a 50%	70%	59 a 63%

Fuente: Sharapin N. *et al.*

Luego se calculó el volumen de etanol a utilizar para obtener una tintura madre, 1:10, con relación al residuo seco. Para lo cual se utilizó el siguiente procedimiento:

X= Cantidad de droga vegetal: 200 g

Xi= Residuo seco: 33,14g

Cantidad de agua= X-Xi: 166,86 ml

Volumen de Tintura Madre (1:10) a ser obtenida: (Residuo seco (Xi) x 10): 331,4 ml

Volumen de Alcohol a ser adicionado: (Volumen de Tintura Madre) – (Agua contenida en la planta): 164,54 ml

Posteriormente el material vegetal fresco y el etanol se llevaron a un matraz Erlenmeyer, el cual se selló herméticamente para evitar evaporación del solvente durante la extracción y se dejó durante 20 días con agitación diaria. Una vez transcurrido el tiempo de la maceración se prensó en una prensa de cesta y se filtró por medio de sedimentación que consiste en dejar la suspensión en reposo por 48 horas. El sobrenadante limpio se separó haciendo sifón⁵³.

4.7.2. PROCESO DE DILUCIÓN DE LA TM DE *Caléndula officinalis*, L.

Se parte de *Caléndula officinalis* TM previamente preparada.

Procedimiento:

- Obtención de una dilución al 60%, medir 3 ml de *Caléndula officinalis* TM y aforar (enrazar) con agua bidestilada hasta 5 ml.

⁵³ SHARAPIN Nikolai et al. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos.

- Obtención de una disolución al 40%, medir 2 ml de *Caléndula officinalis* TM y aforar (enrazar) con agua bidestilada hasta 5 ml.
- Obtención de una disolución al 20%, medir 1 ml de *Caléndula officinalis* TM y aforar (enrazar) con agua bidestilada hasta 5 ml.

4.8 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

Se pesan 13 gr del medio Agar Saboreaud en una pesa sustancias y se mezcla con 200 ml de agua destilada en un Erlenmeyer, utilizando una cuchara plástica y se tapa con papel aluminio. Esta mezcla se calienta en una estufa, agitando frecuentemente y se deja hervir por un minuto, con el fin de homogeneizarla y posteriormente, para esterilizar, se la lleva a autoclave a 121° C por 15 minutos.

A continuación se deja enfriar el medio, ya preparado, al aire libre y enseguida se distribuye en las cajas de Petri, teniendo encendidos los mecheros alrededor, para evitar posibles contaminaciones y se dejan enfriar para que solidifiquen e inmediatamente se los lleva a refrigeración.

4.9 PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR EL EFECTO ANTIFÚNGICO.

“Este procedimiento se basó en la metodología usada por Rivero López”⁵⁴, a la cual se le hizo una modificación, donde se agregó el uso de sensidiscos a parte de las perforaciones en el agar:

1. Se prepara el medio de cultivo Agar Saboreaud, como ya se ha descrito, y se mantiene a una temperatura de 50° C en baño maría.
2. En un tubo de ensayo estéril, se mezclan partículas del hongo con agua destilada estéril (1 ml por caja de Petri) con el fin de homogeneizar el hongo.
3. Se mezcla la solución homogeneizada del hongo con el medio de cultivo y se deposita en las cajas de Petri (aproximadamente 10 ml).

⁵⁴RIVERO LÓPEZ, Miguel, *et al.* Actividad antifúngica in Vitro del *Pinuscaribaea* (pino macho). *Rev. Cubana PlantMed.* [Online]. Ene.-abr.1997, Vol.2, no.1 [citado 07 marzo 2012], p.25-29. Disponible en la World Wide Web: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-7961997000100006&lng=es&nrm=iso.

4. Se preparan los sensidiscos con papel de 75 g, de un diámetro de 5 mm y se dejan en los extractos y controles para que se impregnen de las soluciones durante 30 minutos.
5. Una vez el medio coagula se realizan 5 perforaciones de 5 mm por caja y se coloca en cada perforación un sensidisco de cada tratamiento.
6. Posteriormente se llevan a incubadora a 26° C durante 7 días.

Transcurridos los 7 días se procede a realizar las mediciones de los halos, se realizan 2 mediciones de cada halo y se promedia.

5. DISEÑO METODOLÓGICO

5.1 LOCALIZACIÓN

“El presente estudio se realizó en las instalaciones de la Universidad de Nariño de la Ciudad de San Juan de Pasto, departamento de Nariño Colombia, la cual se encuentra a una altitud de 2640 msnm, con una precipitación promedio de 850 mm por año, humedad relativa del 70% y una temperatura promedio de 14° C”⁵⁵.

5.2 MUESTRA

Las muestras se obtuvieron de los cuyes que presentaban signos de dermatofitosis de la Granja experimental Botana propiedad de la Universidad de Nariño el día 13 de febrero de 2013.

