

1 **UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE**
2 **PUNO**
3 **FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**
4 **ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**
5



6
7
8 **EFEECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE DE *Rosmarinus officinalis***
9 **“ROMERO” FRENTE A *Escherichia coli* y *Candida albicans***

10
11 **TESIS**

12 **PRESENTADA POR:**

13 **Bach. ANAÍS NEMESIA ILLANES QUISPE**

14
15 **PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

16 **LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

17
18
19 **PUNO – PERÚ**

20
21 **2020**
22
23

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

EFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE DE *Rossmarinus officinalis*

“ROMERO” FRENTE A *Escherichia coli* y *Candida albicans*

TESIS

PRESENTADA POR:

Bach. ANAÍS NEMESIA ILLANES QUISPE

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

APROBADA POR:

PRESIDENTE


:
Dra. Youri Teresa Del Carpio Condori

PRIMER MIEMBRO


:
M. Sc. Gilmar Gamaliel Goyzueta Camacho

SEGUNDO MIEMBRO


:
M. Sc. Vicky Cristina Gonzales Alcos

DIRECTOR / ASESOR


:
D. Sc. Juan José Pauro Roque

Fecha de sustentación: 09 de enero del 2020.

Área : Ciencias Biomédicas

Tema : Biotecnología vegetal



Urkund Analysis Result

Analysed Document: UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO.docx
(D62357283)
Submitted: 1/14/2020 4:59:00 PM
Submitted By: acanales@unap.edu.pe
Significance: 8 %

Sources included in the report:

TESIS-FINAL AMOR_16 de octubre2.docx (D57385075)
LUPE CHAMBA URKUND.doc (D11332046)
TESIS SOLANO XIMENA.docx (D16262787)
Tesis Karina Flores UNACH.docx (D33300762)
PROYECTO KATHERINE ALEXANDRA CHANGO SÁNCHEZ.docx (D41354882)
EFECTO ANTIFUNFICO DE CANELA SOBRE CEPAS DE CANDIDA ALBICANS SOFIA AIZAGA.docx
(D27037944)
TESIS PARA DICTAMEN LIZ INDIRA OLIVERA Y GISELLA GUTIERREZ.pdf (D60455646)
[https://www.researchgate.net/
publication/237052404_Actividad_antimicrobiana_de_aceite_esencial_de_Origanum_vulgare_L_
ante_bacterias_aisladas_en_leche_de_bovino](https://www.researchgate.net/publication/237052404_Actividad_antimicrobiana_de_aceite_esencial_de_Origanum_vulgare_L_ante_bacterias_aisladas_en_leche_de_bovino)
[https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/11836/1026569480.pdf?
sequence=1&isAllowed=y](https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/11836/1026569480.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
<https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/5113830.pdf>
<https://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/59942>
[http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/142693/Efecto-bactericida-de-
desinfectantes-sobre-cepas-de-Escherichia-coli-y-Listeria-innocua.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/142693/Efecto-bactericida-de-desinfectantes-sobre-cepas-de-Escherichia-coli-y-Listeria-innocua.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
[https://docplayer.es/amp/49766770-Universidad-tecnica-de-ambato-facultad-de-ciencias-
agropecuarias.html](https://docplayer.es/amp/49766770-Universidad-tecnica-de-ambato-facultad-de-ciencias-agropecuarias.html)
<https://docplayer.es/95640798-Universidad-privada-norbert-wiener.html>
[https://docplayer.es/amp/148814120-Universidad-tecnica-de-ambato-facultad-de-ciencias-
agropecuarias.html](https://docplayer.es/amp/148814120-Universidad-tecnica-de-ambato-facultad-de-ciencias-agropecuarias.html)
[https://docplayer.es/111712870-Universidad-tecnica-de-ambato-facultad-de-ciencias-
agropecuarias.html](https://docplayer.es/111712870-Universidad-tecnica-de-ambato-facultad-de-ciencias-agropecuarias.html)

Instances where selected sources appear:

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE DE Rosmarinus officinalis "ROMERO" FRENTE A
Escherichia coli y Candida albicans

TESIS PRESENTADA POR: Bach. ANAÍS NEMESIA ILLANES QUISPE

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE: LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PUNO – PERÚ

2020

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

EFFECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE DE Rosmarinus officinalis "ROMERO" FRENTE A
Escherichia coli y Candida albicans TESIS

PRESENTADA POR: Bach. ANAÍS NEMESIA ILLANES QUISPE PARA OPTAR EL TÍTULO
PROFESIONAL DE: LICENCIADO EN BIOLOGÍA

APROBADA POR:

PRESIDENTE : Dra. Youri Teresa Del Carpio Condori

PRIMER MIEMBRO : M. Sc. Gilmar Gamaliel Goyzueta
Camacho

SEGUNDO MIEMBRO : M. Sc. Vicky Cristina Gonzales
Alcos

DIRECTOR / ASESOR : D. Sc. Juan José Pauro Roque

Fecha de sustentación: 09 de enero del 2020. Área : Ciencias Biomédicas Tema : Biotecnología
vegetal DEDICATORIA

... A Dios, por haberme guiado espiritualmente.

A mi madre Agripina Ninfa Quispe Arapa, que, ha dejado en mí, un legado del significado de
ser feliz.

A mi Primos, Daniel, Arely, Ana y Tatiana, por brindarme alegría.

Anais Nemesia Illanes Quispe

AGRADECIMIENTO

DEDICATORIA

134

135

136 ... A Dios, por haberme
137 guiado espiritualmente.

138

139

140

141

142

143

A mi madre Agrípina
Ninfa Quispe Arapa,
que, ha dejado en mí,
un legado del
significado de ser feliz.

144

145 A mí Primos, Daniel,
146 Arely, Ana y Tatiana, por
147 brindarme alegría.

148

149

150

151

152

153

Anaís Nemesía Illanes Quispe

154

155

156

157

158

159

160

161

AGRADECIMIENTO

162

163

164 *Mí profundo agradecimiento a los profesores de la Escuela*
165 *Profesional de Biología, por haber compartido sus*
166 *conocimientos.*

167 *A mis compañeros de la Facultad de Biología, Promoción 2016*
168 *- II.*

169

170 *A mis jurados Dra. Yourí Teresa del Carpio Condori, M.Sc.*
171 *Gilmar Gamaliel Goyzueta Camacho, M.Sc. Vicky Cristina*
172 *Gonzales Alcos, quienes, con sus observaciones, van a permitir*
173 *la mejora de esta tesis*

174

175

176

177

178 *A mí asesor Dr.Sc. Juan José Pauro Roque, quien acompaño con*
179 *sabiduría, la realización de esta tesis*

