

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



Determinación de la actividad antifúngica del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) frente a *Candida albicans* in vitro comparado con fluconazol

Tesis presentada por la Bachiller:

Alarcon Alvaro, Almendra Fernanda

ORCID: 0009-0005-2756-7132

para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Asesor:

Mg. Candia Puma, Mayron Antonio

ORCID: 0000-0002-6328-3840

Arequipa - Perú

2025

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FARMACIA Y BIOQUIMICA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 07 de Julio del 2025

Dictamen: 011187-C-EPFyB-2025

Visto el borrador del expediente 011187, presentado por:

2018174282 - ALARCON ALVARO ALMENDRA FERNANDA

Titulado:

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ROSMARINUS
OFFICINALIS L. (ROMERO) FRENTE A CÁNDIDA ALBICANS IN VITRO COMPARADO CON
FLUCONAZOL**

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Título Profesional/Título de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

**29285302 - GUTIERREZ ARANIBAR ROXANA JACQUELINE CANDELARIA
DICTAMINADOR**



**29440909 - MOLINA RODRIGUEZ FREDY NICOLAS
DICTAMINADOR**



**29630612 - TERAN DIANDERAS ADILMI MILAGRO
DICTAMINADOR**



Determinación de la actividad antifúngica del aceite esencial de Rosmarinus officinalis L. (Romero) frente a Candida albicans in vitro comparado con fluconazol

INFORME DE ORIGINALIDAD

20%

INDICE DE SIMILITUD

18%

FUENTES DE INTERNET

5%

PUBLICACIONES

8%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	Submitted to Universidad Católica de Santa María	3%
	Trabajo del estudiante	
2	www.medizzine.com	1%
	Fuente de Internet	
3	hdl.handle.net	1%
	Fuente de Internet	
4	Submitted to Universidad Andina Nestor Caceres Velasquez	1%
	Trabajo del estudiante	
5	repositorio.usanpedro.edu.pe	1%
	Fuente de Internet	
6	docs.bvsalud.org	1%
	Fuente de Internet	
7	1library.co	1%
	Fuente de Internet	

repositorio.uma.edu.pe

DEDICATORIA

A mis padres, Arturo y Delcy, quienes son mi pilar de apoyo y motivación constante, les expreso mi más sincero agradecimiento por creer siempre en mi potencial y por brindarme su amor incondicional.

A mi hermana Angie, por su amor y complicidad en los buenos y malos momentos. A mis abuelos por el apoyo y todos los consejos.

A las personas más cercanas a mi corazón, por las palabras de aliento que me motivaron a finalizar este proceso importante en mi etapa profesional.

A mis profesores y mentores por su orientación y enseñanzas que fueron cruciales para mi crecimiento académico.

Finalmente, con profunda gratitud dedico este esfuerzo a todos los soñadores que ponen su corazón en la tarea de educar.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por brindarme la fuerza necesaria para superar los desafíos.

A mi familia, por creer en mí, su sacrificio y dedicación fueron mi mayor inspiración para alcanzar todas mis metas, gracias por estar presentes, celebrar mis logros y levantarme en mis tropiezos.

Agradezco a mis profesores y mentores, Mg. Mayron Candia Puma y Dra. María Antonieta Loaiza, por guiarme durante todo el proceso compartiendo su sabiduría y orientación invaluable.

A todas las personas que creyeron en mí, gracias.

RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo general determinar la actividad antifúngica del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) frente a *Candida albicans* in vitro, comparándola con el efecto del fluconazol. Para ello, se evaluaron concentraciones del aceite esencial al 40%, 60%, 80% y 100%, utilizando como control positivo el fluconazol y como control negativo el dimetilsulfóxido (DMSO). El aceite esencial fue obtenido mediante destilación por arrastre de vapor de agua a partir de muestras frescas de romero recolectadas en Arequipa, y se prepararon las diluciones correspondientes con DMSO. La actividad antifúngica se evaluó mediante el método de difusión en pozos sobre agar Sabouraud inoculado con cepas ATCC 10231 de *Candida albicans*, incubadas a 37 °C durante 48 horas. Se midieron los diámetros de los halos de inhibición para cada concentración y controles, y se realizó análisis estadístico mediante ANOVA y prueba post hoc de Dunnett. Los resultados mostraron que el aceite esencial de romero presenta actividad antifúngica significativa en todas las concentraciones evaluadas, con un efecto dependiente de la concentración. Los diámetros promedio de los halos de inhibición aumentaron desde 9.08 mm (40%) hasta 15.5 mm (100%), superando en todos los casos al control negativo (5 mm), que no presentó actividad inhibitoria. Por su parte, el fluconazol mostró la mayor eficacia, con un halo promedio de 25.26 mm. El análisis estadístico confirmó diferencias altamente significativas entre los grupos ($p < 0.0001$). La prueba de Dunnett evidenció que todas las concentraciones del aceite esencial superaron significativamente al control negativo, pero no alcanzaron la eficacia del fluconazol, aunque la brecha se redujo a medida que aumentó la concentración del aceite. En conclusión, el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. es un agente antifúngico efectivo frente a *Candida albicans* in vitro, con actividad que depende de la concentración, pero que no supera la eficacia del fluconazol en las condiciones evaluadas. Estos hallazgos respaldan el potencial del aceite esencial como alternativa complementaria en el manejo de infecciones por *Candida albicans*, especialmente en contextos donde se prefiera o requiera el uso de terapias naturales.

Palabras claves: Actividad antifúngica, aceite esencial, efectividad.

ABSTRACT

The general objective of this study was to determine the antifungal activity of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) essential oil against *Candida albicans* in vitro, comparing it to fluconazole. Essential oil concentrations of 40%, 60%, 80%, and 100% were tested, with fluconazole as the positive control and dimethyl sulfoxide (DMSO) as the negative control. The oil was extracted via steam distillation from fresh rosemary samples collected in Arequipa, Peru, and diluted with DMSO. Antifungal activity evaluation used the agar well diffusion method on Sabouraud agar inoculated with *Candida albicans* ATCC 10231 strains, incubated at 37°C for 48 hours. Inhibition zone diameters were measured for each concentration and controls, followed by statistical analysis (ANOVA and Dunnett's post hoc test). Results revealed significant antifungal activity across all tested concentrations, with a concentration-dependent effect. Average inhibition zones increased from 9.08 mm (40%) to 15.5 mm (100%), surpassing the negative control (5 mm), which showed no inhibitory activity. Fluconazole demonstrated the highest efficacy (25.26 mm inhibition zone). Statistical analysis confirmed highly significant differences between groups ($p < 0.0001$). The Dunnett test showed all essential oil concentrations significantly outperformed the negative control but did not match fluconazole's efficacy, though the gap narrowed at higher oil concentrations. Conclusion: *Rosmarinus officinalis* L. essential oil is an effective antifungal agent against *Candida albicans* in vitro, though less potent than fluconazole under the tested conditions. These findings support its potential as a complementary alternative for managing *Candida albicans* infections, particularly in contexts favoring natural therapies.

Key words: Antifungal activity, essential oil, effectiveness.

ÍNDICE

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	5
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN	1
1. HIPÓTESIS	2
2. OBJETIVOS	2
2.1 OBJETIVO GENERAL	2
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	2
3. TABLA DE VARIABLES E INDICADORES	2
CAPÍTULO I	3
MARCO TEÓRICO	3
1. CANDIDIASIS Y <i>Candida albicans</i>	4
2. TRATAMIENTOS ANTIFUNGICOS CONVENCIONALES	5
2.1. Amfotericina B	5
2.2. Azoles	6
2.3. ANTIFÚNGICOS NATURALES	6
2.4. MECANISMOS DE ACCIÓN ANTIFÚNGICA	6
2.4.1. ACEITE ESENCIAL DE <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (ROMERO)	6
2.4.2. MECANISMO DEL FLUCONAZOL	7
2.4.3. COMPARACIÓN CRÍTICA DE MECANISMOS	7
3. <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (ROMERO)	8
3.1. HISTORIA	8
3.2. DESCRIPCIÓN	8
3.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA	10
4. ACEITE ESENCIAL COMO ALTERNATIVA TERAPEUTICA	10
5. ACTIVIDAD ANTIFUGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ROMERO	11
6. EQUIPO HIDROEXTRACTOR	11
7. FLORENTINO	13
8. MÉTODO KIRBY – BAUER	13

8.1. RELACIÓN CON DMSO	15
CAPÍTULO II.....	16
MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
1. LUGAR DE EJECUCIÓN	17
2. MATERIALES.....	17
2.1. MATERIAL BIOLÓGICO	17
2.2. INSUMOS.....	17
2.3. REACTIVOS QUÍMICOS	17
2.4. MATERIALES DE LABORATORIO	17
2.5. APARATOS Y EQUIPOS	18
2.6. OTROS	18
2.6.1. SOFTWARE	18
3. MÉTODOS	18
3.1. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA PLANTA ROMERO (<i>Rosmarinus officinalis L.</i>)	18
3.2. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ROMERO (<i>Rosmarinus officinalis L.</i>).....	19
3.3. PREPARACIÓN DE DILUCIONES DEL AEs DE <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (Romero)	20
3.4. PREPARACION DEL CONTROL POSITIVO DEL ANTIFÚNGICO: Fluconazol.....	20
3.5. CÁLCULOS.....	21
3.6. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS, MÉTODOS Y TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS	22
3.6.1. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	22
3.6.2. PREPARACIÓN DE POZOS	23
3.6.3. CEPAS ATCC 10231 DE <i>Candida albicans</i>	23
3.6.4. PREPARACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE LA SUSPENSION DEL INÓCULO DE CEPA ATCC 10231 DE <i>Candida albicans</i>	23
3.6.5. REALIZACIÓN DE POZOS	23
3.6.6. INOCULACIÓN DE PLACAS	24
3.6.7. TRANSFERENCIA DE EXTRACTOS Y CONTROLES	24
3.6.8. INCUBACIÓN DE LAS PLACAS	25
3.6.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25

4. DIAGRAMA DE FLUJO DE ACTIVIDADES	25
CAPÍTULO III	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	27
1. MEDICION DE HALOS DE INHIBICION	27
2. INFORME DE LECTURA DE HALOS DE INHIBICION DEL AEs de ROMERO – FLUCONAZOL	28
3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
CONCLUSIONES.....	34
RECOMENDACIONES.....	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS	41



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuadro de variables e indicadores.....	2
Tabla 2. Cuadro de clasificación taxonómica de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L.....	4
Tabla 3. Cuadro de comparación crítica de mecanismos	7
Tabla 4. Cuadro de características morfológicas de <i>Rosmarinus Officinalis</i> (21).....	9
Tabla 5. Resultados de valores en milímetros. Elaboración propia	28
Tabla 6. Resumen estadístico del análisis de varianza (ANOVA): componentes de varianza entre y dentro de grupos.....	30
Tabla 7. Prueba de Dunnett (Comparaciones múltiples entre tratamientos: diferencias de medias, intervalos de confianza y valores de significancia ajustados).....	30
Tabla 8. Comparación de la eficacia de fluconazol frente a diferentes concentraciones de AEs y DMSO: análisis de diferencias de promedios, intervalos de confianza y valores p ajustados.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Microscopia de luz de <i>Candida albicans</i>	5
Figura 2. Vista frontal de la planta <i>Rosmarinus Officinalis L.</i>	9
Figura 3. Ejemplo de procedimiento de la prueba de sensibilidad antimicrobiana.....	14
Figura 4. Diagrama de flujo de la recolección y preparación de la muestra (<i>Rosmarinus officinalis L.</i>) <i>Elaboración propia</i>	19
Figura 5. Diagrama de flujo de la preparación para extraer el AEs de <i>Rosmarinus officinalis L.</i> <i>Elaboración propia</i>	20
Figura 6. Diagrama de flujo de preparación del medio de cultivo. <i>Elaboración propia</i>	23
Figura 7. Placa Petri rotulada con los 6 pozos. <i>Elaboración propia</i>	24
Figura 8. Diagrama de flujo ilustrado de inoculación de placas. <i>Elaboración propia</i>	24
Figura 9. Cronograma de actividades 2024. <i>Elaboración propia</i>	25
Figura 10. Placas Petri (25 unidades).....	27
Figura 11. Medición de halos en placas Petri.....	27
Figura 12. Prueba de Dunnett (Comparación gráfica de las diferencias entre medios de grupos experimentales del DMSO y AEs)	31
Figura 13. Representación gráfica de las diferencias de promedios entre fluconazol y AEs en diferentes concentraciones y DMSO.....	32
Figura 14. Muestra fresca de <i>Rosmarinus Officinalis</i>	41
Figura 15. Muestra seca de <i>Rosmarinus Officinalis L.</i>	41
Figura 16. Retiro manual de hojas del tallo de <i>Rosmarinus Officinalis L.</i>	42
Figura 17. Equipo de destilación por arrastre de vapor.....	42
Figura 18. Llenado del equipo de destilación por arrastre de vapor con la muestra <i>Rosmarinus Officinalis L.</i>	43