Los cuyes muestreados fueron los siguientes:

Cuadro 1. Animales y muestras usados en el estudio

Cuy N°.	Sexo	Muestras
028 D	Hembra	Raspado de cara
4123 D	Hembra	Raspado de cara
4131 F	Hembra	Raspado de cara
022 D	Hembra	Raspado de cara
4134 C	Hembra	Raspado de cara
4161 C	Hembra	Raspado de cara
4165 F	Hembra	Raspado de cara

A los cuales se les hizo un raspado de piel de las zonas afectadas, también se tomó pelos de alrededor de la zona alopecica y se hizo impresiones de la piel afectada con cinta adhesiva.

Estas muestras se colocaron entre portaobjetos para su traslado al Laboratorio de la Clínica Veterinaria Carlos Martínez Hoyos de la Universidad de Nariño.

⁵⁵ FAJARDO, Rota y CIFUENTES, Jorge. Diccionario geográfico de Colombia. Santa Fe de Bogotá. D.C.: Instituto geográfico “Agustín Codazzi”. P. 350.

Figura 3. Lesiones de Dermatofitos en los animales muestreados



Figura 4. Lesiones cutáneas en los animales objeto de muestra



Se procedió a hacer el examen directo, como lo menciona Murillo haciendo montajes al microscopio de las muestra de piel y pelos tomadas de los cuyes, entre un portaobjetos y un cubreobjetos con hidróxido de potasio (KOH) al 10 %, se flameó la muestra, e inmediatamente se pasó al microscopio, esto con el fin de encontrar muestras positivas a dermatofitos, para posteriormente sembrarlas e identificar *Trichophyton sp.*

Las muestras que dieron resultado positivo a dermatofitos al examen directo, se condujeron posteriormente a su cultivo en cajas de Petri en el medio agar Sabouraud.

Cuadro 2. Identificación de muestras para siembra

Muestra N°.	Cuy N°.	Examen directo
1	028 D	Lesión endotrix
2	4123 D	Lesión endotrix y exotrix
3	4131 F	Lesión endotrix y exotrix
4	022 D	Lesión endotrix
5	4134 C	Lesión endotrix
6	4161 C	Lesión endotrix y exotrix
7	4165 F	Lesión endotrix

Cultivo: Las muestras que dieron positivas al examen directo se procedieron a sembrar con la técnica de punción en el medio ya preparado, y se llevaron a incubadora con una temperatura de 26°C por 7 días. El número de cajas de Petri fueron 7 de la siguiente manera:

Cuadro 3. Siembras realizadas para el estudio

N°. de caja	Muestra
1	028 D
2	4123 D
3	4131 F
4	022 D
5	4134 C
6	4161 C
7	4165 F

Transcurridos 7 días, se realizó la identificación de las colonias de hongos existentes, teniendo en cuenta las características macroscópicas y microscópicas para lo que se llevó a cabo un montaje en microscopio de la impronta de cada colonia con cinta adhesiva sobre un portaobjetos, aplicando azul de metileno para su observación al microscopio y posterior identificación de *Trichophyton sp.*

Las colonias positivas a *Trichophyton sp* fueron las siguientes:

Cuadro 4. Identificación de colonias sembradas para el estudio

Muestra N°	Caja N°	Descripción macroscópica	Descripción microscópica
028 D	1	Colonia rosa aplanada aterciopelada	Macroconidias en forma de cigarro, hifas septadas y largas características de <i>Trichophyton sp.</i>
4123 D	2	Colonia rosa aplanada aterciopelada	Hifas largas y septadas. Macroconidias en forma de habano o cigarro.
4131 F	3	Colonia rosa aplanada aterciopelada	Hifas largas y septadas. Macroconidias en forma de habano o cigarro.
022 D	4	Colonia rosa aplanada aterciopelada	Hifas largas y septadas. Macroconidias en forma de habano o cigarro.
4134 C	5	Colonia rosa aplanada aterciopelada	Hifas largas y septadas. Macroconidias en forma de habano o cigarro.
4161 C	6	Colonia rosa aplanada aterciopelada	Hifas largas y septadas. Macroconidias en forma de habano o cigarro.
4165 F	7	Colonia rosa aplanada aterciopelada	Hifas largas y septadas. Macroconidias en forma de habano o cigarro.

Figura 5. Caja con siembra de *Trichophyton sp.*



Se realizaron nuevamente siembras de *Trichophyton sp.* De todas las muestras en 12 cajas Petri con el mismo procedimiento que las anteriores.

Posteriormente se llevó a cabo el muestreo piloto con dos réplicas de cada tratamiento como lo indica el diseño experimental, con el fin de obtener el número de réplicas necesarias para continuar con el estudio. Por lo tanto se siembran dos cajas Petri con el hongo *Trichophyton sp.*

5.3 INSTALACIONES Y EQUIPOS

En este estudio las instalaciones utilizadas fueron casi en su totalidad pertenecientes a la Universidad de Nariño a excepción de la identificación de las improntas de colonias la cual se realizó en el laboratorio clínico veterinario LADIVET.