180

181

182

183

ÍNDICE GENERAL

184		
185		
186	RESUMEN	13
187	ABSTRACT	14
188	I. INTRODUCCIÓN	15
189	1.1. OBJETIVO GENERAL	17
190	1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
191	II. REVISIÓN DE LITERATURA	18
192	2.1. ANTECEDENTES	18
193	2.2. MARCO TEÓRICO	22
194	2.2.1. Plantas medicinales	22
195	2.2.2. Aceites esenciales	23
196	2.2.3. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales	23
197	2.2.4. <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero)	23
198	2.2.5. Agente patógeno	25
199	2.2.6. Medicamentos	28
200	III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
201	3.1. ÁREA DE ESTUDIO	29
202	3.2. TIPO DE ESTUDIO	29
203	3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA	29
204	3.4. OBTENCIÓN DEL ACEITE	30
205	3.5. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	32
206	3.6. METODOLOGÍA	33
207	3.6.1. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración	
208	mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>	
209	“romero” frente a <i>Escherichia coli</i>.	33
210	3.6.2. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración	
211	mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>	
212	“romero” frente a <i>Candida albicans</i>.	38

213	IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	43
214	4.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI), CONCENTRACIÓN	
215	MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Rosmarinus</i>	
216	<i>officinalis</i> “ROMERO” FRENTE a <i>Escherichia coli</i>	43
217	4.2. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI), CONCENTRACIÓN	
218	MÍNIMA FÚNGICA (CMF) DEL ACEITE ESENCIAL DE <i>Rosmarinus</i>	
219	<i>officinalis</i> “ROMERO” FRENTE A <i>Candida albicans</i>.....	49
220	V. CONCLUSIONES.....	56
221	VI. RECOMENDACIONES.....	57
222	VII. REFERENCIAS	58
223	VIII. ANEXOS	63
224		
225		

ÍNDICE DE FIGURAS

226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259

Figura 1. Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) en su hábitat natural.....	24
Figura 2. El extractor de los aceites esenciales consiste en un equipo de destilación discontinua marca Elettronica Veneta, el cual está conformado por un generador de vapor SCT04/EV, una cámara de extracción en el cual se colocará el material vegetal, un condensador el cual utiliza agua fría de la red pública, un vaso de florentino recolector y una pera de decantación para separar el aceite del agua.....	31
Figura 3. Esquema de la técnica de antibiograma por difusión en agar	35
Figura 4. Prueba de Tukey de los diámetros de inhibición bacteriana aplicando cuatro concentraciones de aceite esencia de romero, laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019.....	46
Figura 5. Prueba de Tukey de los diámetros de inhibición micótica aplicando cuatro concentraciones de aceite esencia de romero, laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019.....	52
Figura 6. Muestra de <i>Candida albicans</i> previa replica, realizado en laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019	63
Figura 7. Muestra de <i>Escherichia coli</i> previa replica, realizado en el laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019	63
Figura 8. Aceite esencial de romero procesado en la Facultad de Ingeniería Química, agosto 2019	64
Figura 9. Preparación de la escala de Mc Farland, proporcionado por el laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019 en cual tiene la turbidez estándar de 0,5 UFC.	64
Figura 10. Preparación para el antibiograma realizado en laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019.....	65
Figura 11. Resultados de los antibiogramas para <i>Candida albicans</i> obtenidos en el laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019	65
Figura 12. Resultados de los antibiogramas para <i>Escherichia coli</i> obtenido en el laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, Octubre 2019.....	66
Figura 13. Concentración para evaluar la concentración mínima inhibitorio (CMI) de <i>Escherichia coli</i> ejecutado en el laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019	66

260	Figura 14. Resultados para la concentración mínima bactericida (CMB) previo resultado	
261	de la concentración mínima inhibitorio (CMI) realizado en el laboratorio de	
262	Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019	67
263	Figura 15. Concentración para evaluar la concentración mínima inhibitorio (CMI) de	
264	<i>Candida albicans</i> ejecutado en el laboratorio de Botánica y Biotecnología –	
265	FCCBB, octubre 2019	67
266	Figura 16. Resultados para la concentración mínima fungicida (CMF) previo resultado	
267	de la concentración mínima inhibitorio (CMI) obtenidos en el laboratorio de	
268	Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019	68
269	Figura 17. Resultados de los datos en análisis de varianza realizado en infoStat para	
270	<i>Escherichia coli</i>	68
271	Figura 18. Resultados de los datos en análisis de varianza realizado en infoStat para	
272	<i>Candida albicans</i>	69
273		
274		
275		
276		
277		
278		
279		
280		
281		
282		
283		
284		
285		
286		
287		
288		

ÍNDICE DE TABLAS

289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320

Tabla 1. Diseño experimental para la susceptibilidad antimicrobiana para <i>Escherichia coli</i>	35
Tabla 2. Diseño experimental para determinar la CMI del aceite esencial de romero frente a <i>Escherichia coli</i>	36
Tabla 3. Diseño experimental para determinar la CMB del aceite esencial de romero frente a <i>Escherichia coli</i>	37
Tabla 4. Diseño experimental para la susceptibilidad antimicrobiana para <i>Candida albicans</i>	40
Tabla 5. Diseño experimental para determinar la CMI del aceite esencial de romero frente a <i>Candida albicans</i>	41
Tabla 6. Diseño experimental para determinar la CMF del aceite esencial de romero frente a <i>Candida albicans</i>	41
Tabla 7 : Inhibición en porcentaje (%) antimicrobiana del aceite esencial de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) frente a <i>Escherichia coli</i> , laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, Octubre 2019.	43
Tabla 8: Concentración Mínima Inhibitoria del aceite de romero frente a <i>Escherichia coli</i> , laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, Octubre 2019.....	47
Tabla 9: Concentración Mínima Bactericida del aceite de romero frente a <i>Escherichia coli</i> , laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, Noviembre 2019. ...	48
Tabla 10. Inhibición en porcentaje (%) antimicrobiana del aceite esencial de romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>) frente a <i>Candida albicans</i> , laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, Octubre 2019.	49
Tabla 11: Concentración Mínima Inhibitoria del aceite de romero frente a <i>Cándida albicans</i> , laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, Octubre 2019.	53
Tabla 12: Concentración Mínima Fungicida del aceite de romero frente a <i>Candida albicans</i> , laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, Noviembre 2019.....	54