Figura 19. Instalación del equipo de destilación por arrastre de vapor.....	43
Figura 20. Equipo de laboratorio ‘Florentino’	44
Figura 21. AEs destilado. (a) AEs concentrado en el equipo Florentino. (b) Hidrolato del AEs de <i>Rosmarinus Officinalis L.</i>	44
Figura 22. Frasco ámbar con contenido de AEs puro	45
Figura 23. Residuo vegetal de <i>Rosmarinus Officinalis</i> destilado	45
Figura 24. Separación de fases: Hidrolato y AEs de <i>Rosmarinus Officinalis L.</i> en pera de decantación.....	46
Figura 25. (a) Fluconazol en NaCl 100mg/50ml. (b) DMSO	46
Figura 26. Preparación de diluciones. (a) Fluconazol al 25%, 50% y 75%. (b) Extracción del AEs de <i>Rosmarinus Officinalis L.</i> al 40%, 60%, 80% y 100%.....	47
Figura 27. <i>Candida albicans</i> . (a) Cepas ATCC 10231 de <i>Candida albicans</i> . (b) Hisopo de inoculación	47
Figura 28. Envases (a) Agar Dextrosa Saboraud 500 mg (b) Formulación	48
Figura 29. Preparación del medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud. (a) Pesado (b) Mezcla con agua destilada	48
Figura 30. Esterilización del medio de cultivo en autoclave. (a) Equipo de autoclave. (b) Matraz con preparación. (c) Preparación esterilizada. (d) Llenado de placas Petri con medio de cultivo.	49
Figura 31. Placa Petri (a) Rotulación y realización de pozos. (b) Inoculación de placas Petri.	49
Figura 32. Incubación de las placas en estufa	50
Figura 33. Constancia de autorización de acceso y uso de laboratorio N°5 de Microbiología en la Universidad Néstor Cáceres Velásquez en la ciudad de Juliaca.	51

INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales nació con el hombre, pasando la práctica de generación en generación, por lo que, en las últimas décadas fueron tomando más importancia para uso de investigaciones y estudios. Y a medida que aumenta la población en una región o localidad, es más difícil el acceso a servicios de salud pública, por lo tanto, es necesario buscar alternativas de atención primaria para suplir dicho déficit, incluso para que aquellas personas que solo siguen y confían en terapias con productos naturales accesibles.

Existen pocos estudios sobre infecciones fúngicas en el Perú y medicamentos como el Flucanazol, que es uno de los pocos antimicóticos utilizados para tratar la candidemia, con frecuencia no producen el efecto deseado. Esto se debe a que las especies de *Candida* usualmente son resistentes sobre las infecciones por hongo, por lo que, es recomendada modificar o ajustar la terapia. (1)

La candidiasis es una de las enfermedades oportunistas más comunes que afecta a los humanos, independientemente de la edad del paciente, por lo que, los principales reservorios de *C. albicans* son las vías digestivas, respiratoria juntamente con las mucosas oral y vaginal. (2)

El potencial de las plantas en la medicina motivó diferentes tipos de búsquedas, como el estudio e investigación sobre los efectos antifúngicos del romero (*Rosmarinus Officinalis L.*), que es perteneciente a la familia *Lamiaceae*. Esta especie de planta es reconocida a nivel internacional por su uso en la medicina natural gracias a propiedades digestivas y antiespasmódicas, además como en la búsqueda de reemplazo a fármacos alternativos para infecciones. (3)

En búsqueda de alternativas innovadoras para el control de hongos, ha provocado un aumento del interés para estudio y desarrollo de soluciones más sostenibles y naturales como el uso de aceites esenciales (AEs) o incluso extractos vegetales (EV) (4). Estos son compuestos botánicos originados de las plantas que incluyen una variedad de sustancias bioactivas. (5)

En concreto, los Aes, son compuestos lipofílicos que tienen la capacidad de penetrar las membranas celulares y entrar al interior de las células, donde pueden funcionar de distintas maneras para inhibir el crecimiento de patógenos. (6)

1. HIPÓTESIS

Considerando que los componentes químicos específicos del aceite esencial de Romero, como el cineol, el α -pineno y el β -pineno, tienen propiedades antifúngicas; es posible que estos contribuyan a la efectividad del aceite esencial en la inhibición del crecimiento de *Candida albicans* in vitro, y que sea alternativa como tratamiento innovador para aquella población que busca terapias dentro de la medicina tradicional peruana.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad antifúngica del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) frente a *Candida Albicans* in vitro comparado con Fluconazol.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la actividad antifúngica del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) al 40%, 60%, 80% y 100% sobre *Candida Albicans* in vitro.
2. Determinar la actividad antifúngica del Fluconazol (Medicamento control positivo), sobre *Candida Albicans* in vitro.
3. Comparar la actividad antifúngica entre el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) con Fluconazol sobre *Candida Albicans* in vitro.

3. TABLA DE VARIABLES E INDICADORES

Tabla 1. Cuadro de variables e indicadores

Variable	Indicadores	Valor Final	Tipo de variable
Independiente: Aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Romero)	Concentración del aceite esencial	40%, 60%, 80% y 100%	Cualitativa
Dependiente: Efecto antifúngico sobre <i>Candida Albicans</i>	Halos de inhibición	Milímetros (mm)	Cuantitativa
Control: Fluconazol	Halos de inhibición	Milímetros (mm)	Cuantitativa



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. CANDIDIASIS Y *Candida albicans*

La *Candida albicans*, es un tipo de levadura que se encuentra de forma habitual como un microorganismo comensal en el cuerpo humano. Los síntomas clínicos se manifiestan de manera localizada o incluso sistémica, atentando en cualquier área del organismo incluyendo la piel, mucosas y órganos internos. (7) En el siglo XX d.C. se determinó la biología de estas levaduras como también la clasificación taxonómica. (Tabla 1)

La candidiasis superficial suele manifestarse principalmente en la piel humana y las mucosas orales como vaginales, sin embargo, cuando se propaga a nivel sanguíneo, cualquier órgano puede ser afectado. (8)

Tabla 2. Cuadro de clasificación taxonómica de *Rosmarinus Officinalis* L.

Clasificación taxonómica	
Reino	<i>Fungi.</i>
Filo	<i>Ascomycota.</i>
Subfilo	<i>Saccharomycotina.</i>
Clase	<i>Saccharomycetes.</i>
Orden	<i>Saccharomycetales.</i>
Familia	<i>Saccharomycetaceae.</i>
Género	<i>Candida.</i>
Especie	<i>C. albicans.</i>
Nombre binomial	<i>Candida albicans.</i>

Nota. *Compilación de datos aportados por Dadar et al., (2018)*

Las especies pertenecientes al género *Candida* se manifiestan en células levaduriformes ovaladas, con una pared delgada, con diámetro de 3 a 5 μm (Figura 1). Este género es un microorganismo poco exigente, creciente en medios de cultivo convencionales como Sabouraud o extracto de malta, como también en medios para bacterias como el agar chocolate y agar sangre. (8)

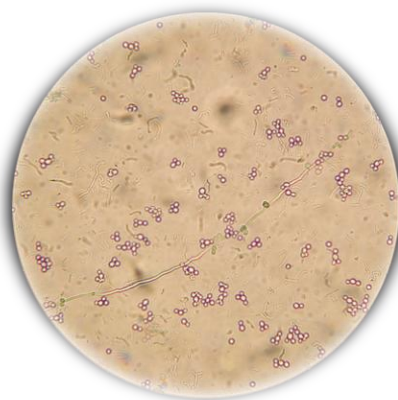


Figura 1. Microscopia de luz de *Candida albicans*

Nota. Polke et al., 2015

La temperatura de crecimiento idónea para estas levaduras es aproximadamente de 37°C, aunque pueden crecer incluso a 25°C. La supervivencia es más alta en áreas húmedas y cálidas del organismo, y no muestra preferencia por factores climáticos, condiciones socioeconómicas o ubicación geográfica. (9)

Los factores de riesgo clave que pueden contribuir al desarrollo de infecciones incluyen el uso prolongado de antibióticos, los cuales podrían alterar la microbiota protectora natural del cuerpo, así como el uso de corticosteroides y dispositivos médicos invasivos como los catéteres. Además, ciertas condiciones de salud como la diabetes mellitus, caracterizada por niveles elevados de glucosa en sangre, pueden favorecer el crecimiento de microorganismos patógenos. Y a pesar de que *Candida albicans* es responsable de aproximadamente el 70-80% de los casos de candidiasis, especies emergentes como *Candida glabrata* y *Candida auris* muestran una resistencia significativamente mayor a los antifúngicos azólicos, lo que complica considerablemente el tratamiento terapéutico. (10)

2. TRATAMIENTOS ANTIFUNGICOS CONVENCIONALES

2.1. Amfotericina B

Utilizado principalmente en infecciones fúngicas invasivas graves, sin embargo, pueden causar nefrotoxicidad. Existen en forma de deoxicolato y formulaciones lipídicas. (10)

2.2. Azoles

Utilizado en tratamiento de infecciones por *Candida* y otras micosis sistémicas, como el fluconazol que tiene ventaja al ser menos tóxico que la anfotericina B, también disponibles en forma oral. (10)

2.3. ANTIFÚNGICOS NATURALES

Las plantas son una fuente invaluable de nuevas moléculas biológicamente activas.

Elas producen diversos metabolitos secundarios, muchos de los cuales presentan actividad antifúngica. Entre los compuestos más conocidos se encuentran: flavonoides, fenoles, glicósidos de fenoles, saponinas, etc. (11) Convirtiéndose en alternativa para el desarrollo y la formulación de nuevos fármacos antifúngicos con menores efectos secundarios, mayor espectro de acción y menor costo que los disponibles en el mercado farmacéutico para el tratamiento de las infecciones por hongos. (12)

2.4. MECANISMOS DE ACCIÓN ANTIFÚNGICA

2.4.1. ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. (ROMERO)

En el fenómeno de las alteraciones de la permeabilidad de la membrana, los componentes lipofílicos del aceite (α -pineno y 1,8-cineol) interactúan con los lípidos de la membrana celular de *C. albicans*, lo cual incrementa dicha permeabilidad, originando una liberación de iones y metabolitos intracelulares, el desequilibrio osmótico e incluso la muerte celular. (13)

En síntesis, la actividad antifúngica del AEs de *Rosmarinus officinalis* L. se fundamenta en:

- Interacción lipofílica altamente especializada con los lípidos constituyentes de la membrana celular, lo cual conlleva a un incremento en su permeabilidad y por ende en la capacidad de intercambio de moléculas a través de esta.
- La liberación de iones y metabolitos intracelulares conlleva un desequilibrio osmótico en el medio extracelular. Este proceso puede tener un impacto significativo en la homeostasis celular y en la funcionalidad de diferentes sistemas biológicos.
- Modificación significativa en la estructura y la morfología de las células fúngicas.

- Inhibición efectiva de la adhesión bacteriana y la consiguiente formación de biopelículas en superficies diversas.
- Desintegración de la estructura de la pared celular y liberación del valioso contenido citoplasmático.
- Inhibición de la síntesis de ergosterol en las células fúngicas y reducción de la producción de micotoxinas en el medio ambiente.