La toma de muestras se realizó en la Granja experimental Botana y su procesamiento y el análisis antifúngico se efectuó en el Laboratorio Clínico de la Clínica Veterinaria Carlos Martínez Hoyos.

Los equipos usados en el estudio fueron:

- Cámara de flujo laminar
- Incubadora
- Refrigerador
- Microscopio
- Autoclave

Materiales para la toma de muestras (raspado de piel y muestras de pelo):

- Cuchillas de bisturí estériles
- Guantes de látex
- Portaobjetos
- Cinta adhesiva

Materiales para la preparación del medio de cultivo:

- Agar Sabouraud Dextrosa
- Balanza
- Agua destilada
- Estufa
- Autoclave
- Erlenmeyer
- Cajas de Petri estériles
- Mechero
- Hojas de papel

- Papel aluminio
- Cuchara plástica

Materiales para la preparación de los tratamientos:

- Flores de Caléndula (*Caléndula officinalis*, L.)
- Etanol de 90°
- Botella de vidrio oscuro
- Balanza
- Guantes
- Prensa de cesta
- Dinamizador: recipiente con tapa que permita agitar y golpear los líquidos o soluciones en proceso.
- Pipeta graduada de un (1) mililitro.
- Balones aforados de 25 ml
- Tubos de ensayo de 20 ml
- Agua bidestilada y desionizada

5.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

En este estudio se realizó un diseño experimental con un factor de efectos fijos (Modelo unifactorial de efectos fijos), y se realizó una prueba de contrastes múltiples de rango (Tukey).

Modelo unifactorial de efectos fijos: $X_{ij} = \mu_i + e_{ij}$

X_{ij} = Efectos de las diferentes concentraciones i en la repetición j . (Valor de la variable de respuesta correspondiente a la observación).

μ = Promedio de los tratamientos. (Concentraciones).

I = Número de tratamientos. (Concentraciones) de 1 a 6.

J = Número de repeticiones. 1, n .

e_{ij} = Residuos o variaciones debido al error.

Las hipótesis son las siguientes:

$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5 = \mu_6$ (No hay diferencias entre los tratamientos)

$H_a = \mu_i \neq \mu_j$ para alguno de los valores $i \neq j$. $i, j = 1$ a 6

Para determinar el número de réplicas que se aplicaron de cada tratamiento se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Repeticiones } r = 2 \times (\sigma / \delta)^2 \times (Z\alpha + Z\beta)^2$$

σ = Desviación estándar. Para su cálculo se hará un muestreo piloto con 2 réplicas de cada tratamiento.

δ = Diferencia mínima.

α = Significancia de acuerdo a los resultados de la muestra piloto va de 5 a 10 %.

$1 - \beta$ = Probabilidad.

Utilizamos la siguiente tabla para calcular $(Z\alpha + Z\beta)^2$ en la prueba bilateral (dos colas).

1-β	β	A		
		0.01	0.05	0.10
0.80	0.20	11.63	7.84	6.15
0.90	0.10	14.82	10.50	8.53
0.95	0.05	17.72	12.96	10.76

En la tabla 3 se exponen los halos inhibitorios obtenidos en el pre ensayo.

TABLA 3. Preensayo realizado para obtener el número de repeticiones.

CAJA	Halo inhibitorio en cm.					
Número	A	B	C	D	CP	CN
1	0	0	0	0	1,1	0
2	0	0	0	0	1	0

A: *Caléndula officinalis*, L., TM, dilución al 20%.

B: *Caléndula officinalis*, L., TM, dilución al 40%.

C: *Caléndula officinalis*, L., TM, dilución al 60%.

D: *Caléndula officinalis*, L., TM.

CP: Nistatina.

CN: Etanol 90°.

Media (μ) = $\Sigma y_i / n = 0.175$

Varianza (S^2) = $\Sigma (y_i - \mu)^2 / n - 1 =$

En la tabla 4 se muéstralas varianzas obtenidas con los datos del pre ensayo.

Tabla 4. Varianza de los datos del pre ensayo.

CAJA 1	Varianza	CAJA 2	Varianza
(1,1 - 0.175) ²	= 0,855625	(1 - 0.175) ²	= 0,680625
(0 - 0.175) ²	= 0,030025	(0 - 0.175) ²	= 0,030025
(0 - 0.175) ²	= 0,030025	(0 - 0.175) ²	= 0,030025
(0 - 0.175) ²	= 0,030025	(0 - 0.175) ²	= 0,030025
(0 - 0.175) ²	= 0,030025	(0 - 0.175) ²	= 0,030025
(0 - 0.175) ²	= 0,030025	(0 - 0.175) ²	= 0,030025

$\Sigma (y_i - \mu)^2 = 1.8425$

$\Sigma (y_i - \mu)^2 / n - 1 = 0.1675$

Desviación estándar $S = \sqrt{0.1675}$ $S^2 = 0.1675 = 0.4092676385936225$

Diferencia mínima = 0.55 cm.