ÍNDICE DE ACRÓNIMOS

321

322

323 %: Porcentaje

324 °C: Grados centígrados

325 ANOVA: Analysis Of Variance

326 BaCl₂: Cloruro de bario

327 CERITS: Centro de Referencia de Infecciones de Transmisión Sexual

328 cm: Centímetro

329 CMI: Concentración mínima inhibitoria

330 CMB: Concentración mínima bactericida

331 CMF: Concentración mínima fungicida

332 CVV: Candidiasis vulvo vaginal

333 D.C.A: Diseño completamente al azar

334 DHI: Diámetro de halo de inhibición

335 H₂SO₄: Ácido sulfúrico

336 INS: Instituto Nacional de Salud

337 ITU: Infecciones de tracto urinario

338 kg: Kilogramos

339 OMS: Organización Mundial de la Salud

340 SDA: Sabouraud Agar

341 EMB: Eosin Methylene Blue Agar

342 UFC: Unidad formadora de colonia

343 VB: Vaginosis bacteriana

344 ug: microgramos

345 ul: micro litros

346

347

348

349

350

351

352

RESUMEN

353

354

355 En la presente tesis se evaluó la concentración mínima inhibitoria, la concentración
356 mínima bactericida del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” frente a
357 *Escherichia coli* y evaluar la concentración mínima inhibitoria, la concentración mínima
358 fúngica del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” frente a *Candida*
359 *albicans*. **Metodología:** La recolección de la planta se realizó en el distrito de Sicuani
360 (Departamento de Cusco), el cual se acondiciono y trasladó al laboratorio, se efectuó el
361 proceso de extracción de aceite esencial por destilación de arrastre a vapor en la
362 Facultad de Ingeniería Química. Los microorganismos procedieron de la colección de
363 cepas del Hospital Regional Manuel Nuñez Butrón y son: *Escherichia coli* y *Candida*
364 *albicans* Para la actividad antimicrobiana, las bacterias fueron transferidos en Agar
365 Sabuoraud para *Candida albicans* y EMB para *Escherichia coli*, la estandarizados por
366 Turbidimetria se realizó con la escala de 0.5 de Mc Farland. Las bacterias fueron
367 inoculadas en agar Mueller Hinton y se agregó los discos impregnados con 5 ml de
368 aceite esencial; se incubo a 37°C por 48 horas para ambos procedimientos. **Resultados:**
369 Las medidas de los halos de inhibición por aplicación del aceite esencial de romero
370 frente a *Escherichia coli*, para el control positivo (Ciprofloxacino) presento un halo de
371 inhibición de 21.30 mm, mientras la menor inhibición al 25% con (16.27 mm) y mayor
372 inhibición al 100% con (30.77 mm), para lo cual la (CMI) fue al 25% evidenciado por
373 la ausencia de crecimiento bacteriano y para la (CMB) fue al 50%, mientras que para
374 las medidas de los halos de inhibición del aceite esencial de romero frente a *Candida*
375 *albicans*, para el control positivo (Fluconazol) presento un halo de inhibición de (22.40
376 mm), mientras la menor inhibición al 50% con (20.07 mm) y mayor inhibición al 100%
377 con (31.17 mm), para lo cual (CMI) fue al 50% evidenciado la ausencia de
378 crecimiento y para la (CMF) fue al 75%, por lo cual estos datos fueron analizados
379 estadísticamente mediante pruebas de análisis de varianza múltiple de Tukey, que
380 presentó diferencia estadística significativa ($P < 0.05$). **Conclusión:** Los tratamientos al
381 100% y 75% son efectivos para la inhibición tanto para *Escherichia coli* y *Candida*
382 *albicans*.

383

384 **Palabras claves:** Antimicrobiano, agar Mueller Hinton, concentración, turbidimetría,

385

ABSTRACT

386

387

388 In this thesis the minimum inhibitory concentration, the minimum bactericidal
389 concentration of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* "rosemary" against
390 *Escherichia coli* was evaluated and to evaluate the minimum inhibitory concentration,
391 the minimum fungal concentration of the essential oil of *Rosmarinus officinalis*
392 "rosemary" against *Candida albicans*. Methodology: The collection of the plant was
393 carried out in the district of Sicuani (Department of Cusco), which was conditioned and
394 transferred to the laboratory, the essential oil extraction process was carried out by steam
395 drag distillation in the Faculty of Chemical Engineering. The microorganisms came
396 from the collection of strains of the Manuel Nuñez Butrón Regional Hospital and are:
397 *Escherichia coli* and *Candida albicans* For the antimicrobial activity, the bacteria were
398 transferred in Sabuoraud Agar for *Candida albicans* and EMB for *Escherichia coli*, the
399 standardized by Turbidimetria was performed with the 0.5 scale of Mc Farland. The
400 bacteria were inoculated in Mueller Hinton agar and the disks impregnated with 5 ml of
401 essential oil were added; It was incubated at 37 ° C for 48 hours for both procedures.
402 Results: The measures of the inhibition halos by application of rosemary essential oil
403 against *Escherichia coli*, for the positive control (Ciprofloxacin) presented an inhibition
404 halo of 21.30 mm, while the lowest inhibition at 25% with (16.27 mm) and greater
405 100% inhibition with (30.77 mm), for which the (MIC) was 25% evidenced by the
406 absence of bacterial growth and for (CMB) it was 50%, while for inhibition halos
407 measurements of the essential oil of rosemary against *Candida albicans*, for the positive
408 control (Fluconazole) I present a halo of inhibition of (22.40 mm), while the lowest
409 50% inhibition with (20.07 mm) and greater 100% inhibition with (31.17 mm), for
410 which (CMI) the absence of growth was 50% evidenced and for the (CMF) it was 75%,
411 for which these data were statistically analyzed by Tukey multiple variance analysis
412 tests, which presented statistical difference meaning goes (P <0.05). Conclusion: 100%
413 and 75% treatments are effective for inhibition for both *Escherichia coli* and *Candida*
414 *albicans*.

415

416 **Keywords:** Antimicrobial, concentration, Mueller Hinton agar, turbidimetry.

I. INTRODUCCIÓN

Se puede afirmar que el uso de las plantas medicinales nació con el hombre. Desde tiempos prehistóricos se utilizaron por ensayo error, aquellos extractos que brindaban curar enfermedades. Esta práctica médica pasaba y se perfeccionaba de generación en generación, por lo cual fue denominada medicina tradicional.

Hasta el siglo XVIII se conocieron las propiedades curativas de las plantas, su efecto sobre el organismo y su modo en el cual se empleaba, desconociendo en muchos de los casos la composición y caracterización de principios activos. Con el desarrollo de las teorías de la evolución, herencia genética, el uso del microscopio y el nacimiento de ciencias como la fitoquímica, fue posible el reconocimiento y el aislamiento de principios activos de muchas especies vegetales. La gran mayoría de los principios activos se han obtenido elaborándose en laboratorios, para su posterior uso en la preparación de medicamentos químicos. Con el paso de los años el consumo de medicamentos sintéticos se incrementó, desplazando cada vez más el uso directo de plantas medicinales alejándose así de dicha medicina.