Estos efectos son principalmente atribuibles a los terpenos predominantes en el aceite esencial, en particular α -pineno y 1,8-cineol. Sin embargo, la sinergia con otros compuestos minoritarios también contribuye a su capacidad antimicrobiana. (14) (15)

2.4.2. MECANISMO DEL FLUCONAZOL

El medicamento fluconazol actúa mediante la inhibición de una actividad de la enzima lanosterol 14- α -desmetilasa, también conocida como Erg11, lo que resulta en la interrupción del proceso de transformación de lanosterol en ergosterol. Este mecanismo de acción es fundamental para combatir las infecciones fúngicas al interferir con la síntesis de componentes esenciales para la membrana celular de los hongos, provocando una alteración en la fluidez de dicha membrana, como también en la funcionalidad de proteínas que están asociadas. (14) (15)

2.4.3. COMPARACIÓN CRÍTICA DE MECANISMOS

Esta comparación sistémica contiene y resalta estrategias complementarias: mientras el fluconazol actúa sobre rutas enzimáticas, el aceite afecta integridad estructural y virulencia, ofreciendo bases para diseñar terapias combinadas. (13) (16)

Tabla 3. Cuadro de comparación crítica de mecanismos

Parámetro	AEs de romero	Fluconazol
Blanco molecular	Membrana celular (acción física)	Erg11 (acción enzimática específica)
Efecto primario	Fungicida por lisis celular	Fungistático por estrés metabólico

Concentración efectiva	Alta	Baja
Resistencia	Múltiples dianas reducen riesgo	Frecuente por mutaciones en ERG11

3. *Rosmarinus officinalis* L. (ROMERO)

3.1. HISTORIA

Rosmarinus officinalis L., comúnmente conocido como romero, destaca por su riqueza en principios activos, los cuales ejercen una influencia significativa sobre diversos órganos del cuerpo humano. Esta especie se encuentra habitualmente en estado silvestre en áreas rocosas, aunque su notable adaptabilidad y bajo requerimiento de cuidados permiten su fácil reproducción en otras regiones geográficas. Esta versatilidad en el cultivo amplía su disponibilidad y potencial uso en diversas aplicaciones terapéuticas. (13)

Antiguamente, el romero se esparcía en las habitaciones de personas enfermas como un desinfectante aromático, e incluso se empleaba para adornar relicarios de los espíritus protectores del hogar.

Con respecto al simbolismo, desde tiempos remotos, el romero fue considerado una planta con un profundo significado simbólico y cultural en diversas civilizaciones a lo largo de la historia. Por ejemplo, en la antigua Grecia, se creía firmemente en las propiedades místicas, los jóvenes estudiantes solían adornar sus cabezas con coronas de romero con la esperanza de potenciar su capacidad mnemotécnica antes de enfrentarse a pruebas académicas. (18) Por lo que, los romanos siguieron investigando sobre su uso medicinal y utilizándolo para rituales ofrendándolo a sus dioses en sahumerios para purificar hogares.

3.2. DESCRIPCIÓN

Rosmarinus officinalis L., o romero, es un arbusto leñoso que crece con un aspecto espigado, alcanzando hasta 2 metros de altura. Sus tallos son leñosos, cuadrangulares en sección transversal, y presentan ramificaciones. Y con el tiempo, los tallos más antiguos desarrollan un color rojizo distintivo. (14) La vida media del romero oscila entre 5 y 15 años (20)

Tabla 4. Cuadro de características morfológicas de *Rosmarinus Officinalis* (21)

Característica	Descripción
Altura	Hasta 2 metros
Tipo de hoja	Lineares, opuestas, coriáceas, margen revuelto, haz verde oscuro, envés blanco
Tallo	Leñoso, cuadrangular, jóvenes con borra, viejos rojizos y resquebrajados
Flor	Corola bilabiada, azul, violeta, rosa o blanca, cáliz bilabiado, aromática
Fruto	Cuatro núculas ovoides, castaño claro
Ecología	Suelos secos, soleados, bien drenados; resistente a sequía



Figura 2. Vista frontal de la planta *Rosmarinus Officinalis* L.

- REINO: *Plantae*
- SUBREINO: *tracheobionta*
- DIVISIÓN: *Magnoliophyta*
- CLASE: *Magnoliopsida*
- ORDEN: *Lamiales*
- FAMILIA: *Lamiaceae*
- SUBFAMILIA: *Nepetoideae*
- GÉNERO: *Rosmarinus*

– ESPECIE: *Officinalis*

3.3. COMPOSICIÓN QUÍMICA

Las hojas y los frutos contienen un aceite esencial, representando 1.9% del peso de la planta desecada. Se han identificado en este aceite al menos veinte sustancias, que representan el 99.93% del volumen total. Los principales componentes del aceite son p-cimeno (44.02%), linalool (20.5%), gamma-terpineno (16.62%), timol (1.81%), beta-pineno (3.61%), alfa-pineno (2.83%) y eucaliptol (2.64%). (15)

El aceite esencial contiene ácidos fenólicos (cafeico, clorogénico, rosmarínico, carnósico), de los que dependen en último término las propiedades antioxidantes, diversas flavonas (derivados luteolínicos y del epigenol) y derivados diterpénicos (carnosol, rosmanol, rosmadial, rosmaquinonas A y B, secohinokiol) ácidos triterpénicos (ácido ursólico) y alcoholes triterpénicos (alfa y beta-amirina, betulósido). (16)

La composición química del romero es sumamente rica y diversa, sobresaliendo por la presencia de un Aes compuesto por una variedad de monoterpenos y sesquiterpenos, así como ácidos fenólicos con una potente actividad antioxidante. Además, contiene flavonoides con propiedades antiinflamatorias, diterpenos que poseen diversos efectos farmacológicos y triterpenos con propiedades citotóxicas y hepatoprotectoras. Esta sofisticada combinación de metabolitos secundarios es la fundación científica que respalda tanto sus aplicaciones tradicionales como las contemporáneas en los campos de la medicina, alimentación e incluso cosmética. (24) (25)

4. ACEITE ESENCIAL COMO ALTERNATIVA TERAPEUTICA

Uno de los progresos más significativos en el campo de la farmacia fue la identificación de antimicrobianos destinados para infecciones originadas por bacterias, hongos y protozoos, sin embargo, con el transcurso del tiempo, estos microorganismos, se adaptaron metabólicamente. Y este tipo de resistencia experimento un incremento preocupante restringiendo alternativas terapéuticas existentes. (17)

Los AEs constituyen son compuestos químicos naturales producidos por las plantas a través de procesos como la biosíntesis, y son responsables de proporcionar el aroma distintivo que caracteriza a los árboles, flores, frutos, especias y en especia hierbas en este caso. (18) (19)

El uso de los AEs no solo representa una oportunidad para el desarrollo de innovadores tratamientos médicos, destacando la crucial importancia para investigar y crear más terapias fundamentadas en los recursos naturales con el propósito de potenciar la salud y bienestar integral de la población.

5. ACTIVIDAD ANTIFUGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE ROMERO

En ensayos in vivo e in vitro la actividad antifúngica del AE de romero según Takaki et al., 2008, indica que el romero tiene un alto contenido de principios activos químicos y bioquímicos, con fines terapéuticos, aromáticos e incluso gastronómicos.

(20) La actividad antifúngica del AE es atribuida a sus componentes, tales como el 1,8-cineol, α -pineno y α -terpineol, estos compuestos son reconocidos por su capacidad para combatir hongos y microorganismos no deseados. (21)

El AEs de romero presenta una actividad antifúngica muy significativa, pero puede verse disminuida en comparación con la de ciertos antifúngicos tradicionales como la nistatina o el fluconazol, los que son consideradas opciones terapéuticas más potentes y efectivas en el control de la infección, sin embargo, tiene potencial como una alternativa natural y merece ser explorado con mayor profundidad. (22)

Su mecanismo de acción es a través de una actividad antioxidante por la captura de radicales libres, inhibición de citoquinas inflamatorias (TNF- α , IL-1 e IL-6) y propiedades antimicrobianas tanto en bacterias grampositivas como gramnegativas. (23)
(24)

6. EQUIPO HIDROEXTRACTOR

El equipo experimental, consta de: generador de vapor, columna de extracción, condensador y separador florentino. El condensador funciona en modo continuo, con flujo del refrigerante a contracorriente. La presión del vapor generado es superior a la atmosférica, pero el vapor efluente que extrae al aceite esencial está a la presión atmosférica. El calentamiento de la matriz vegetal es considerado uniforme, la degradación del aceite esencial será eliminada porque el material no tiene ningún contacto ni es recalentado en la columna, se desprecia el reflujo interno del vapor condensado. El separador florentino, probeta graduada de 250 ml, no es parte de la unidad de proceso, pero es un medio muy importante para medir el volumen del producto a obtener y separar el aceite esencial del agua floral producida.

El procedimiento de este equipo consiste en:

- **Arranque del sistema extractor:** La matriz vegetal, previamente tratada, es pesada y cargada a la columna, donde forma un lecho fijo compacto. El generador de vapor es alimentado con agua desionizada, el volumen de acuerdo a su capacidad. A continuación; encender el sistema de calentamiento, supervisando que la temperatura y presión de vapor generado se encuentren dentro del rango de operación predeterminado.
- **Procedimiento de extracción:** Una vez alcanzado un valor de presión suficiente para vencer la resistencia hidráulica del lecho, el vapor de agua es inyectado hacia el lecho compacto mediante un distribuidor interno, a través de una válvula accionada manualmente. Conforme el vapor entra en contacto con el lecho, la matriz vegetal se calienta y va liberando el aceite esencial contenido, y éste a su vez, debido a su alta volatilidad se va evaporando. Al ser soluble en el vapor circundante, es “arrastrado”, corriente arriba hacia el tope de la columna de extracción. La mezcla, vapor saturado y aceite esencial, fluye hacia un condensador donde la mezcla es condensada y enfriada, hasta la temperatura ambiental. A la salida del condensador, se obtiene una emulsión líquida inestable, que es almacenada y separada en un decantador o florentino. El proceso termina cuando el volumen de aceite esencial acumulado en el decantador no varía con el tiempo.
- **Etapa final:** Una vez finalizada la etapa de agotamiento, la columna debe ser descargada y proceder a pesar el contenido de la matriz vegetal agotada para determinar la cantidad de agua adsorbida. A continuación; el aceite esencial debe ser retirado del florentino y almacenado en un recipiente de vidrio de color ámbar para ser almacenado en lugar apropiado. El vapor condensado acompañante del aceite esencial y que también se obtiene en el florentino, es llamado “agua floral”, y posee una pequeña concentración de los compuestos solubles del aceite esencial, lo cual le otorga un ligero aroma, semejante al aceite obtenido. Finalmente; el hidroextractor debe ser limpiado y cargado nuevamente con matriz vegetal, para iniciar una nueva operación.

7. FLORENTINO

El florentino constituye un componente esencial en el proceso de destilación por arrastre de vapor para la extracción de aceites esenciales, siendo ampliamente empleado en Perú. Este dispositivo fue creado por un ingeniero peruano y ha sido adoptado en la industria nacional por su eficiencia y simplicidad en la separación de fases. Este equipo de laboratorio desempeña un papel de un separador de fases (también conocido como decantador dinámico), facilitando una separación eficaz del aceite esencial y el hidrolato (agua floral) que se derivan de la condensación de los vapores resultantes de la destilación de material vegetal. (37) (38)

Proceso:

- La combinación de vapor de agua y aceite esencial es redirigida hacia el condensador, donde se enfría gradualmente y se condensa, dando lugar a la formación de una emulsión líquida altamente inestable.
- Debido a la marcada disparidad en la densidad y la completa incompatibilidad entre el aceite esencial y el agua, el aceite esencial tiende a acumularse en una capa separada (por lo general, flotando en la superficie del agua, aunque esta disposición puede variar en función de la densidad relativa del aceite).
- El florentino está diseñado con un ramal lateral que permite desplazar el agua y favorecer la acumulación del aceite esencial, facilitando su recolección sin mezclarlo con el hidrolato.
- El hidrolato, que contiene pequeñas cantidades de compuestos solubles del aceite esencial, se recoge como subproducto y puede reciclarse o almacenarse.