$r = 2 \times (0.4092676385936225 / 0.55)^2 \times 12.96$

$r = 2 \times (0.5537190082644628) \times 12.96$

$r = 14.35239669421488$

5.4.1 VARIABLES A EVALUAR

- **Diferencias entre tratamientos:** Se determinó a través del modelo estadístico unifactorial de efectos fijos.
- **Porcentajes de inhibición relativa (PIR):** Se evaluó teniendo en cuenta la fórmula descrita por Rivero López “et al”⁵⁶, el porcentaje de inhibición relativa (PIR): asumiendo que el máximo efecto inhibitorio es el producido por el control positivo (CP), se determina el porcentaje de efecto de inhibición del crecimiento del microorganismo de cada extracto, relativo al CP.

Para el cálculo se procede de la siguiente manera:

$$PIR = \frac{X \text{ diám. Halo inhib. del extracto}}{X \text{ diám. Halo inhib. control positivo}} \times 100$$

⁵⁶ RIVERO LÓPEZ, Miguel, ÁLVAREZ GONZALES, Manuel, LÓPEZ ACOSTA, Tania *et al.* Actividad antifúngica in vitro del pinus caribaea (pino macho). Rev. Cubana Plant Med. [Online]. Ene. 1997, Vol. 2, no.1 . [citado 03 febrero 2013], p.25-29. Disponible en la World wide web: http://scielo.sld.cu/cielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-7961997000100006&ing=es&nrm=iso.

6. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 MEDIDAS HALOS INHIBITORIOS

En la tabla 5. Se enumeran los halos inhibitorios obtenidos con cada tratamiento.

Tabla 5. Halos inhibitorios obtenidos con los tratamientos

CAJA Número	Halo inhibitorio en cm.					
	A	B	C	D	CP	CN
1	0	0	0	0	1,1	0
2	0	0	0	0	1	0
3	0	0	0	0	1,5	0
4	0	0	0	0	1,7	0
5	0	0	0	0	1,2	0
6	0	0	0	0	1	0
7	0	0	0	0	1	0
8	0	0	0	0	1,5	0
9	0	0	0	0	1,2	0
10	0	0	0	0	1	0
11	0	0	0	0	1,2	0
12	0	0	0	0	1	0
13	0	0	0	0	1	0
14	0	0	0	0	1,5	0

A: *Caléndula officinalis*, L., TM, dilución al 20%.

B: *Caléndula officinalis*, L., TM, dilución al 40%.

C: *Caléndula officinalis*, L., TM, dilución al 60%.

D: *Caléndula officinalis*, L., TM.

CP: Nistatina.

CN: Etanol 90°.

6.1.1 Prueba de contraste múltiple de rango (Tukey)

Tabla 6. Medias de los tratamientos.

Tratamiento	Frecuencia	Media
Control negativo (CN)	14	0
20% (A)	14	0
40% (B)	14	0
60% (C)	14	0
<i>Caléndula officinalis</i> , L., TM	14	0
Control positivo (CP)	14	1.2071428571

Tabla 7. Test Tukey

Contraste	Diferencias
A – B	0
A – C	0
A – D	0
A – CN	0
A – CP	* - 1.2071428571
B – C	0
B – D	0
B – CN	0
B – CP	* - 1.2071428571
C – D	0
C – CN	0
C – CP	* - 1.2071428571
D – CN	0
D – CP	* - 1.2071428571
CN – CP	* - 1.2071428571

* Diferencia significativa

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar las medias que son significativamente diferentes unas de otras. La mitad inferior de la salida muestra la diferencia estimada entre cada par de medias.

La prueba de Tukey nos indica que existen diferencias significativas con un 95% de confianza, entre los siguientes tratamientos:

- *Caléndula officinalis*, L., TM, dilución al 20% vs. Control positivo
- *Caléndula officinalis*, L., TM, dilución al 40% vs. Control positivo
- *Caléndula officinalis*, L., TM, dilución al 60% vs. Control positivo
- *Caléndula officinalis*, L., TM vs. Control positivo
- Control negativo vs. Control positivo

Además, la prueba de Tukey nos muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos que incluyen la *Caléndula officinalis*, L., TM. Y sus diluciones.

6.2 PORCENTAJES DE INHIBICIÓN RELATIVA (PIR)

La Tabla 8. Muestra los porcentajes de inhibición relativa de la *Caléndula officinalis*, L., TM, y sus diluciones, frente al control positivo (nistatina). Observamos que estos no muestran capacidad antifúngica.

Se puede observar que el control negativo (etanol 90°) y la *Caléndula officinalis*, L., TM, y sus diluciones al 20, 40 y 60% no presentan actividad antifúngica alguna. Esto se comprueba aplicando el test de rangos múltiples (Tukey) donde se muestra estadísticamente que no existen diferencias significativas entre los tratamientos mencionados.