Así mismo las plantas han cumplido un papel importante en el área terapéutica gracias a las múltiples propiedades que ellas poseen. Por esta razón en las últimas décadas ha ido tomando cada día mayor importancia del estudio y el desarrollo de técnicas analíticas que permitan la determinación e identificación de las sustancias o principios activos contenidos en especies vegetales. En la actualidad, el gran desafío para los países ricos en biodiversidad es poder vincular y convertir el conocimiento proveniente de los recursos biológicos en compuestos, procesos, métodos, herramientas o productos útiles, como parte del aprovechamiento y la explotación sostenible de la diversidad biológica en beneficio de la sociedad (Lizcano, 2008).

La composición de los aceites esenciales depende de varios factores, como el genotipo de la planta, la etapa de desarrollo de la planta y los factores ambientales que denota una baja calidad de aceite según los estándares de perfumería, pero tiene un valor interesante como aceite medicinal. A medida que aumenta la población en una región o localidad, es más difícil el acceso a servicios de salud pública, y es necesario buscar alternativas de atención primaria para suplir dicho déficit. En adición a lo anterior, se suma la

dificultad de tratamiento frente a enfermedades de tipo infeccioso que han manifestado variaciones y mutaciones imposibilitando el tratamiento, y por ello se abre una oportunidad para el uso de alternativas naturales para así contrarrestar este fenómeno ya que los productos de origen natural son complejos y estas tienen varias estrategias para combatir dichos agentes infecciosos (Ramos, 2013).

La búsqueda de mayor conocimiento sobre la actividad antimicrobiana de las plantas en el sector farmacéutico y alimentario, ha despertado el interés para evaluar las propiedades del romero (*Rosmarinus officinalis*) dados los innumerables usos en el ámbito Fito terapéutico. La especie vegetal *Rosmarinus officinalis* L. perteneciente a la familia *Lamiaceae*, y conocida popularmente como romero, es una especie originaria de la región mediterránea, rica fuente de metabolitos activos, esta planta es muy usada en la medicina tradicional por sus efectos digestivos, antiespasmódicos y carminativos, para la búsqueda de metabolitos secundarios que podrían ser usados como alternativa terapéutica frente a enfermedades infecciosas; lo cual ha conducido a que sea empleada para el tratamiento de enfermedades de tipo entérico (Castaño, 2010).

Debido a que, por el grado de contaminación que presentan, en las aguas residuales se encuentra gran cantidad de bacterias de diferentes especies y se espera encontrar también los bacteriófagos que infectan estas mismas bacterias, ya que estos últimos constituyen un control biológico para las colonias bacterianas. La presencia de bacteriófagos en aguas residuales se explica, además, por el hecho de que, en el agua dulce, que constituye su base primaria, la abundancia de bacteriófagos es de 10 a 20 veces mayor que la de la cédula hospedera (Marta *et al.*, 2011).

Escherichia coli es una bacteria que puede producir infecciones entéricas (diarrea, disentería y colitis hemorrágica) o extra intestinales (infecciones del tracto urinario, bacteriemias, meningitis, peritonitis, mastitis e infecciones pulmonares). Además de ser el patógeno oportunista más frecuentemente asociado con infecciones principalmente en la población infantil (Flores, 2016).

Sin embargo, el problema no solo es la prevalencia en *Escherichia coli* también tenemos otros ámbitos en el cual el aceite de romero puede producir una actividad antimicrobiana frente a *Candida albicans*. Se considera que solo 20% a 30% de las

mujeres que se auto medican por candida, en realidad sí la tienen. La paciente suele tener un flujo auto limitado y ella concluirá erróneamente que tiene una recurrencia mensual del problema original. Las molestias incluso podrían ser similares: flujo, prurito, eritema, etc. (Vasconez, 2016).

Diversos problemas, incluyendo estados fisiológicos, pueden mimetizarse con sintomatología clínica similar a la de las infecciones vaginales por *Candida*. Por ello, es de suma importancia que el diagnóstico sea el adecuado y la terapia evite ser polivalente. De los casos de flujo vaginal, la vaginosis bacteriana (VB) suele representar el 50% de los casos y la candidiasis vulvovaginal (CVV) el 30 a 35% de los casos. Se considera, en la mayoría de las series revisadas, la segunda causa más frecuente del síndrome de flujo vaginal (Magariños, 2005).

Con base en lo anterior en aras de buscar alternativas de aprovechamiento y conocer la presencia de principios activos en la especie de romero (*Rosmarinus officinalis*) priorizadas como potenciales dentro de dicho proyecto del cual se planteó evaluar la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales obtenidos a partir de dicha especie, frente a microorganismos patógenos *Escherichia coli* y *Candida albicans* utilizando la técnica de susceptibilidad microbiana, para determinar cuál de las concentraciones presenta mayor actividad antimicrobiana frente a los microorganismos seleccionados.

1.1.OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” frente *Escherichia coli* y *Candida albicans*.

1.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” frente a *Escherichia coli*.
- Evaluar la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima fungicida (CMF) del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” frente a *Candida albicans*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. ANTECEDENTES

Los aceites esenciales en general mostraron efecto variado sobre Gram positivos y Gram negativos (Alzamora, 2001) los cuales varios estudios realizados con el aceite esencial de romero han comprobado su efecto contra microorganismos Gram-negativos, Gram-positivos y microorganismos resistentes, estos demostraron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* frente a tres bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*; tres bacterias Gram-negativas: *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* y dos hongos: *Candida albicans* y *Aspergillus niger* (Jiang, 2011) en cambio la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *Cymbopogon citratus*, así como de una crema elaborada a partir del mismo fue evaluada y empleada mediante el método de diluciones en medio líquido el cual determinó la concentración mínima inhibitoria y mínima microbicida frente a microorganismos de interés clínico humano. El aceite mostró una notable actividad anti fúngica, superior a la que se observó con la crema, lo que justifica el uso tradicional de esta planta (Guerra Ordoñez, 2004).

Con el propósito de determinar el efecto antibacteriano del aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* sobre el *Streptococcus mutans*, el cual se realizó en las concentraciones de 5%, 25%, 50%, 75% y 100%. Se halló la CMI en aceite esencial de romero al 75% (Rocha Morales, 2016) a partir de la hidrodestilación de las hojas frescas de *Rosmarinus officinalis* se obtuvo aceite esencial con un rendimiento de 0,594 % y 0,047ml/g, junto con hidrosol de aproximadamente 100ml en las 3 horas de tratamiento. La densidad del aceite esencial de romero fue de 0,881 y 0,016 g/ml, la densidad del hidrosol de romero fue de 0,9955 y 0,00098 g/ml (Ramos, 2013) asimismo la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* (Romero) contra tres cepas bacterianas estandarizadas: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Enterobacter aerogenes* mediante (CIM) (Reyes, 2011) Los resultados de este estudio mostraron que hay actividad antibacteriana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* frente a *Enterobacter aerogenes* a una concentración mínima inhibitoria de 25 mg/ml. También mostraron inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* a una concentración mínima inhibitoria de 100 mg/ml (Bonilla et al., 2016).