8. MÉTODO KIRBY – BAUER

El procedimiento de difusión en disco más ampliamente utilizado, o también denominado prueba de sensibilidad a los antimicrobianos mediante el método de Kirby – Bauer, es especialmente apropiado para una evaluación de la susceptibilidad de microorganismos de rápida proliferación. Se fundamenta en la disposición de discos saturados con diferentes tipos de antibióticos o antifúngicos en medios de cultivo de agar previamente inoculados con la cepa bacteriana en estudio. Seguidamente después de un periodo de incubación entre 16 a 18 horas, se procede a medir el diámetro de la zona de inhibición que rodea a cada disco. (29) Sin embargo, hay distintas variables que afectan el resultado sobre el tamaño de la zona de inhibición que puede verse influenciado por múltiples factores como: (35)

- Concentración específica del antibiótico en el disco de agar.
- Sensibilidad intrínseca del microorganismo ante determinados agentes antimicrobianos.
- Coeficiente de difusión del antibiótico en el agar que es un parámetro fundamental para comprender la eficacia de la difusión de sustancias.
- Tiempo y temperatura de incubación
- pH y composición del medio de cultivo
- Espesor del agar
- Densidad del inóculo bacteriano

Este método no es apropiado para bacterias de crecimiento lento, como las anaerobias, o para microorganismos exigentes que requieran condiciones especiales sin realizar previamente las modificaciones necesarias. También, se utiliza en numerosos laboratorios clínicos para guiar la selección adecuada de antibióticos en casos de infecciones bacterianas, lo cual ayuda a promover un uso más responsable y disminuir la aparición de resistencia bacteriana. (36)

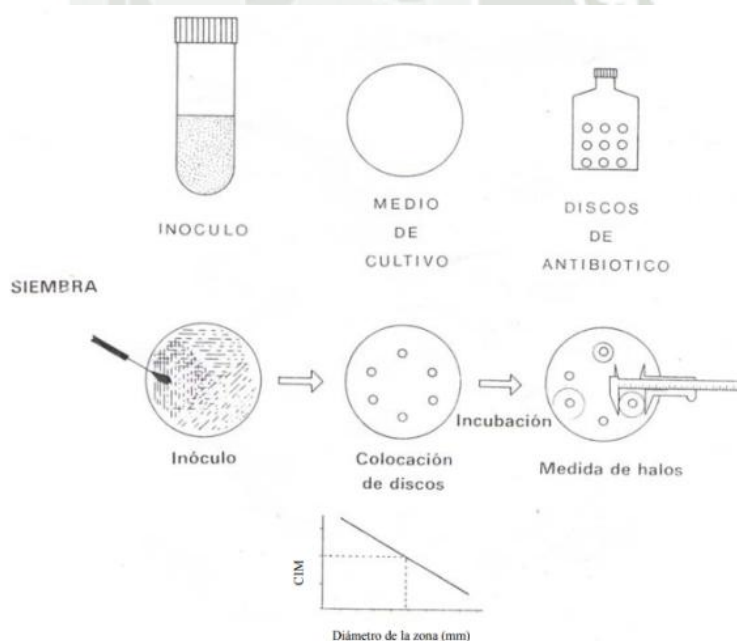


Figura 3. Ejemplo de procedimiento de la prueba de sensibilidad antimicrobiana

8.1. RELACIÓN CON DMSO

El DMSO (dimetilsulfóxido) es empleado en el procedimiento de difusión en agar de Kirby – Bauer gracias a su eficacia para disolver tanto sustancias como la polaridad, lo que simplifica una elaboración en los discos impregnados con extractos o compuestos hidrofóbicos. (30) (31)

En estudios de sensibilidad antimicrobiana el DMSO es utilizado como control negativo debido a que carece de cualquier tipo de actividad antimicrobiana intrínseca. Permitiendo evaluar de manera precisa la efectividad de los agentes antimicrobianos en estudio. Por lo que, esto brinda la oportunidad de evaluar si los resultados observados pueden ser atribuidos al compuesto que está sometido a prueba. (32) (33)

En determinadas situaciones, puede resultar complementario el procedimiento con metodologías cuantitativas adicionales, tales como una técnica de dilución en caldo, con el propósito de obtener información más detallada acerca de la concentración mínima inhibitoria (MIC).



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. LUGAR DE EJECUCIÓN

La presente tesis se realizó en la Universidad Andina Néstor Cáceres Velásquez, en los laboratorios del Campus de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, código postal 21104, ubicado en el distrito de Juliaca, Departamento de Puno – Perú.

2. MATERIALES

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

- Cepas ATCC 10231 de *Candida albicans*, marca KWIK-STIKTM.
- Ampolla de líquido hidratante
- Isopo de inoculación

2.2. INSUMOS

- Guantes
- Jeringas
- Papel
- Cinta masking
- Regla
- Mascarilla quirúrgica
- Gorro quirúrgico
- Tijera
- Papel periódico
- Envases (Recolección de Romero seco)

2.3. REACTIVOS QUÍMICOS

- Agar Dextrosa Sabouraud
- Fluconazol
- Cloruro de sodio
- Aceite esencial de Romero

2.4. MATERIALES DE LABORATORIO

- Pocillos de porcelana
- Vaso de precipitado de 250 ml
- Bagueta de vidrio
- Agua destilada
- Placas Petri de vidrio estériles

- Tubos de ensayo
- Gradilla
- Micropipeta
- Frasco color ámbar
- Balanza analítica
- Mechero Bunsen
- Florentino
- Matraz

2.5. APARATOS Y EQUIPOS

- Hidroextractor de acero inoxidable.
- Estufa SELECTA H.W. Kessel S.A.
- Autoclave SELECTA H.W. Kessel S.A.

2.6. OTROS

2.6.1. SOFTWARE

- GraphPad Prism versión 10.3.0.

3. MÉTODOS

La obtención del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.* se realizó mediante un equipo de destilación por arrastre de vapor de agua en el Laboratorio N°5 de Microbiología de la Universidad Andina Néstor Cáceres Velásquez.

3.1. RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN DE LA PLANTA ROMERO (*Rosmarinus officinalis L.*)

Las muestras botánicas de esta especie vegetal fueron recolectadas minuciosamente en el distrito de Chiguata, ubicado en la provincia de Arequipa y departamento de Arequipa, en el transcurso del mes de junio del año 2024. (ver Anexos Fig.14) Después de llevar a cabo el proceso de recolección, se demostró fundamental que la planta se encontrara en un estado de frescura óptimo y estuviera completamente libre de cualquier signo evidente de enfermedad, como la presencia de tonalidades marrones o amarillentas, e incluso la aparición de pigmentaciones oscuras en las hojas.

Al finalizar el control, se llegó a recolectar 8 Kg de Romero. Seguidamente se realizó un lavado a la muestra con agua a temperatura ambiente para eliminar residuos encontrados superficialmente.

Durante el transcurso de los siguientes treinta días, se procedió a dejar secar esta considerable cantidad de romero sobre unas bolsas de plástico en un lugar idóneo, a temperatura ambiente, con el fin de prevenir la reaparición de impurezas en el romero. (ver Anexos Fig.15)

En la Figura 4 se muestra el diagrama de flujo ilustrado para la recolección y preparación de la muestra

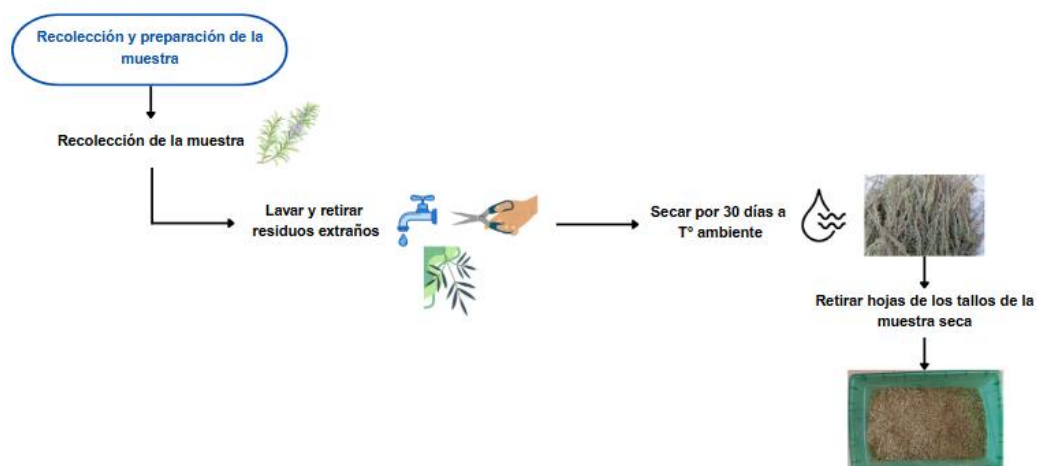


Figura 4. Diagrama de flujo de la recolección y preparación de la muestra (*Rosmarinus officinalis* L.) Elaboración propia

3.2. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis* L.)

Para llevar a cabo el proceso de extracción de los AEs de romero, se procedió a quitar de forma manual las hojas del tallo de la planta, dando como resultado un peso inferior, que fue de 5 Kg. comparando con el peso inicial. Posteriormente se insertó esta cantidad en el destilador. (ver Anexos Fig.18)

El inicio del sistema extractor se realizó cargando la matriz vegetal, previamente acondicionada, en la columna de extracción formando un lecho fijo y compacto. El generador de vapor se abastece con agua desionizada, respetando la capacidad nominal. (7) (ver Anexos Fig.19)

El procedimiento de extracción culminó exitosamente cuando se logró determinar que el volumen del valioso aceite esencial acumulado en el equipo de laboratorio, conocido como 'Florentino' (ver Anexos Fig. 20), se mantuvo constante a lo largo del tiempo, alcanzando la cantidad precisa de 63 mililitros de AEs de romero. Posteriormente, fue cuidadosamente transferido a un frasco estéril de tonalidad ámbar (ver Anexos Fig. 22), con el objetivo de preservar sus propiedades intactas. Acto seguido,

el recipiente fue debidamente etiquetado con información relevante y almacenado en condiciones de refrigeración controladas, a una temperatura óptima de entre 2 y 7 C°, con el propósito de garantizar su integridad y prevenir posibles alteraciones que podrían ser provocadas por la exposición a los dañinos rayos ultravioleta.

En la Figura 5 se muestra el diagrama de flujo ilustrado de la extracción del AEs de *Rosmarinus officinalis L.*

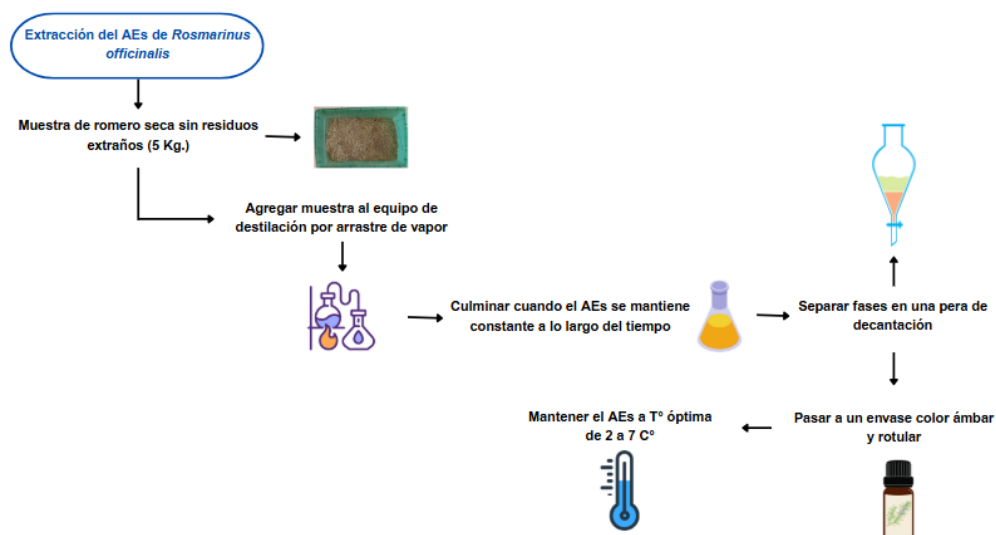


Figura 5. Diagrama de flujo de la preparación para extraer el AEs de *Rosmarinus officinalis L.* Elaboración propia

3.3. PREPARACIÓN DE DILUCIONES DEL AEs DE *Rosmarinus officinalis L.* (Romero)

Una vez obtenido el extracto de AEs de *Rosmarinus officinalis L.* (Romero), se procedió a preparar las diluciones al 40%, 60% y 80% y 100% de concentración. Como disolvente orgánico altamente utilizado en la industria, se empleó Dimetilsulfóxido (DMSO). (ver Anexos Fig. 26)

3.4. PREPARACION DEL CONTROL POSITIVO DEL ANTIFÚNGICO: Fluconazol

Se empleó el antifúngico Fluconazol en una concentración de 100 mg/50ml como control positivo. El fármaco fue diluido cuidadosamente en solución de Cloruro de Sodio, dado que esa era su presentación comercial, para lo cual se realizaron cálculos para obtener una concentración de 25ug/40ul. Fundamentando porque en el método a utilizar Kirby Bauer Modificado tiene una capacidad de 40ul en cada pozo.