Tabla 8. Porcentajes de inhibición relativa obtenidos con los tratamientos.

Porcentaje de inhibición relativa PIR				
A	B	C	D	E
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0
0	0	0	0	0

7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

7.1 CONCLUSIONES

- La Tintura madre de caléndula (*Caléndula officinalis*, L., TM.) no demostró tener actividad antifúngica, con un porcentaje de inhibición relativa (PIR) de 0%.
- Con un nivel de confianza del 95%, podemos concluir que no existen diferencias significativas entre dilución al 20% vs. dilución al 40%; dilución al 20% vs. dilución al 60%; dilución al 20% vs. *Caléndula officinalis*, L., TM; dilución al 20% vs. Control negativo; dilución al 40% vs dilución al 60%; dilución al 40% vs *Caléndula officinalis*, L; dilución al 40% vs. Control negativo; dilución al 60% vs *Caléndula officinalis*, L; dilución al 60% vs Control negativo; *Caléndula officinalis*, L. vs Control negativo.

7.2 RECOMENDACIONES

- Estudiar el efecto de otras plantas medicinales con efecto antifúngico, como el ajo (*Allium savitum*), pino macho (*Pinus caribaea*) como potenciales fitoterapias en las explotaciones de cuyes.
- Estudiar otras formas de extraer los principios activos de la Caléndula y las correspondientes fracciones; como por ejemplo extrayendo el aceite esencial.
- Determinar el efecto antifúngico de la Caléndula en otras especies de hongos que afectan los animales domésticos.
- Determinar si la caléndula posee efectos antiinflamatorios o cicatrizantes que pueden contribuir a la resolución de lesiones dérmicas.

BIBLIOGRAFIA

BAKÓ E, DELI J, TOTH G. HPLC Study on the carotenoid composition of Calendula products. Journal of Biochemical and Biophysical methods, 2002.

CABAÑEZ, FJ. Dermatophytes in domestic animals. En: Kushwaha RKS, Guarro J (Eds.) Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. Bilbao, Revista Iberoamericana de Micología, 2000: 104-108.

CAICEDO Alberto *et al.* Producción sostenible de cuyes. ASINDETEC, Asociación para la investigación y el desarrollo tecnológico, agropecuario y agroindustrial. VIPRI - Universidad de Nariño, Primera Edición 2011.

CHAUCA, Lilia, producción de cuyes (*Cavia porcellus*), [On line], La Molina, Perú., Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, 1997. [Citado 28 de enero de 2011] Disponible en Internet: <<http://www.fao.org/DOCREP/6562s/6562s00.htm>>

CERVANTES OLIVARES, R. Tiñas (Ringworm) en perros y gatos. [on line]. Departamento de microbiología e inmunología, laboratorio de micología, Universidad Nacional Autónoma de México. México DF, México, 2 marzo de 2004. [Citado 22 febrero 2013] Disponible en internet <URL:http://www.ivis.org/advances/infect_dis_carmichael/cervantes_es/ivis.pdf> > pág. 4

Clemente semillas y plantas. Disponible en internet: http://blog.clementeviven.com/?page_id=83

CONPES. Consejo Nacional de Política Económica y Social, República de Colombia, Departamento Nacional de Planeación, Documento Conpes 3376: Política Sanitaria de Inocuidad para las Cadenas de la Carne Bovina y de la Leche. 2005; [Agosto 2006] URL: <http://www.dnp.gov.co/archivos/documentos/Subdireccion_Conpes/3376.pdf>

FAJARDO, Rota y CIFUENTES, Jorge. Diccionario geográfico de Colombia. Santa Fe de Bogotá. D.C.: Instituto geográfico "Agustín Codazzi". P. 350.

FRAILE OCAÑA, cristeta, ZURUTUZA, ione, Valdivieso, paula, Dermatofitosis en animales de compañía: riesgo zoonótico. Trabajo científico [on line]. [Citado 16 abril 2013] disponible en internet [URL:http://especialistasveterinarioeuropolis.com/PUBLICACIONES/dermatofitos.pdf](http://especialistasveterinarioeuropolis.com/PUBLICACIONES/dermatofitos.pdf)

FRANKIC T, SALOBIR K, SALOBIR J. The comparison of in vivo antigenotoxic antioxidative capacity of two propylene glycol extracts of *Calendula officinalis* (Marigold) and vitamin E in young growing pigs. *J Anim Physiol Anim Nutr*, 2008;41: 1-7.

FONNEGRA G. Ramiro, JIMENEZ R. Silvia Luz. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. 2.a ed. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 2006. p. 73-74.