La actividad antibacteriana de *Cymbopogon citratus* es evaluada para hallar la concentración mínima inhibitoria. Se encontró que la CMI fue de 0,4 %. Y los halos de inhibición de 21,8 mm y 23 mm en 80 ul/ml y 160 ul/ml del aceite esencial. Se concluyó que el aceite esencial de *Cymbopogon citratus* es un buen agente antibacteriano frente a *Streptococcus mutans* y su acción es más efectiva que el control positivo, clorhexidina 0,12 % (Borja, 2007) la actividad antimicrobiana in vitro de 3 tipos de extractos (un aceite, una tintura y una decocción) de las plantas *Origanum vulgare* L. (orégano) y *Thymus vulgaris* (tomillo), frente a: *Pseudomonas aeruginosa* Gram (-) y *Staphylococcus aureus* Gram positivo (Estrada, 2010). La CIM de la decocción de orégano fue de 50 %, la decocción de tomillo no presentó inhibición de los aislados de *M. pachydermatis*. Frente a las bacterias el mejor resultado fue el de los aceites y frente a *P. aeruginosa* la CIM del aceite de orégano fue 12 % y frente a *S. aureus* fue 1,56 %; la CIM del aceite de tomillo fue 5 % para *P. aeruginosa* y de 1,25 % para *S. aureus* (Inga & Giovanna, 2012). Por lo contrario la concentración mínima bactericida del aceite esencial de *Origanum vulgare* (orégano) frente a 71 bacterias aisladas de leche bovina, de los géneros *Streptococcus* Gram (+), *Staphylococcus* Gram (-) y *Corynebacterium* Gram (+); y 3 cepas patrón de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* concluyéndose que el aceite esencial de *Origanum vulgare* no presentó efecto para *Pseudomonas aeruginosa* Gram (-), pero se comprobó la actividad in vitro del aceite frente a las bacterias que pertenecen a los géneros: *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Flores, 2016).

El efecto de inhibición de la actividad de la glucosiltransferasa y el crecimiento bacteriano de los extractos de *Rosmarinus officinalis* (Romero), *Camelia sinensis* (Té Verde) y *Ilex paraguariensis* (Yerba Mate) sobre la actividad de la glucosiltransferasa, contra *Streptococcus mutans*. Los resultados obtenidos con el extracto alcohólico de romero fueron positivos, ya que mostraron una inhibición significativa (50 – 75 %) en concentraciones superiores a 4 mg/ml (Suárez, 2013) así mismo los resultados de la CMI en caso de *Escherichia coli* ATCC 11225 fue de 6,83 mg/ml, para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue de 9,50 mg/ml. Además, que la CMB para *Escherichia coli* ATCC 11225 fue de 7,12 mg/ml, para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue de 10,09 mg/ml en la que presento una inhibición de crecimiento bacteriano. Se concluye que el aceite esencial de romero presenta compuestos bioactivos, principalmente monoterpenos, con el efecto antimicrobiana frente a *E. coli* ATCC 11225 y *S. aureus*

ATCC 25923 (Rondón, 2013) los compuesto del romero son el ácido rosmarínico, detectado en una fracción el cual muestra ninguna actividad contra los microorganismos seleccionados. El análisis HPLC reveló la presencia de bajas cantidades de ácido ursólico y ácido oleanólico en las fracciones obtenidas. Los resultados obtenidos sugieren que la actividad antimicrobiana del extracto de las hojas de *Rosmarinus officinalis* se atribuye principalmente a la acción del ácido carnósico y el carnosol (Bernardes, 2008)

Por otro lado el aceite esencial que ejerce mayor efecto sobre las bacterias evaluadas es el de “hierba luisa”; las dos cepas de *Shigella flexnini* solo fueron sensibles al sulfametoxazol y a los aceite de hierba luisa y en menos cantidad al de eucalipto en cambio la salvia mostró efecto restringido a las dos cepas de *S. aureus* (Alzamora, 2001) por otro lado se estudiaron los efectos antimicrobianos de diez extractos y aceites de plantas medicinales frente al crecimiento de *Streptococcus mutans* los cuales se compararon con clorhexidina 30 g de diez plantas, incluyendo tomillo, menta, ajo, canela, manzanilla, hierba luisa, clavo, menta verde, salvia, romero (Rondón, 2013) los diámetros de la zona alrededor de cada disco se compararon con clorhexidina usando análisis de la prueba T. La zona inhibitoria se observó alrededor de los discos de extracto de Romero, este se encontró como una planta antimicrobiana potente, sugiriéndose más estudios para la producción de colutorios a base de plantas medicinales (Dalirsani, 2011).

Se determinó la actividad antifúngica de los aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Ocotea odorifera Vell* (Sasafrás), contra cepas de *Candida albicans* y *Candida tropicalis*, la concentración mínima inhibitoria (CMI) los resultados se observó que todas las cepas fueron sensibles al aceite esencial del *Rosmarinus officinalis* (Romero) a una CIM de 2,5 mg/ml (Purca, 2013) en cambio el uso de los datos clínicos y estadísticos muestran que el extracto de Romero aparentemente no presentó grandes resultados, no desempeñando la acción deseada en la concentración probada. Como era de esperar, el medicamento mostró mejores resultados en el control bacteriano, no descartando así la posible acción antibacteriana de la planta estudiada (Lucimari, 2012) puede que se deba al diferente patrón y grado de sensibilidad de las distintas

especies de *Candida*, y al aumento que se ha registrado del índice de resistencias a los

antifúngicos, es aconsejable la identificación de especie en las levaduras aisladas de muestras clínicas (Castro Mendez y Martín Mazuelo, 2010)

El efecto antioxidante de oleorresinas de romero es menor comparado con extractos de semillas de uva en patés de carne de cerdo cocida y posteriormente congelada a -18°C. El romero molido tiene un efecto inhibitorio sobre bacterias psicrótrofas, coliformes y *Clostridium* sp, y permite la extensión de vida útil en albóndigas de carne de pavo tratadas térmicamente, empacadas al vacío y mantenidas a 3°C (Cueto-Vigil, 2010) El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* carece de actividad antimicrobiana para 3 de las 5 cepas utilizadas. Las cepas con mayor halo de inhibición con el cloranfenicol fueron *Salmonella typhi* y *Candida albicans*, sin embargo el extracto romero resultó ser inocuo para la primera cepa y presentó un halo de inhibición de casi 2 mm (Aguilar Velasquez, Tovar Giombini, & Sanez Burrola, 1987) puede que sea debido al diferente patrón y grado de sensibilidad de las distintas especies de *Candida*, y al aumento que se ha registrado del índice de resistencias a los antifúngicos, es aconsejable la identificación de especie en las levaduras aisladas de muestras clínicas (María R. Calixto, 2006).