3.5. CÁLCULOS

$$2 \mu g - \mu l$$

$$X - 40 \mu l$$

$$X = 80 \mu g$$

Cálculo para determinar la cantidad de fluconazol y cloruro de sodio

$$C_1 = 80 \mu g$$

$$V_1 = X$$

$$C_2 = 25 \mu g \text{ (Fluconazol)}$$

$$V_2 = 40 \mu l$$

$$V_1 = \frac{25 \mu g \times 40 \mu l}{80 \mu g}$$

$$V_1 = 12,5 \mu l \text{ de Fluconazol}$$

Para completar a 40 μ l

$$V_1 = 27,5 \mu l \text{ de NaCl}$$

Cálculo para una cantidad de 50 placas Petri

- Fluconazol

$$12,5 \times 50 = 625 \mu l$$

- NaCl

$$27,5 \times 50 = 1375 \mu l$$

$$625 \mu l + 1375 \mu l = 2000 \mu l \text{ ó } 2 \text{ ml}$$

Concentraciones para cada placa de 40 μ l (ver Anexos Fig. 26)

- 40%

$$40 \mu l - 100\%$$

$$X - 40 \%$$

$$X = 16 \mu l$$

$$16 \mu l \times 50 \text{ placas} = 800 \mu l \text{ de AEs}$$

$$800 \mu l \text{ AEs} + 1200 \mu l \text{ DMSO} = 2000 \mu l$$

- 60%

$$40 \mu l - 100\%$$

$$X - 60 \%$$

$$X = 24 \mu l$$

$$24 \mu l \times 50 \text{ placas} = 1200 \mu l \text{ de AEs}$$

$$1200 \mu l \text{ AEs} + 800 \mu l \text{ DMSO} = 2000 \mu l$$

- 80%

$$40 \mu l - 100\%$$

$$X - 80 \%$$

$$X = 32 \mu l$$

$$32 \mu l \times 50 \text{ placas} = 1600 \mu l \text{ de AEs}$$

$$1600 \mu l \text{ AEs} + 400 \mu l \text{ DMSO} = 2000 \mu l$$

3.6. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS, MÉTODOS Y TÉCNICAS MICROBIOLÓGICAS

La parte experimental se desarrolló en 2 fases: A) Prueba piloto, desarrollando 3 repeticiones y B) Ejecución de esta, en la que se realizó 50 repeticiones.

Con el propósito de determinar la actividad antifúngica del AEs de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) frente a *Candida albicans*; empleando el método de difusión en pozos de agar, siguiendo el método descrito por Kirby-Bauer y adaptado para Romero.

3.6.1. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO

Para el medio de cultivo microbiológico, se utilizó el medio de Agar Dextrosa Sabouraud, el cual consistió en una mezcla de 65 gr. de agar por cada litro de agua, la cual fue esterilizada mediante autoclave a una T° de 121 C° durante un periodo de 15 minutos, manteniendo el equipo cerrado. Seguidamente se procedió a distribuir un volumen de 20 ml. en cada una de las 50 placas Petri, las cuales presentaban un diámetro de 150 mm. (ver Anexos Fig. 30)

En la Figura 6 se muestra el diagrama de flujo ilustrado de la preparación del medio de cultivo.

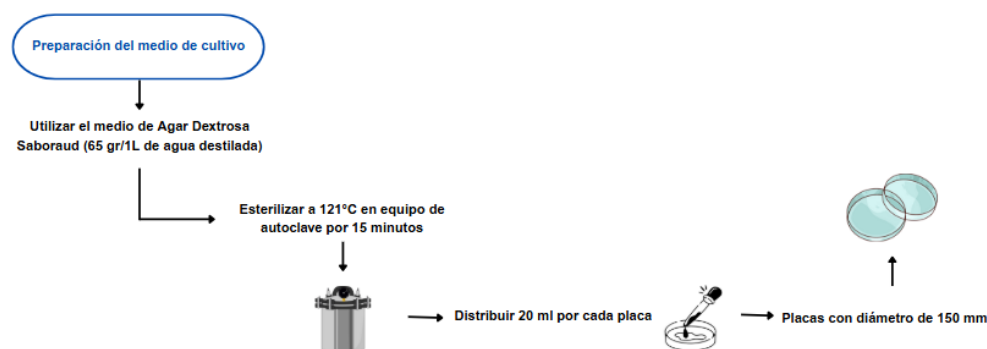


Figura 6. Diagrama de flujo de preparación del medio de cultivo. Elaboración propia

3.6.2. PREPARACIÓN DE POZOS

Se realizaron pozos de 5 mm con una pipeta, 6 por cada placa y se rotularon según concentración del aceite y controles. Seguidamente se sumergió un hisopo estéril en la suspensión presionando contra la pared interna del tubo para descartar el exceso de inóculo. A continuación, en la superficie de la placa se extendió en tres direcciones para dispersar uniformemente el inóculo.

3.6.3. CEPAS ATCC 10231 DE *Candida albicans*

Reconstitución: Las cepas de referencia seleccionadas y adquiridas para su posterior reconstitución, se usó Agar Dextrosa Sabouraud como medio de cultivo, y se incubaron a una temperatura constante de 37°C durante un período de 48 horas en un ambiente de presencia de oxígeno. Después del aislamiento e identificación de cepas ATCC fueron evaluadas frente a los extractos.

3.6.4. PREPARACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DEL INÓCULO DE CEPA ATCC 10231 DE *Candida albicans*

Se seleccionaron entre 3 y 5 colonias de cepas ATCC utilizando un asa bacteriológica y se suspendieron en tubos de ensayo que contenían una solución de cloruro de sodio al 0,9 %. Posteriormente, se procedió a ajustar los inóculos para alcanzar una turbidez equiparable al estándar 0.5 de McFarland (105 x 108 UFC/ml) mediante una comparación visual detallada.

3.6.5. REALIZACIÓN DE POZOS

Se realizaron pozos de 5 mm con una pipeta, 6 pozos por placa, seguidamente se rotularon según concentración del aceite y controles. (ver Anexos Fig. 31)

En la Figura 7 se muestra una referencia de una placa Petri rotulada con los 6 pozos.



Figura 7. Placa Petri rotulada con los 6 pozos. Elaboración propia

3.6.6. INOCULACIÓN DE PLACAS

Se sumergió cuidadosamente un hisopo estéril en la suspensión presionando suavemente contra la pared interna del tubo con el fin de descartar el exceso de inóculo presente en la muestra. Posteriormente, en la superficie de la placa se procedió a extender el inóculo en tres direcciones con el objetivo de lograr una dispersión uniforme del mismo. (ver Anexos Fig. 31)

En la Figura 8 se muestra el diagrama de flujo ilustrado de inoculación de placas.



Figura 8. Diagrama de flujo ilustrado de inoculación de placas. Elaboración propia

3.6.7. TRANSFERENCIA DE EXTRACTOS Y CONTROLES

Con una micropipeta se procedió a depositar con sumo cuidado un volumen de 40 microlitros de cada una de las concentraciones preparadas con meticulosidad: 40%, 60%, 80% y 100%. Además, se incluyó el control positivo con Fluconazol

a una concentración de 25 microgramos por 40 microlitros, y como control negativo se utilizó una solución de 40 microlitros de DMSO. (ver Anexos Fig. 26)

3.6.8. INCUBACIÓN DE LAS PLACAS

Se esperó un total de 15 minutos posteriores al paso anterior para permitir que las muestras se estabilizaran adecuadamente, y luego las placas fueron cuidadosamente incubadas a una temperatura constante de 37 grados Celsius en una estufa especializada para garantizar las condiciones óptimas de crecimiento. Posteriormente, se dejó en reposo durante un período de 48 horas en condiciones óptimas de oxígeno y posteriormente, tras finalizar este lapso de incubación, se procedió a medir el diámetro de los halos de inhibición generados en cada placa utilizando un instrumento de medición como una regla graduada.

3.6.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos obtenidos en el presente estudio, se empleó el software GraphPad Prism versión 10.3.0. Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA one-way) para evaluar las diferencias significativas entre los grupos de tratamiento, incluyendo las distintas concentraciones del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.*, el control negativo (DMSO) y el control positivo (fluconazol). Posteriormente, se aplicó la prueba de comparación múltiple Dunnett como prueba post hoc, con el objetivo de determinar qué tratamientos presentaban diferencias significativas en comparación con los grupos control.

4. DIAGRAMA DE FLUJO DE ACTIVIDADES

Objetivos	#	Actividades	JUNIO				JULIO				AGOSTO				SETIEMBRE				OCTUBRE				NOVIEMBRE				DICIEMBRE			
			1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
OBJETIVO 1	1	Revisión bibliográfica																												
	2	Recolección de muestra (<i>Rosmarinus officinalis</i>)																												
	3	Preparación de muestra (<i>Rosmarinus officinalis</i>)																												
	4	Extracción del AEs de <i>Rosmarinus officinalis</i>																												
OBJETIVO 2	7	Preparación de diluciones y controles (+ y -)																												
	8	Procesamiento microbiológico																												
	9	Lectura y medición de placas																												
OBJETIVO 2	10	Análisis de resultados																												
	11	Procedimiento estadístico																												
OBJETIVO 3	12	Redacción de tesis																												

Figura 9. Cronograma de actividades 2024. Elaboración propia



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. MEDICION DE HALOS DE INHIBICION

Para evaluar la actividad antimicótica del aceite esencial de *Rosmarinus Officinalis* L. (ROMERO) frente a *Candida albicans* se midieron los diámetros de los halos de inhibición y se compararon con el control positivo Fluconazol. Por lo que se procedió a pasar esta información con valores estadísticos y así obtener respuestas a las preguntas planteadas en el proyecto. Según los resultados de las placas Petri, se determinó que, si existe actividad antimicótica del Aes a todas las concentraciones siendo de mejores resultados al 100%, 80% y 60% del extracto en comparación con el fluconazol. Y que el blanco o control negativo, el disolvente DMSO, no tiene ninguna actividad inhibitoria por lo que no interfiere en la preparación de las diluciones del aceite esencial.



Figura 10. Placas Petri (25 unidades)

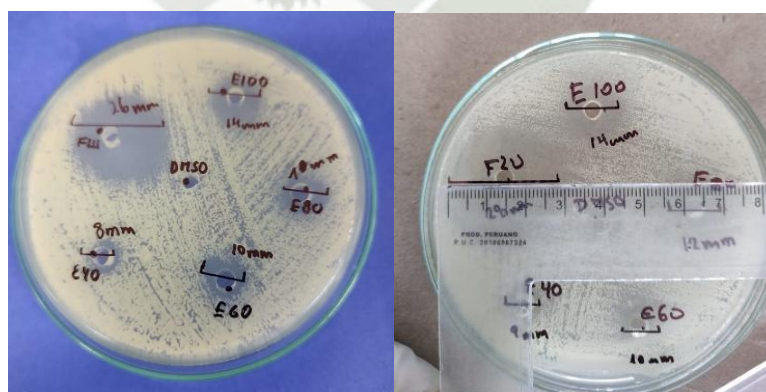


Figura 11. Medición de halos en placas Petri

2. INFORME DE LECTURA DE HALOS DE INHIBICION DEL AEs de ROMERO – FLUCONAZOL

Tabla 5. Resultados de valores en milímetros. Elaboración propia

N°	Valores en milímetros (mm)						OBS
REPETICIONES	DMSO	40%	60%	80%	100%	Fluconazol	
R1	5	8	8	13	19	20	
R2	5	9	10	12	22	23	
R3	5	10	12	14	15	22	
R4	5	8	13	13	15	20	
R5	5	8	12	12	16	25	
R6	5	6	11	13	18	28	
R7	5	9	9	13	19	23	
R8	5	8	10	12	23	22	
R9	5	9	12	14	18	26	
R10	5	6	10	13	20	21	
R11	5	9	9	12	18	19	
R12	5	10	11	14	22	23	
R13	5	9	10	11	16	22	
R14	5	10	8	13	18	24	
R15	5	8	10	11	19	25	
R16	5	6	9	14	16	22	
R17	5	9	12	12	15	24	
R18	5	6	10	14	16	19	
R19	5	8	8	14	20	20	
R20	5	19	11	13	18	18	
R21	5	10	9	12	19	23	
R22	5	8	12	15	21	20	
R23	5	9	8	14	18	22	
R24	5	6	9	12	19	19	
R25	5	9	11	13	18	24	
R26	5	8	8	8	13	30	
R27	5	8	8	8	13	28	
R28	5	9	9	9	14	28	
R29	5	10	10	13	14	30	
R30	5	10	10	12	14	28	

R31	5	8	10	10	10	28	
R32	5	8	8	11	13	28	
R33	5	7	8	10	12	26	
R34	5	7	7	10	14	28	
R35	5	8	10	10	12	28	
R36	5	8	10	10	14	26	
R37	5	10	8	10	12	28	
R38	5	12	8	11	12	30	
R39	5	10	11	12	15	30	
R40	5	8	12	14	11	26	
R41	5	8	8	11	13	26	
R42	5	10	8	10	12	24	
R43	5	11	10	12	15	30	
R44	5	10	10	12	12	30	
R45	5	10	12	12	14	30	
R46	5	10	12	13	15	30	
R47	5	12	11	11	15	30	
R48	5	12	12	12	15	28	
R49	5	11	10	11	12	30	
R50	5	12	11	12	13	29	
PROMEDIO	5	9.08	9.9	11.94	15.5	25.26	

Nota: Susceptibilidad según diámetro de halo: ≤ 8 mm = Resistente; 9 – 15 mm = Intermedio; ≥ 16 mm = Sensible

3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar, y se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$ para todas las pruebas estadísticas. Este análisis permitió establecer si el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. presenta actividad antifúngica significativa frente a *Candida albicans* en comparación con el tratamiento estándar con fluconazol.