FOSTER & SMITH. Ringworm in Rabbits & Guinea Pigs. Holly nash, DVD, MS. Veterinary services department. PetEducation.com [On line] 2007. [Citado 29 enero de 2012] Disponible en internet: <[URL:http://www.peteducation.com/article.cfm?articleid=2494](http://www.peteducation.com/article.cfm?articleid=2494)>

GALEANO Elkin, JIMÉNEZ Nora y OSORIO Edison . Formulación farmacéutica de productos Fitoterapéuticos. [On line]. [Citado 19 de octubre de 2012] p. 3-4 Disponible en internet: < <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/formfarm.pdf> >

HERBOTECNIA- TECNOLOGÍA EN PRODUCCIÓN DE PLANTAS MEDICINALES, AROMÁTICAS Y TINTÓREAS. *Caléndula*, [On line] Argentina 2006 [Citado 25 de enero de 2012] Disponible en internet: <URL: http://herbotecnia.com.ar/aut_calen.html>

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN Y EXTENSIÓN AGRARIA (INIA), Tecnologías propuestas por el programa de crianzas familiares [On line] Perú. Diciembre 2004. [Citado 25 de enero 2012] Disponible en internet: <URL://<http://www.perucuy.com/site/modules.php?name=News&file=article&sid=48>>

ISTUDOR V. Chemical study of *Calendula* flower products, preparation of the type extract and determination of the control methodology. *Farmacia (Bucharest)* 1981;29(1):41-8.

JAWETZ. MELNICK. Y ADELBERG. Microbiología Médica. México. Editorial Manual Moderno. 2002. Pag. 844

KALVATENE Z, WALDER R, GABZARO D. Anti-HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. *Biomed & Pharmacother*, 1997; 51: 176-180.

KANE J, SUMMERBELL R, SIGLER L, KRAJDEN S, LAND G. Laboratory handbook of dermatophytes: a clinical guide and laboratory handbook of dermatophytes and other filamentous fungi from skin, hair, and nails. Belmont, Star Publishing Co., 1997.

KARAMAYA MS. Study of b-carotene in certain Egyptian vegetable organs. *Egypt J Pharm Sci* 1976;16(3):399-404.

KASPEZYK Z. Structure of a new triterpene triol from *C.officinalis* flowers. *Phytochemistry* 1973;12(9):2999-3000.

KUSHWAHA RKS, GUARRO J (Eds.) Biology of dermatophytes and other keratinophilic fungi. Bilbao, Revista Iberoamericana de Micología, 2000. [Citado 22 febrero de 2013].

LABORATORIO VETERINARIO ESPECIALIZADO Vetlab®. Conceptos para el diagnóstico microscópicos de micosis dérmica en medicina veterinaria. [on line] Santiago, Chile. Septiembre de 2005 [citado 22 febrero de 2013]. Disponible en internet <URL:http://www.vetlab.blogspot.com/2005_09_01_archive.html>

IAUK L, LO-BUE AM, MILAZZO I, RAPISARDA A, BLANDINO G. Antibacterial Activity of Medicinal Plant Extracts Against Periodontopathic Bacteria. *Phytother Res*, 2003; 17: 599-604.

LEACH MJ. *Calendula officinalis* and wound healing:A systematic review. *Wounds*, 2008; 20(8): 1-7.

LIN LT, LIU LT, CHIANG LC, LIN CC. In vitro antihepatoma activity of fifteen natural medicines from Canada. *Phytother Res*, 2002; 16: 440- 444.

LLEONART, F. Dermatomicosis. Conejos y algo más[On line] Buenos Aires (Argentina) [Citado 24 de enero 2012] Disponible en internet:

<URL: <http://www.conejosyalgomas.com.ar/articulos023.asp?ootkey=228&ootest=3>>

LOZANO María, ARIAS Diana. Residuos de fármacos en alimentos de origen animal: panorama actual en Colombia, [On line], Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia, 2008. [Citado 20 de octubre de 2012] Disponible en Internet: : <<http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs/article/view/337>>

MOYA, Manuel. Dermatofitosis en cobayos de bioterio convencional de la Granja experimental "La Torcaz" [On line]. Agosto de 2005 [Citado 28 de enero 2012] p. 84 Disponible en internet: <<http://72.14.209.104/search?q=cache:t8lakb2q97KJ:bibliofcv.veter.ucv.ve/revistafcv/pdf/Moyanew.pdf+dermatofitosis+cobayos&hl=es&ct=dak&cd=28gl=co>>

MURILLO NEUFELD, Paulo. Diagnóstico laboratorial de las Dermatofitosis. Revista del colegio de microbiólogos. [on line]. Rio de janeiro, Brasil, 2001 [citado 22 febrero de 2013] disponible en internet <URL:<http://www.colegiomicrobilogosc.org/revista/2001-5%20Diagn%F3stico%20Laboratorial%20de%20las%20Dermatofitosis.doc>>

NIKOLAI Sharapin, LEANDRO Machado rocha, ELIANA Souza Carvalho, ELISABETH de Albuquerque Lucio, ELISABETH Valverde Macedo dos Santos y JOSÉ López de Almeida. Fundamentos de Tecnología de Productos Fitoterapéuticos. Santafé de Bogotá. D.C.: Convenio Andrés Bello CAB. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo CYTED. 2000. 248 p. (Serie Ciencia y Tecnología No. 79) ISBN: 958-698-024-3

ORTEGÓN. M y MORALES, F. El cuy (*Cavia porcellus*). Pasto- Colombia: Marmor, Edición Técnica, 1987.