Se han realizado estudios sobre la actividad antibacteriana y la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de mandarina (*Citrus reticulata*). Las cepas bacterianas : *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión en agar con las concentraciones : 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%. La CMI se determinó por el método de dilución en caldo utilizando 6 concentraciones. El aceite esencial presentó actividad antibacteriana del tipo bactericida contra *B. Subtilis*, *E coli* y *L. Monocytogenes* a todas las concentraciones excepto al 1%. La CMI del aceite esencial de la mandarina para *B. subtilis* fue de 9%, para *E. coli* y *L. monocytogenes* fue de 7% (Saldarriaga, 2016). En este caso se determinó los valores de CMI en los rangos de extracto de 625 µg extracto / ml de etanol a 5,000 µg extracto / ml de etanol para Vivox 20 y desde 312.5 µg extracto /ml de etanol a 2500 µg extracto /ml de etanol para Vivox 40 en el medio se establecieron que la resistencia de las especies de *Listeria* contra extractos de Romero depende de: extracto seleccionado, la concentración seleccionada, varias especies y la tensión de *Listeria* (Rožman & Jeršek, 2009) puede que los antibióticos son agentes antimicrobianos altamente eficaces en el tratamiento y

erradicación de las infecciones bacterianas, sin embargo su efectividad se ha visto reducida debido a que las bacterias son microorganismos adaptables y capaces de desarrollar mecanismos de resistencia (Cueto-Vigil, 2010)

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. Plantas medicinales

El conocimiento de las propiedades medicinales de las plantas se basa en la observación, la experiencia y el conocimiento profundo del entorno el cual es transmitido de generación en generación y enriquecido por la integración cultural de la población nativa y migrante, este saber ha devenido en la medicina popular y la herboristería actual. Estos conocimientos, debidamente sistematizados, deben contribuir a resolver, en parte, los problemas de salud de la población menos favorecida y más alejada de la modernidad, cuyas posibilidades de curarse son, actualmente limitadas por el alto costo de los fármacos modernos (Argote *et al.*, 2017) por ello en cierta forma ha sido estudiado el efecto colerético de extractos de romero, así como su efecto hepatoprotector. La planta tiene propiedades antiinflamatorias y antiespasmódicas. En medicina popular el romero se utiliza en afecciones del tracto digestivo, como espasmolítico, colagogo, colerético y emenagogo (Romero & Rosmarinus, 1887)

Principio activos de las plantas

A nivel mundial se han realizado estudios sobre plantas medicinales logrando comprobar sus efectos analgésicos, antiinflamatorios, antibacterianos, antihemorrágicos, anti fúngicos etc. El estudio en laboratorios de las plantas ha permitido reconocer y aislar los principios activos responsables de su actividad farmacológica avalando razonablemente su utilización (Argote *et al.*, 2017), en el cual los compuestos activos con efecto antibacterianos son los Terpenoides. Diterpenos (picosalvina, carnosol, isorosmanol, rosmadial, rosmaridifenol, rosmariquinona), Triterpenos (ácidos oleanólico y ursólico, y sus 3- acetil- ésteres). Son aquellos que tienen elementos adicionales, usualmente oxígeno; se especula que involucra la ruptura de la membrana celular por los compuestos lipofílicos (Vasconez, 2016) asimismo contienen Flavonas, flavonoides y flavonol. (cirsimarina, diosmina, hesperidina, homoplantiginina,

fegopolina, nepetina y nepitrina), son sintetizados por las plantas en respuesta a infecciones microbianas, forman un complejo con las proteínas solubles y extracelulares y el complejo de la pared de la célula bacteriana, impidiendo el desarrollo de las células bacterianas.

2.2.2. Aceites esenciales

Los aceites esenciales poseen compuestos que presentan distintos niveles de actividad antibacteriana, son extraídos de diferentes frutos cítricos y plantas aromáticas, su volatilidad a temperatura ambiente, a diferencia de otros agentes antimicrobianos; los hace atractivos para su estudio y aplicación como una alternativa adecuada y natural de aditivos alimentarios (Gonzales, 2004) Los aceites esenciales son utilizados como saborizantes en la industria alimenticia, esta característica se une a su potencial saborizante, antimicrobiano y antioxidante el cual tiene un gran beneficio, por ser un producto natural y sin riesgo a la salud humana, bajo esta concepción se han realizado diversos estudios con aceites esenciales, evaluando su efecto antimicrobiano, fungicida e insecticida, con la finalidad de utilizarlos como alternativas terapéuticas contra las infecciones producidas por microorganismos resistentes a los antibióticos (Saldarriaga, 2016).

2.2.3. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales

La actividad antimicrobiana de los aceites esenciales se encuentra relacionada con la composición química, por ejemplo, frutos cítricos cuentan con un promedio de 40 compuestos, los cuales se ven influenciados por métodos específicos de cultivo, extracción y separación; los aceites esenciales de cítricos se encuentran principalmente en la cáscara de la fruta, su extracción es económicamente sostenible, ya que la cáscara constituye una pérdida para la industria de jugos de frutas; en consecuencia, el interés de estos como agentes antimicrobianos y conservantes en los alimentos abre una posible alternativa para sustituir los conservantes y antibióticos convencionales (Borboa, 2010).

2.2.4. *Rosmarinus officinalis* (Romero)

Descripción botánica

El romero es arbusto ramoso siempre verde, aromático, de tallo leñoso. Ramas nuevas cuadrangulares, de corteza grisácea cuando adulto. Hojas perennes, opuestas, lineales, verde oscuras, de haz brillante y envés blanquecino velludo. Flores azules o violeta pálido, reunidas en espigas. Florece en primavera y verano (Romero & Rosmarinus, 1887). (Figura 1)



Figura 1. Romero (*Rosmarinus officinalis*) en su hábitat natural.

Clasificación taxonómica (Romero & Rosmarinus, 1887)

Nombre común: Romero

Nombre científico: *Rosmarinus Officinalis*

Familia: Lamiaceae

Clase: Magnoliopsida

Reino: Plantae

Filo: Magnoliophyta

Especie: Officinalis

Género: Rosmarinus

Orden: Lamiales

Según Roman (2009), manifiesta que el romero (*Rosmarinus officinalis*) posee los siguientes principios activos:

- Aceite esencial (1%-2%): contiene pineno, α -pineno, camfeno, cineol 1-8 o eucaliptol (15%-30%), borneol (10%-15%), acetato de bornilo, alcanfor de romero (5%-25%), limoneno, linalol, mircerno, verbenona y un sesquiterpeno, el

β -cariofileno. Contiene ácido rosmarínico (2%-3%), denominado también ácido labiático, que es un derivado del ácido cafeico y del ácido a-hidroxi-dihidrocafeico.