Tabla 6. Resumen estadístico del análisis de varianza (ANOVA): componentes de varianza entre y dentro de grupos

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedios cuadrados	F	Prob.	Valor crítico para F
Entre grupos	12386.04	5	2477.21	439.20	P<0.0001	2.24
Dentro de los grupos	1658.24	294	5.64			
Total	14044	299				

La prueba de ANOVA de una vía realizada para comparar las distintas concentraciones del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.*, el control negativo (DMSO) y el control positivo (fluconazol) mostró diferencias altamente significativas entre los grupos ($F = 439.20$, $p < 0.0001$) (Tabla 6). El valor de $p < 0.0001$ indica que las diferencias observadas entre los tratamientos no son atribuibles al azar, lo que confirma que al menos uno de los grupos presenta un efecto significativamente distinto en la actividad antifúngica frente a *Candida albicans*. Esto evidencia la eficacia diferencial de los tratamientos evaluados.

Tabla 7. Prueba de Dunnett (Comparaciones múltiples entre tratamientos: diferencias de medias, intervalos de confianza y valores de significancia ajustados)

Comparaciones	Diferencia de promedios	Intervalo de confianza del 95% de la diferencia	¿Por debajo del umbral?	Valor p ajustado
DMSO vs. AE 40%	-4.080	-5.280 to -2.880	Yes	<0.0001
DMSO vs. AE 60%	-4.900	-6.100 to -3.700	Yes	<0.0001
DMSO vs. AE 80%	-6.940	-8.140 to -5.740	Yes	<0.0001
DMSO vs. AE 100%	-10.74	-11.94 to -9.540	Yes	<0.0001
DMSO vs. Fluconazol	-20.26	-21.46 to -19.06	Yes	<0.0001

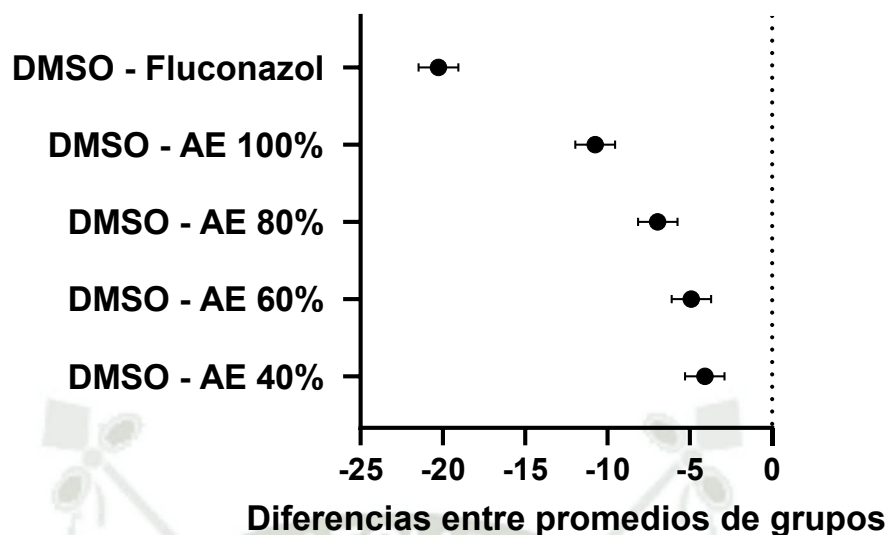


Figura 12. Prueba de Dunnett (Comparación gráfica de las diferencias entre medios de grupos experimentales del DMSO y AEs)

Los resultados del análisis post hoc de Dunnett compararon las concentraciones del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.* (40%, 60%, 80% y 100%) y el fluconazol frente al control negativo (DMSO), mostrando diferencias significativas en todas las comparaciones ($p < 0.0001$) (Tabla 7 y Fig. 12). Las diferencias de promedios aumentaron con la concentración del aceite esencial, siendo más pronunciadas en el 100%, con un intervalo de confianza que excluye el valor cero en todos los casos, lo que confirma su eficacia antifúngica. El fluconazol presentó la mayor diferencia promedio en comparación con el DMSO, sugiriendo un efecto más potente, aunque las concentraciones más altas del aceite esencial (80% y 100%) también demostraron una actividad considerablemente superior en relación con las concentraciones más bajas. Estos resultados evidencian que el aceite esencial tiene un efecto antifúngico dependiente de la concentración, alcanzando niveles competitivos frente al fluconazol en las condiciones evaluadas

Tabla 8. Comparación de la eficacia de fluconazol frente a diferentes concentraciones de AEs y DMSO: análisis de diferencias de promedios, intervalos de confianza y valores p ajustados

Comparaciones	Diferencia de promedios	Intervalo de confianza del 95% de la diferencia	¿Por debajo del umbral?	Valor p ajustado
Fluconazol vs. AE 40%	20.26	19.06 to 21.46	Yes	<0.0001
Fluconazol vs. AE 60%	16.18	14.98 to 17.38	Yes	<0.0001
Fluconazol vs. AE 80%	15.36	14.16 to 16.56	Yes	<0.0001
Fluconazol vs. AE 100%	13.32	12.12 to 14.52	Yes	<0.0001
Fluconazol vs. DMSO	9.520	8.320 to 10.72	Yes	<0.0001

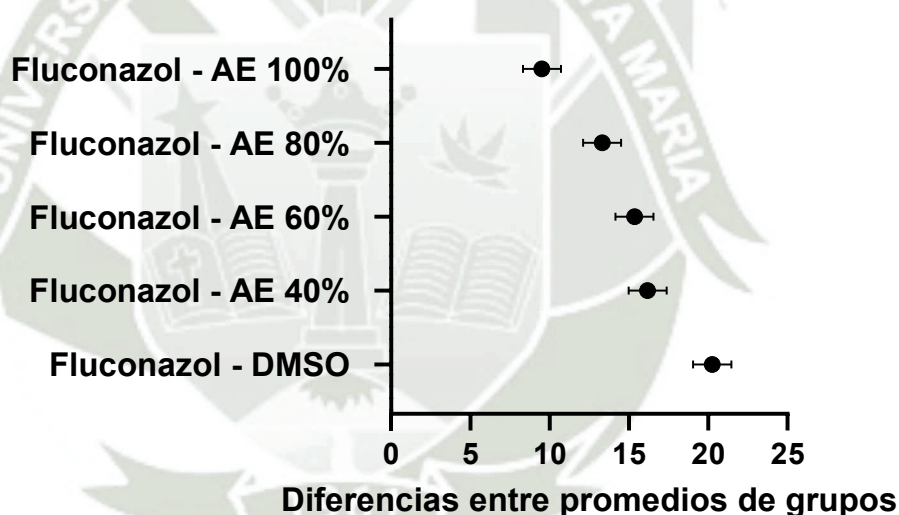


Figura 13. Representación gráfica de las diferencias de promedios entre fluconazol y AEs en diferentes concentraciones y DMSO

Los resultados del análisis post hoc de Dunnett compararon el fluconazol frente a las concentraciones del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. (40%, 60%, 80% y 100%) y el DMSO, mostrando diferencias significativas en todas las comparaciones ($p < 0.0001$) con intervalos de confianza que excluyen el valor cero (**Tabla 8** y **Fig. 13**). El fluconazol presentó una mayor diferencia promedio en relación con el aceite esencial al 40%, indicando una eficacia antifúngica superior en este caso. Sin em-

bargo, las diferencias disminuyeron progresivamente conforme aumentó la concentración del aceite esencial, siendo menores frente al 100%, lo que sugiere que las concentraciones más altas del aceite esencial se acercan en eficacia al fluconazol. La comparación entre el fluconazol y el DMSO también evidenció una diferencia significativa, confirmando la alta eficacia del fluconazol en las condiciones evaluadas. Estos resultados resaltan que el efecto antifúngico del aceite esencial es dependiente de la concentración, aunque sigue siendo inferior al del fluconazol en todas las comparaciones.

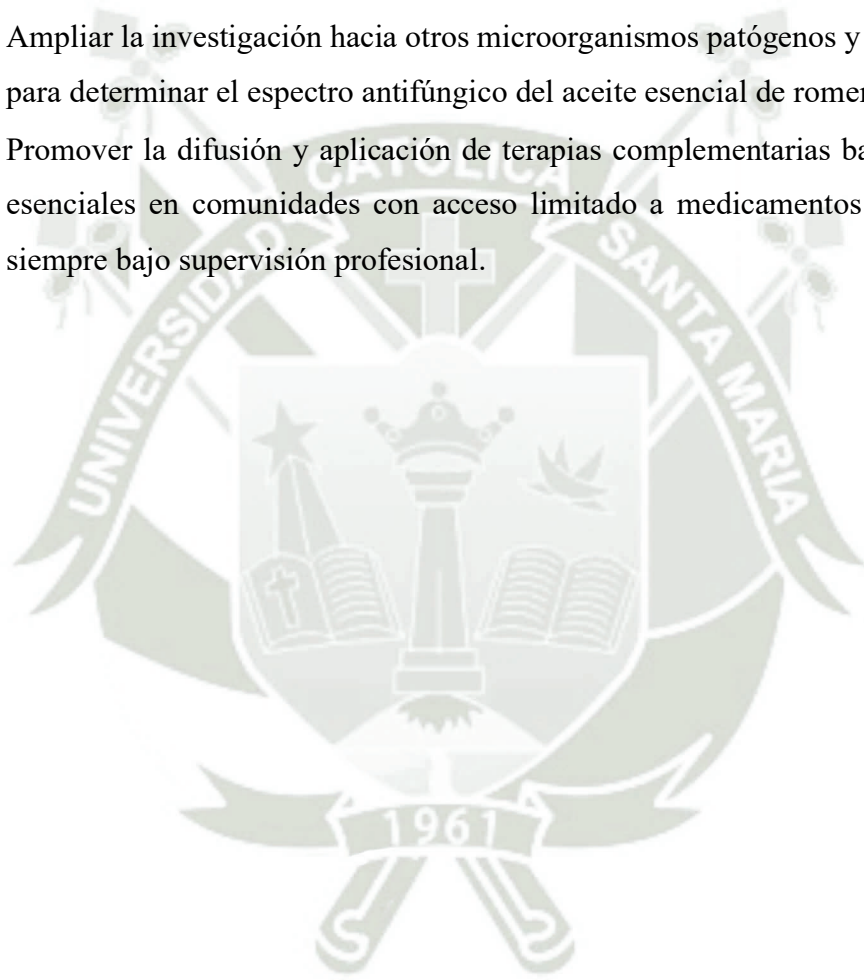


CONCLUSIONES

1. El aceite esencial mostró actividad antifúngica significativa en todas las concentraciones evaluadas (40%, 60%, 80% y 100%), evidenciada por la formación de halos de inhibición mayores que el control negativo (DMSO), aunque su efectividad fue menor que la del fluconazol, que presentó los halos más grandes (promedio 25.26 mm frente a 15.5 mm del aceite al 100%).
2. El fluconazol, utilizado como control positivo, demostró una eficacia antifúngica superior y estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) en comparación con todas las concentraciones del aceite esencial, aunque la diferencia en el efecto se redujo conforme aumentaba la concentración del aceite, sugiriendo que concentraciones altas del aceite esencial pueden acercarse a la efectividad del medicamento.
3. La comparación estadística mediante ANOVA y la prueba post hoc de Dunnett confirmó diferencias significativas entre el fluconazol, las distintas concentraciones del aceite esencial y el control negativo (DMSO).