OCIOSZIYNSKA Y. Study of the chemistry of *C. officinalis* inflorescences. Herbal Pol 1977;23(3):191-9.

PEREZ GUITIERREZ S, VARGAS-SOLÍS R, MIGUEL ZS, PÉREZ-G C, PÉREZ-G RM. Inhibitory effect of five plant extracts on heart rates of rats. Phytother Res, 1998; 12: S49-50.

POPOVIC M, KAURINOVIC B, MIMICA-DUKIC N, VOJINOVIC-MILORADOV M, CUPIC V.. Combined effects of plant extracts and xenobiotics on liposomal

lipid peroxidation. Part 1. Marigold extract-ciprofloxacin/pyralene. Oxidation, Commum, 1999; 22: 487-494.

REZUSTA LÓPEZ, Antonio. SÁNCHEZ SOUZA, Aurora. Y GIL TOMAS, Joaquina. Fundamentos básicos para el diagnóstico micológico. Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. Revista iberoamericana de micología. [on line]. Bilbao, junio del 2006. Cap. 3. [citado 22 febrero de 2013] disponible en internet <URL:<http://www.guia.reviberoammicol.com/cap3.pdf>> ISBN: 84 – 607 -3050 – 6

RIVERO LÓPEZ, Miguel, *et al.* Actividad antifúngica in Vitro del *Pinuscaribaea* (pino macho). *Rev. Cubana PlantMed.* [Online]. Ene.-abr.1997, Vol.2, no.1 [citado 07 marzo 2012], p.25-29. Disponible en la World Wide Web: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-7961997000100006&lng=es&nrm=iso>.

RODRÍGUEZ Luis, MONCAYO Roberto, RICO Elizabeth, CAYCEDO Alberto. Producción de cuyes. Lima, Perú., Fondo editorial de la universidad Católica Sedes Sapientiae, Primera edición, Noviembre 2009.

SAMUS, Sergio. Dermatofitosis. Revistas de Cabaña Lagunita N° 15. [On line] Jujuy, Argentina 2006. [Citado el 28 de febrero 2012]. Disponible en internet: <[URL:http://www.pyme.mendoza.gov.ar/pdf/cursos/conejos%20Lagunita.pdf](http://www.pyme.mendoza.gov.ar/pdf/cursos/conejos%20Lagunita.pdf)>

SAZ, Pablo. Fitoterapia y Medicina Naturista. [online] México 2003 [Citado 14 marzo 2012] Disponible en internet: <URL: http://www.unizar.es/med_naturista/plantas/plantas%20y%20mn.pdf>

SCHWAB, W. Pharmacopoea Homeopathica Poliglota, Leipzig. 1929.

SLIWORSKI J, DZLEWANOSWSKA K, KASPRZK Z. Ursadiol. New triterpene diol from *C. officinalis* flowers. *Phytochemistry* 1973;12(1):157-60.

TOMÁS Moore, SÁNCHEZ Luz, DESMARCHELIER Cristian. Manual de Cultivo y Manejo de Caléndula [On line], Buenos aires Argentina [Citado 25 de enero de 2012] Disponible en internet: http://www.google.com.co/#hl=es&q=calendula+officinalis+pdf&oq=calendula+off&aq=4&aqi=q10&aql=&gs_sm=c&gs_upl=2980199988101107074147145113131914331751417.14.17.1.114110&bav=on.2,or.r_gc.r_pw.,cf.osb&fp=7e997f58300d40ba&biw=1249&bih=574

Ukiya M, Akihisa T, Yasukawa K, Tokuda H, Suzuki T, Kimura Y. Antiinflammatory, anti-Tumor- Promoting and Cytotoxic Activities of Constituents of Marigold (*Calendula officinalis*)Flowers. J Nat Prod, 2006; 69: 1692-1696.

VARCACEL, María. Fitoterapia. [on line]. 2005 España. [Citado 14 marzo 2012] Disponible en internet: URL: <[http://.dsalud.com/fitoterapia-numero 17.htm](http://.dsalud.com/fitoterapia-numero_17.htm)>

Vidal-Ollivier F. Flavonol glycoside from *C.officinalis* flowers. Planta Med 1988;55(1):73-4.