- Glucósidos flavónicos: pigmentos de tipo polifenólico.
- Diterpenos (4,6%): el más interesante es la picrosalvina (carnosol) y también contiene isorosmanol, rosmadial, rosmaridifenol y rosmariquinona.
- Triterpenos (2%-4%): ácido ursólico y oleanólico, α -amirina y β -amirina.
- Alcaloides (0,33%): rosmaricina. También se han encontrado colina, taninos, saponina ácida (0,15%) y vitamina C.

2.2.5. Agente patógeno

2.2.5.1. *Escherichia coli*

Un representante de interés tanto alimentario como sanitario es la presencia de *Escherichia coli*, este microorganismo es Gram negativo, perteneciente a la familia de las enterobacterias, es el representante del grupo de los coliformes, y es constituyente de la microbiota intestinal normal de los seres humanos, por ello su clasificación familiar, sin embargo cuando se encuentra en un lugar inadecuado, es decir fuera del intestino, puede generar infecciones como lo que ocurre en las urinarias, generadas por este microorganismo, no es un microorganismo muy exigente de modo que es cultivable en un medio básico con fuentes de carbono, nitrógeno y fósforo. Está relacionado con meningitis en neonatos, con manifestaciones normales de infección en dichos pacientes, septicemia e infecciones (Carol, 2009) Se consideró importante el uso de aguas residuales para este estudio debido a su composición o naturaleza. Las aguas servidas consisten de dos componentes: un efluente líquido y un constituyente sólido en el que se asocian diferentes tipos de materiales particulados como sedimentos de residuos biológicos, lodo y otras sustancias. A este tipo de material se asocian microorganismos como bacterias, hongos y virus, los cuales tienen como sustrato los contenidos de este tipo de aguas (Gabriel, 2012)

Según (Reyes, 2011), manifiesta que el romero *Escherichia coli* posee la siguiente clasificación:

Las cepas patógenas están agrupadas en seis grupos patogénicos:

- a) *E. coli* enterotoxigénica (ECET).- Este grupo se caracteriza por ocasionar diarrea en personas que estuvieron en países en desarrollo (diarrea el viajero). Esta bacteria se caracteriza por la producción de enterotoxinas, las cuales inducen la secreción de agua y electrolitos dentro del lumen intestinal, de manera similar a *V. cholerae*. Las enterotoxinas son del tipo termo lábil (LT) y termoestable (ST), y colonizan a nivel del intestino delgado mediante adhesinas fimbriales; por lo que esta bacteria no es invasiva.
- b) *E. coli* enteroinvasiva (ECEI).- Esta bacteria causa la disentería bacilar, con un cuadro similar al provocado por *Shigella*, la cual comparte genes de virulencia con *E. coli*. ECEI puede invadir y proliferar en las células epiteliales de la mucosa del colon, llegando a matar las células. Clínicamente se caracteriza por la presencia de sangre y moco en las heces, acompañado de calambres abdominales, vómito, fiebre y malestar general en los pacientes infectados.
- c) *E. coli* enteropatógena (ECEP).- Es el grupo causante del mayor índice de casos de diarrea infantil en los países en desarrollo. Se caracteriza por la producción de la proteína intimina, una adhesina tipo no fimbrial la cual media la adhesión a la mucosa intestinal. Causa diarrea acuosa o sanguinolenta, la cual se asocia a la adhesión. Produce características histopatológicas similar a la ECEH, conocida como lesión de fijación y borramiento; la cual es esencial para una completa patogenicidad.
- d) *E. coli* enterohemorrágica (ECEH).- Las características clínicas de este grupo incluyen náuseas, dolor abdominal, diarreas, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y trombocitopenia púrpura. Producen verotoxinas las cuales son el factor de virulencia más importante.
- e) *E. coli* enteroagregativa (ECEAgg).- Este grupo se asocia con la diarrea aguda y persistente en niños. Esta bacteria no secreta enterotoxinas y se caracteriza por la producción de una estructura denominada fimbria de adherencia agregativa, la cual al adherirse a las células intestinales induce un acortamiento de las vellosidades, necrosis hemorrágica y una respuesta inflamatoria, produciendo una estimulación de la secreción mucosa manifestada por diarrea acuosa con moco y fiebre.

2.2.5.2. *Candida albicans*

Existen un promedio de 100 especies de candida entre las principales que generalmente producen infección son por *C. albicans* siguiendo en frecuencia *C. glabrata*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis*. En los ancianos está aumentando la frecuencia de *C. glabrata* en las infecciones urinarias e infecciones invasivas y se encuentra con gran frecuencia colonizada la cavidad oro faríngea de los mayores de 88 años en relación con los menores de esta edad, y, por ello, provoca con frecuencia estomatitis. El espectro clínico de las infecciones por *Candida* es muy amplio, desde infecciones cutáneas leves hasta candidiasis sistémicas severas en pacientes críticos, que arrojan una elevada mortalidad. El tratamiento de las infecciones localizadas puede realizarse con antifúngicos locales pero con frecuencia en ellas, y en las infecciones invasivas, requieren tratamiento sistémico (Barrionuevo, 1995) se manifiesta que entre los factores que inducen a presentar Candidiasis, están: la reducción de las defensas del hospedador, donde encontramos a personas portadoras del VIH, pacientes con diabetes mellitus, personas que han recibido tratamientos con radiación y quimioterapia, así como también pacientes geriátricos portadores de prótesis dentales, quienes son susceptibles al padecimiento de Candidiasis atrófica o candidiasis protética. (Valverde, 2017)

Según (Barrionuevo, 1995), **manifiesta que *Candida albicans* posee la siguiente clasificación:**

- Candidiasis cutánea: Las manifestaciones habituales son intertrigo en pliegues o región perineal y onicomicosis. Debe tratarse con fluconazol o itraconazol.
- Vulvovaginitis: Desciende su frecuencia en la edad posmenopáusica debido a la necesidad de estrógenos para la colonización por *Candida*. Los factores de riesgo para su desarrollo son diabetes mellitus, tratamiento con corticoides y antibióticos de amplio espectro. Los síntomas fundamentales son prurito, disuria, presencia de flujo vaginal y eritema. Se puede tratar con cremas u óvulos locales de nistatina, pero en las mujeres de edad avanzada con deterioro funcional o demencia la administración local puede ser más difícil, por lo que una alternativa válida es una dosis única de fluconazol. En infecciones recurrentes o falta de respuesta debe descartarse la infección por *Candida glabrata* que es resistente a fluconazol y consultar con otro especialista.
- Infección orofaríngea: La candidiasis orofaríngea se relaciona con diversos factores de riesgo, como el tratamiento con antibióticos sistémicos, corticoides o radioterapia y sequedad de mucosas en relación con enfermedades sistémicas o

fármacos. La edad avanzada en sí no es un factor de riesgo para la candidiasis orofaríngea, por lo que en ausencia de los factores comentados debe investigarse la presencia de inmunosupresión como la mediada por infección VIH. Se manifiesta por placas blanquecinas en la orofaríngea, mucosa oral y paladar. También aparece en la lengua, pero cuando hay lesiones aisladas en ésta debe hacer pensar en otras entidades como la leucoplaquia.