RECOMENDACIONES

- Se recomienda investigar la sinergia entre el aceite esencial y antifúngicos convencionales como el fluconazol, para explorar posibles combinaciones que potencien la eficacia y reduzcan la resistencia.
- Optimizar y estandarizar los procesos de extracción y formulación del aceite esencial para maximizar su concentración y estabilidad, buscando mejorar su efectividad antifúngica.
- Ampliar la investigación hacia otros microorganismos patógenos y cepas resistentes para determinar el espectro antifúngico del aceite esencial de romero.
- Promover la difusión y aplicación de terapias complementarias basadas en aceites esenciales en comunidades con acceso limitado a medicamentos convencionales, siempre bajo supervisión profesional.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Illanes Quispe AN. Efecto antimicrobiano del aceite de *Rosmarinus officinalis* “ROMERO” frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*. [Online].; 2020 [cited 2024 octubre 23]. Available from: <http://tesis.unap.edu.pe/handle/20.500.14082/13095>.
2. Blanco PL. Recent advances and novel approaches in laboratory-based diagnostic mycology. *Medical Mycolgy*. 2019 Julio; 57(S259–S266).
3. Castaño H, Ciro G, Zapata J, Jiménez S. ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL EXTRACTO ETANÓLICO Y DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE *Rosmarinus officinalis* L. SOBRE ALGUNAS BACTERIAS DE INTERÉS ALIMENTARIO. In *VITAE, REVISTA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA*. Medellín - Colombia; 2010. p. 149-154.
4. Vaou N, Stavropoulou E, Voidarou C, Tsigalou C, Bezirtzoglou E. Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. *Advance in Antimicrobial Activity of Natural Products*. 2021 setiembre; 10.
5. Shankar Raut J, Mohan S. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*. 2014 diciembre; 62(250 - 264).
6. Tucuch M, Bojórquez J, Arredondo R, Hernández F, Anguiano J. Actividad biológica de extractos vegetales del semidesierto mexicano para manejo de *Fusarium oxysporum* de tomate. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*. 2022 noviembre; 8.
7. Dadar M, Tiwari R. *ScienceDirect*. [Online].; 2018 [cited 2024 noviembre 15]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0882401017317175>.
8. Mantilla Y, Tuta E, Brito A, Clavijo L. Candidiasis y *Candida albicans*. *Boleti de Malariologia y Salud Ambiental*. 2021 Julio-Setiembre; LXI(3).
9. Lipner S, Scher R. Onychomycosis. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2019; 80(4)(853-867).
10. CDC. [Online].; 2022 [cited 2024 17 noviembre]. Available from: <https://www.cdc.gov/candidiasis/signs-symptoms/index.html>.

11. Rhimi W, Theelen B, Boekhout T, Aneke Cl , Otranto D , Cafarchia C. Conventional therapy and new antifungal drugs against *Malassezia* infections. *Med Mycol*. 2021 marzo; 3(215-234).
12. Harborne J, Lewis T. A survey of antifungal compounds from higher plants. In *Phytochemistry*. p. 1982-1993.
13. García D, Rivas C, Leos C. Investigación en plantas de importancia médica. *OmniaScience*. 2017.
14. Shahina Z, Homsy R, Price J, Whiteway M, Sultana T, Dahms T. Rosemary essential oil and its components 1,8-cineole and α -pinene induce ROS-dependent lethality and ROS-independent virulence inhibition in *Candida albicans*. *National Center for Biotechnology Information*. 2022 noviembre.
15. Ortega T, Cerretero M. Plantas Medicinales. [Online].; 2024. Available from: <https://www.farmaceuticos.com/wp-content/uploads/2020/11/PAM434-10-1-PlantasMedicinales-Romero.pdf>.
16. Flórez Chacón C, Mojica Flórez JS. Determinación de la composición química de los aceites esenciales de Tomillo (*Thymus vulgaris*) y Romero (*Rosmarinus officinalis*) y su posible uso como antifúngico contra microorganismos fitopatógenos en productos agrícolas. Trabajo de investigación. Bogotá: Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca , Facultad de Ciencias de la Salud Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico ; 2019.
17. TOKU-E. [Online].; 2024 [cited 2024 noviembre 23. Available from: <https://toku-e.com/fluconazole/>.
18. DRUGBANK. [Online].; 2024 [cited 2024 noviembre 23. Available from: <https://go.drugbank.com/drugs/DB00196>.
19. WangH ZJFYCLNZNtQZJ. A Small Molecule Inhibitor of Erg251 Makes Fluconazole Fungicidal by Inhibiting the Synthesis of the 14 α -Methylsterols. *American Society for Microbiology*. 2022 diciembre.
20. Navarro Cruz A, Dávila Marquez R, Melgoza Palma N, Meza Pluma R. *Academia*. 2011 agosto.
21. Regmurcia Integra digital. [Online].; 2022 [cited 2024 setiembre 14. Available from: https://www.regmurcia.com/servlet/s.SI?sit=c%2C543%2Cm%2C2719&r=ReP-19847-DETALLE_REPORTAJESPADRE.

22. Málaga Ad. Área de Sostenibilidad Medioambiental. [Online].; 2022 [cited 2024 noviembre]. Available from: <https://bioeduca.malaga.eu/es/catalogo-de-especies/detallede-la-especie/Romero/>.
23. Vivancos VL. Estudio de la Variabilidad Química, Propiedades Antioxidantes y Biocidas de Poblaciones Espontáneas de *Rosmarinus* *Officinalis* L. en la Región de Murcia. TESIS. Murcia: Universidad de Murcia, FACULTAD DE BIOLOGIA; 2014.
24. FRONDA. [Online].; 2024 [cited 2024 setiembre 14]. Available from: https://www.fronda.com/productos/romero-Rosmarinus-officinalis#diametro_maceta_13_cm.
25. Ozcan M, Chalchat J. National Library of Medicine, PubMed. [Online].; 2008 [cited 2024 noviembre]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18654909/>.
26. Charles L, Steven L, Gillian M, Brad K, David T. PubMed seco-Hinokiol, un nuevo diterpenoide abietano de *Rosmarinus* *officinalis*. [Online].; 2005 [cited 2024 noviembre]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15679327/>.
27. Rivas DV. EXTRACTO DE ROMERO COMO ANTIOXIDANTES EN PRODUCTOS CARNICOS. TESIS. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO, Facultad de química; 2024.
28. Orozco SE. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS DE ROMERO (*Rosmanrus officinalis*) Y TOMILLO (*Thymus vulgaris*). TESIS DE GRADO. RIOBAMBA - ECUADOR: ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO, Escuela de Bioquímica y Farmacia; 2010.
29. Ferri M, Ranucci E, Romagnoli P, Giaccone V. Antimicrobial resistance: a global emerging threat to public health systems. In.: Crit. Rev. Food Sci.; 2017. p. 2857-2876.
30. Silva L. S-(+)-and R-(-)-linalool: a comparison of the in vitro anti-Aeromonas hydrophila activity and anesthetic properties in fish. An. Acad. Bras. Ciênc. 2017; 89 N°1(203-212).
31. Linde G, Colauto N, Gazim Z. Quimiotipos, extracción, composición y aplicaciones del aceite esencial de *Lippia alba*. Rev Bras Plant Med. 2015; 18(191-200).
32. Montúfar Guachilema M. Eficacia del romero (*Rosmarinus officinalis*) en la inhibición de *Cándida Albicans*. Tesis. UDLA; 2019.

33. Dentone S, Morales S. Determinación in vitro de la actividad antimicótica del aceite de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre *Microsporum canis*. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú. 2017 ene/mar; 28(1).
34. De La Cruz L, Mil Sampen J. ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Rosmarinus officinalis* L. (ROMERO) FRENTE A *Candida albicans* ATCC 10231 COMPARADO CON nistatina. Tesis. Universidad Maria Auxiliadora, Lima; 2023.
35. Hussein B, Oubari M, Oubari O, Aziz R, Muaaz A. Formulation and evaluation of a topical gel containing Rosemary oil for the treatment of acne vulgaris. International Journal of Herbal Medicine. 2023; 4(23-30).
36. Malik P, Upadhyay P. Formulación y evaluación de una microemulsión a base de aceite esencial de árbol de té/romero para la actividad antimicrobiana. Biosci Biotech Res Asia. 2023; 20(1).
37. Rodríguez M, Alcaraz L, Real S. PROCEDIMIENTOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ACEITES ESENCIALES EN PLANTAS AROMÁTICAS. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. 2012.
38. Porta N. DISEÑO DE UNA CALDERA HÍBRIDA (ENERGÍA SOLAR Y LEÑA) PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE ESENCIAL DE HIERBA LUISA UTILIZANDO UN CONCENTRADOR SCHEFFLER DE 8m2.. TESIS. Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima; 2015.
39. Vazquez M. MANUAL MSD. [Online].; 2022 [cited 2024 noviembre 23. Available from: <https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/diagn%C3%B3stico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas?ruleredirectid=758>.
40. Aulacio MPd. [Online].; 2022 [cited 2024 setiembre 15. Available from: http://www.ucv.vc/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Antibiograma.pdf.
41. Crespo MdP. La resistencia bacteriana: ¿Estamos preparados para detectarla? Artículo. Colombia: Universidad Santiago de Cali, Grupo de Microbiología Médica y Enfermedades Infecciosas; 2005.

42. Bubonja M, Knezevic S, Abram M. Challenges to antimicrobial susceptibility testing of plant-derived polyphenolic compounds. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2020 diciembre; 71(4).
43. Maya Dian Rakhmawatie AZFIDKNM. Secondary Metabolites Production of *Bacillus* spp. Isolated from. *JURNAL FARMASI SAINS DAN KOMUNITAS*. 2023 noviembre; 20(2).
44. Sangeetha Arullappan ZZDFB. Preliminary Screening of Antibacterial Activity Using Crude Extracts of *Hibiscus rosa sinensis*. *National Library of Medicine*. 2009 diciembre; 20(2, 109–118).
45. Archana Voleti SBKVSRRABNR. Antibacterial Activity of *Ricinus communis* Extracts against Common Human Pathogens Obtained from Surgical Wound Infections in a Tertiary Care Hospital of Semi-urban Set-up at Andhra Pradesh, India. *Clinical and Diagnostic Research*. 2022 febrero; 16(2).
46. Illanes Quispe AN. REPOSITORIO DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO. [Online].; 2020 [cited 2024 noviembre. Available from: [chrome-extension:http://tesis.unap.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14082/13095/Illanes_Quispe_Ana%
c3%ads_Nemesia.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://tesis.unap.edu.pe/bitstream/handle/20.500.14082/13095/Illanes_Quispe_Ana%c3%ads_Nemesia.pdf?sequence=1&isAllowed=y).