WIKIPEDIA, The free encyclopedia. [Citado 16 de marzo 2012] Disponible en internet: <http://en.wikipedia.org/wiki/Calendula_officinalis>

ANEXOS

Anexo A. Elaboración de la *Caléndula officinalis*, L., TM



Anexo B. Elaboración de las diluciones de *Caléndula officinalis*, L., TM





Anexo B. Identificación de dermatofitos con KOH





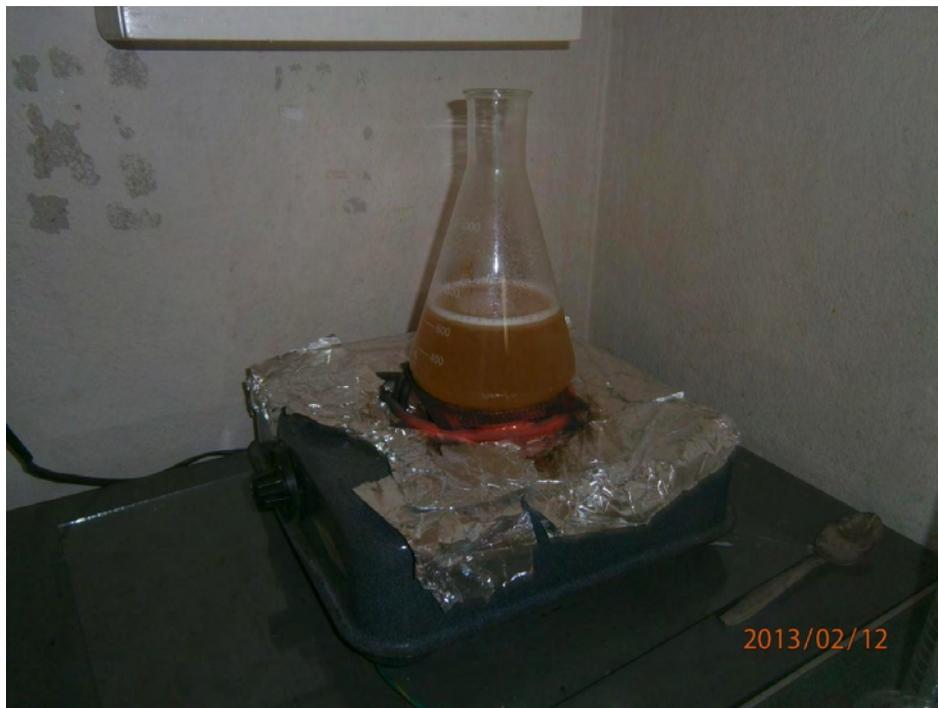
Anexo C. Equipos



Incubadora



Microscopio



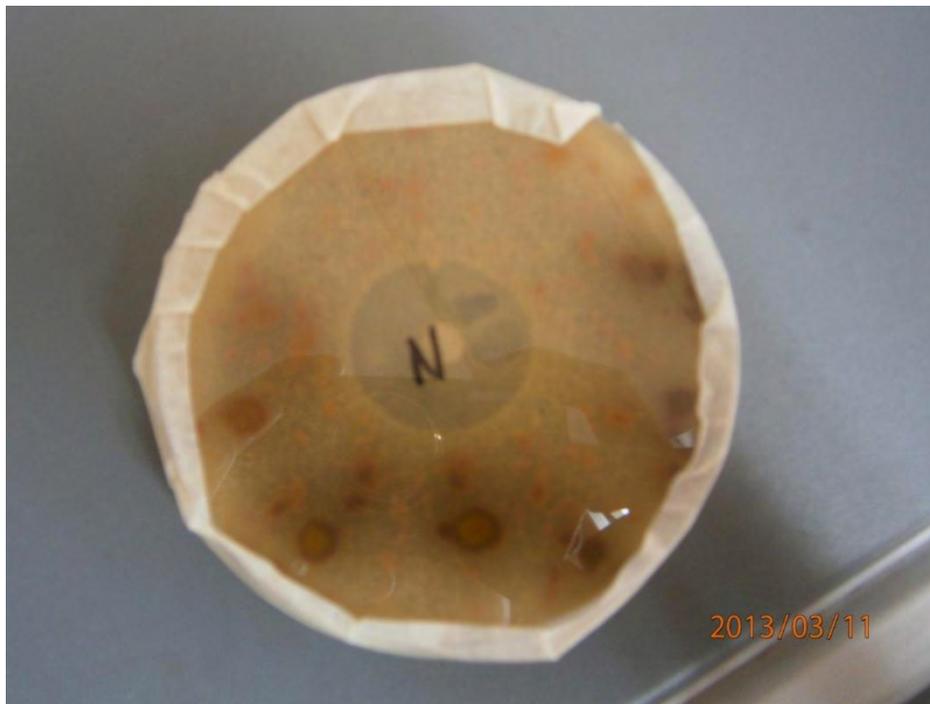
Medio de cultivo

Anexo D. *Trichophyton sp.* Vista al microscopio



40X

Anexo E. Control positivo (nistatina)



Anexo F. *Caléndula officinalis*, L., TM y sus diluciones.