ANEXOS



Figura 14. Muestra fresca de *Rosmarinus Officinalis*



Figura 15. Muestra seca de *Rosmarinus Officinalis L.*



Figura 16. Retiro manual de hojas del tallo de *Rosmarinus Officinalis L.*



Figura 17. Equipo hidroextractor de acero inoxidable



Figura 18. Llenado del equipo de destilación por arrastre de vapor con la muestra *Rosmarinus Officinalis L.*



Figura 19. Instalación del equipo de destilación por arrastre de vapor



Figura 20. Equipo de laboratorio 'Florentino'

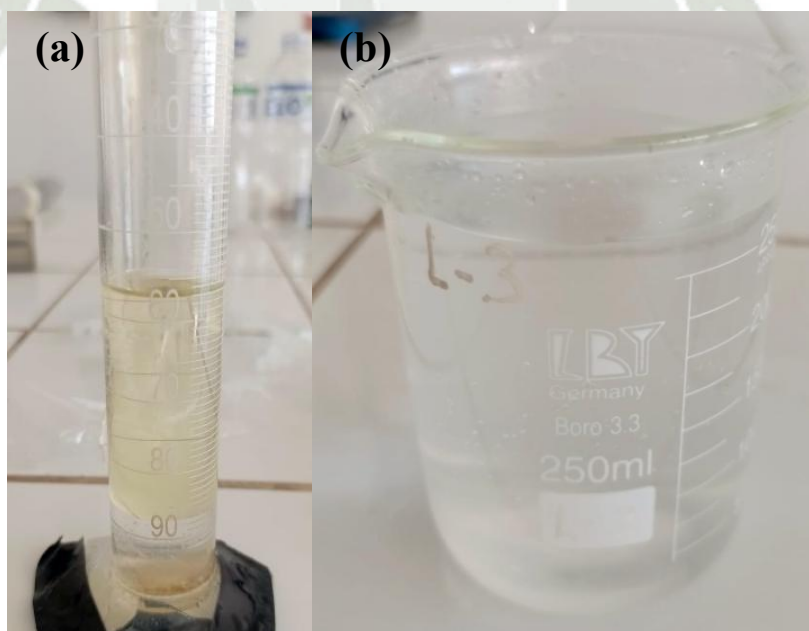


Figura 21. AEs destilado. (a) AEs concentrado en el equipo Florentino. (b) Hidrolato del AEs de *Rosmarinus Officinalis L.*



Figura 22. Frasco ámbar con contenido de AEs puro



Figura 23. Residuo vegetal de *Rosmarinus Officinalis* destilado



Figura 24. Separación de fases: Hidrolato y AEs de *Rosmarinus Officinalis* L. en pera de decantación



Figura 25. (a) Fluconazol en NaCl 100mg/50ml. (b) DMSO



Figura 26. Preparación de diluciones del AEs de *Rosmarinus Officinalis* L. al 40%, 60%, 80% y 100%

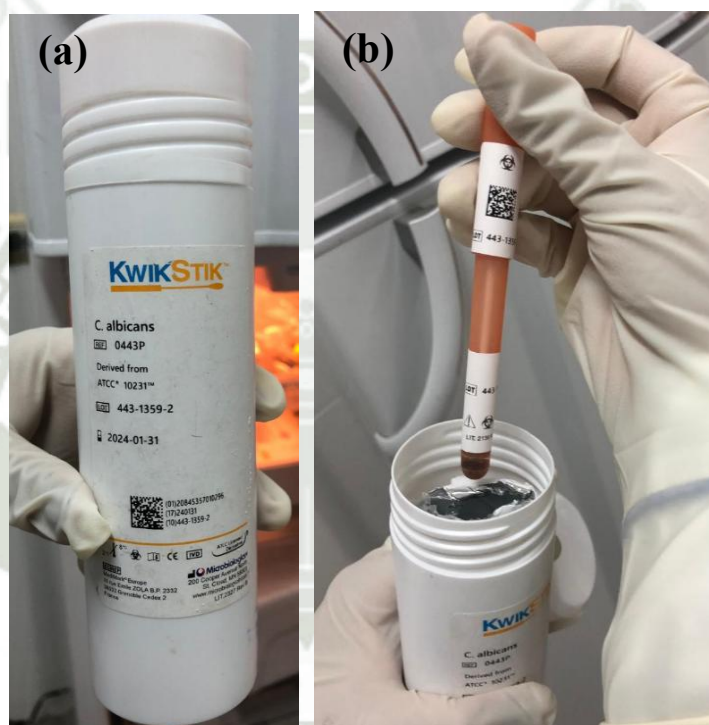


Figura 27. *Candida albicans*. (a) Cepas ATCC 10231 de *Candida albicans*. (b) Hisopo de inoculación

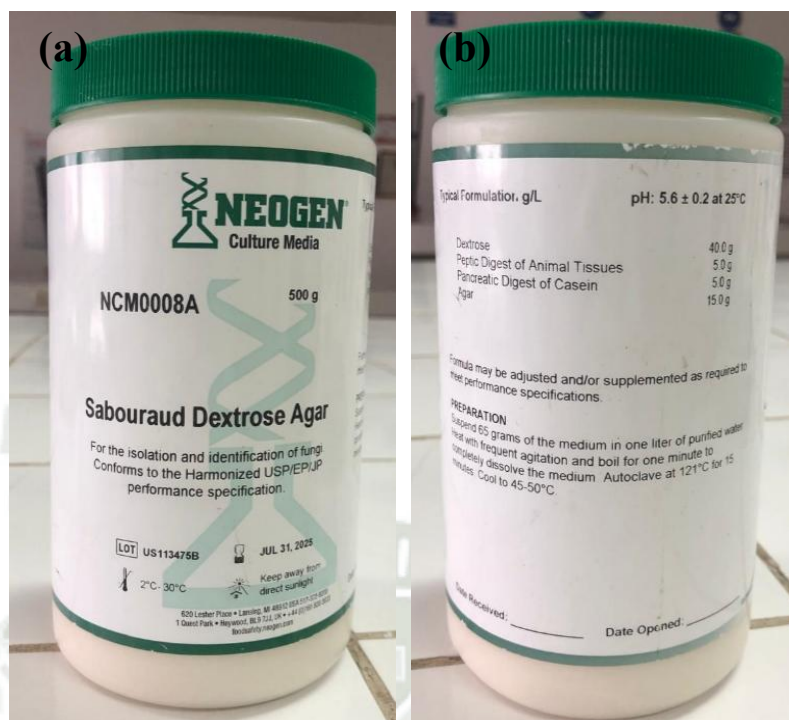


Figura 28. Envases (a) Agar Dextrosa Sabouraud 500 mg (b) Formulación

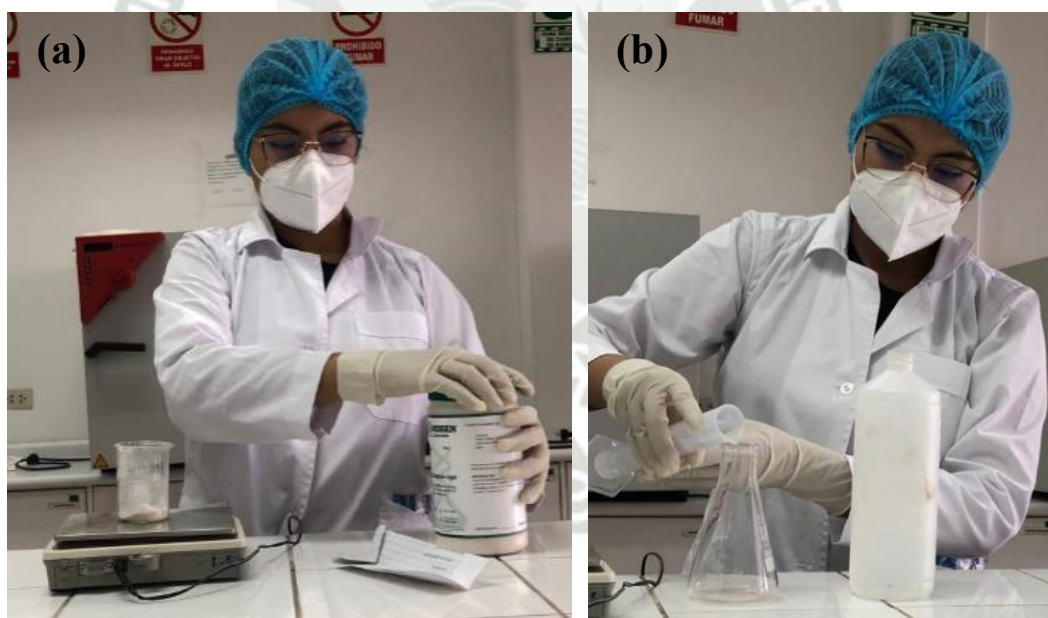


Figura 29. Preparación del medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud. (a) Pesado (b) Mezcla con agua destilada

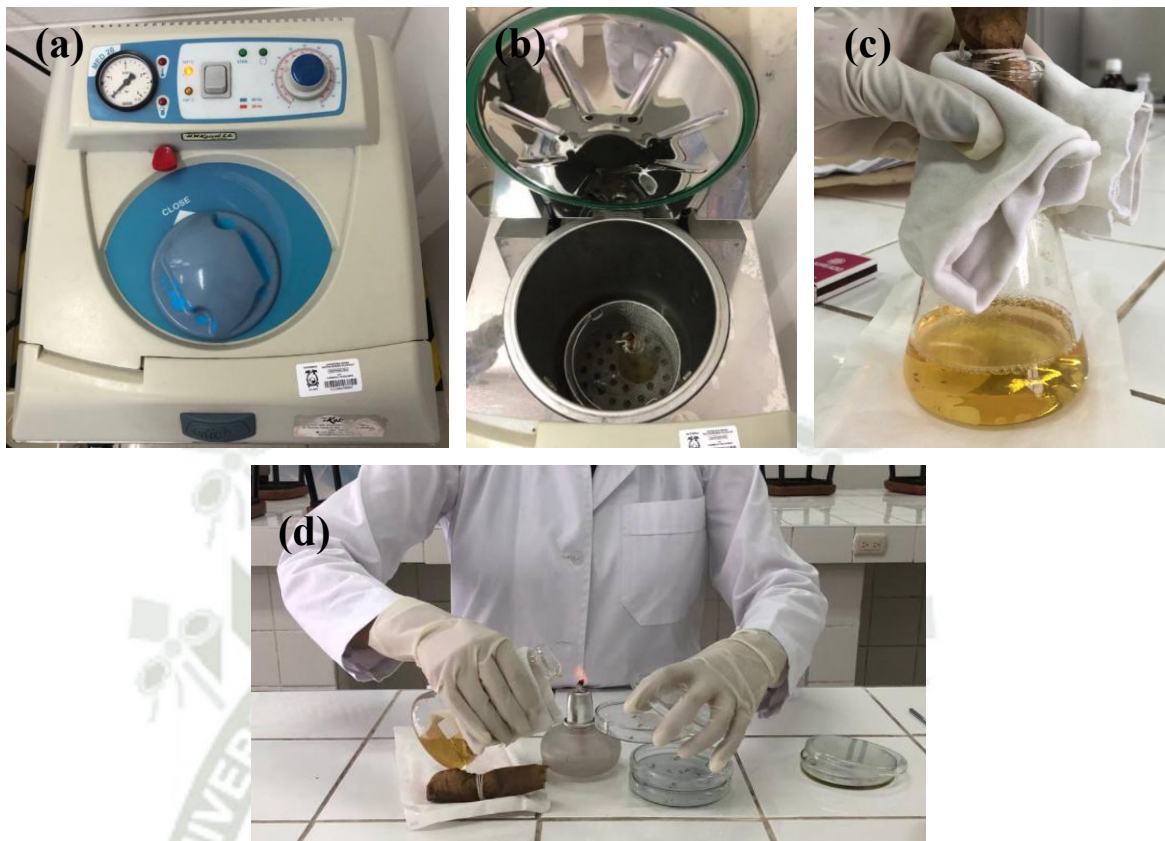


Figura 30. Esterilización del medio de cultivo en autoclave. (a) Equipo de autoclave. (b) Matraz con preparación. (c) Preparación esterilizada. (d) Llenado de placas Petri con medio de cultivo.



Figura 31. Placa Petri (a) Rotulación y realización de pozos. (b) Inoculación de placas Petri.



Figura 32. Incubación de las placas en estufa





**UNIVERSIDAD ANDINA
"NÉSTOR CÁCERES VELÁSQUEZ"**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

E.P. de Farmacia y Bioquímica

CONSTANCIA

QUIEN SUCRIBE, DIRECTORA DE LA ESCUELA
PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE
LA UNIVERSIDAD ANDINA NÉSTOR CÁCERES
VELÁSQUEZ

HACE CONSTAR:

Que la Srta Almendra Fernanda Alarcón Álvaro con DNI: 70788657 -
Código de estudiante UCSM : 2018174282 ha realizado la parte
experimental de su tesis titulada:

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE
ESENCIAL DE ROSMARINUS OFFICINALIS L. (ROMERO) FRENTE
A CÁNDIDA ALBICANS IN VITRO COMPARADO CON
FLUCONAZOL

Su asistencia al laboratorio N°5 de Microbiología, de nuestra escuela
profesional ha sido desde el 02 de enero al 17 de enero del presente año.

Se le expide la presente constancia, a solicitud de la interesada, para los fines
que estime conveniente.

Juliaca, 20 de enero de 2025

CC. Ar
ch.



UNIVERSIDAD ANDINA
NÉSTOR CÁCERES VELÁSQUEZ
MSc. Maria Ankoneta Laoyza Lopez
DIRECTORA
E.P. FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Figura 33. Constancia de autorización de acceso y uso de laboratorio N°5 de Microbiología en la Universidad Néstor Cáceres Velásquez en la ciudad de Juliaca.