2.2.6. Medicamentos

2.2.6.1. Ciprofloxacino

La resistencia de *Escherichia coli* a las fluoroquinolonas – el patógeno más común involucrado en las infecciones de las vías urinarias – varía dentro de la Unión Europea. Se recomienda a los médicos prescriptores que consideren la prevalencia local de la resistencia de *Escherichia coli* a las fluoroquinolonas (Bruno, 2019), la eficacia se midió por el intervalo libre de infección. Las respuestas clínicas y microbiológicas al final de la terapia fueron variables secundarias de eficacia. Los pacientes recibieron al azar ciprofloxacina o claritromicina (500 mg dos veces al día durante 14 días). Trescientos setenta y seis pacientes con exacerbaciones agudas de bronquitis crónica se inscribieron en el estudio de los cuales 234 tenían un ABECB. La resolución clínica se observó en el 90% (89 de 99) de los receptores de ciprofloxacino y en el 82% (75 de 91) de los receptores de claritromicina para quienes se pudo evaluar la eficacia (Chodosh *et al.*, 1998).

2.2.5.2. Fluconazol

El fluconazol tiene propiedades farmacocinéticas muy favorables con una biodisponibilidad del 100%, eliminación renal en forma de fármaco activo y gran difusión tisular en los diferentes órganos y SNC (Barrionuevo, 1995) asimismo el Fluconazol puede producir un cuadro de piel y labios secos y agrietados así como alopecia reversible cuando se administra por vía oral (Castro Mendez & Martín Mazuelo, 2010) a diferencia de otros Imidazoles, su absorción oral es casi total, y no depende del pH gástrico o el estado de ayuno del paciente entre el 11 al 12% de la droga administrada se une a las proteínas plasmáticas (Dudin, 1970).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ÁREA DE ESTUDIO

La recolección de las muestras de la planta de *Rosmarinus officinalis* “Romero” se realizó en el distrito de Sicuani, de la Provincia de Canchis, ubicada en el Departamento de Cusco, durante los meses de Agosto. Se realizó la recolección de las plantas se tomó en cuenta que estén frescas, sin signo de enfermedades evidentes como pigmentos café, amarillo u oscuro en las hojas. Seguido de esto se procedió a la obtención del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* el cual se llevó a cabo en la Facultad de Ingeniería Química ubicado en la Universidad Nacional del Altiplano – Puno. Las pruebas de susceptibilidad del aceite esencial frente a las cepas de *Escherichia coli* y *Candida albicans* se realizó en el laboratorio de Botánica y Biotecnología de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad del Altiplano – Puno.

3.2. TIPO DE ESTUDIO

El proyecto se realizó de tipo experimental, el cual se manejó con controles cada uno con su respectiva prueba el cual se dividió en tres grupos:

- Un grupo de control positivo. El cual se utilizó Ciprofloxacino para *Escherichia coli* y Fluconazol para *Candida albicans*.
- Un control negativo. El cual se utilizó agua destilada para ambos casos
- En un tercer grupo. Concentraciones del aceite esencial *Rosmarinus officinalis* “Romero”

3.3. POBLACIÓN Y MUESTRA

Constituida por:

- Cepa de *Cándida albicans*: se obtuvo del CERITS (Centro de Referencia de Infecciones de Transmisión Sexual), del Hospital Regional “Manuel Núñez Butrón – Puno”, procedente de un muestra clínica de orina.

- Cepa de *Escherichia coli*: cepas de referencia de *Escherichia coli* se obtuvo del Departamento de Patología Clínica del Hospital Regional “Manuel Núñez Butrón – Puno”.
- Aceite esencial *Rosmarinus officinalis* “Romero”

3.4. OBTENCIÓN DEL ACEITE

Método de destilación por arrastre a vapor de agua

Fundamento: Consiste en calentar la planta de la cual se trabajara hasta que sus componentes más volátiles pasen a la fase de vapor a continuación este se enfría el vapor para recuperar dichos componentes en forma líquida por medio de la condensación así formara el aceite esencial. (Dominguez, 2009) (Figura 2)

Procedimiento.

- Para la obtención de aceite de romero se preparó manualmente tanto las hojas como los tallos el cual tuvo un peso de dos kilos esta se inserta en un hidrodestilador, el principio de la destilación en agua es llevar a estado de ebullición una suspensión acuosa del material vegetal aromático, de tal manera que los vapores generados puedan ser condensados y colectados. El aceite, que es inmiscible en agua, se separa posteriormente. En la destilación con agua el material vegetal siempre debe encontrarse en contacto con el agua, si el calentamiento del equipo es con fuego directo, el agua presente en la cámara extractora debe ser suficiente y permanente para llevar a cabo toda la destilación a fin de evitar el sobrecalentamiento y carbonización del material vegetal.
- El proceso terminó cuando el volumen del aceite esencial acumulado en la bureta no varió con el tiempo. A continuación, el aceite fue retirado de la bureta y almacenado en frascos acaramelados estériles con tapa, luego los frascos se rotularon el cual fue cubierto con papel aluminio para proteger de la luz ambiente y se mantuvo en refrigeración para su conservación.



Figura 2. El extractor de los aceites esenciales consiste en un equipo de destilación discontinua marca Elettronica Veneta, el cual está conformado por un generador de vapor SCT04/EV, una cámara de extracción en el cual se colocará el material vegetal, un condensador el cual utiliza agua fría de la red pública, un vaso de florentino recolector y una pera de decantación para separar el aceite del agua.

Preparación de Medios de Cultivo

Preparación de medio de cultivo para *Escherichia coli*

Agar EMB: Es un medio diferencial y selectivo para aislar y detectar enterobacterias en muestras mixtas. Los colorantes de anilina (eosina y azul de metileno) inhiben el desarrollo de bacterias Gram positivas y a las Gram negativas exigentes. También se combinan precipitando a pH ácido, actuando como indicadores de producción de ácidos. Este medio incluye lactosa, lo que permite la diferenciación de los fermentadores de lactosa de los no fermentadores. Los fermentadores fuertes de lactosa, sobre todo *Escherichia coli*, producen colonias de color negro verdoso con brillo metálico. Los

productores más débiles de ácidos, forman colonias de color violeta. Los no fermentadores de lactosa forman colonias transparentes. **(Hernández, 2009)**

Preparación de medio de cultivo para *Candida albicans*

Agar Glucosa De Sabouraud: Este medio fue desarrollado para el cultivo de hongos patógenos, especialmente de los productores de micosis superficiales. En la actualidad se recomienda sólo para el aislamiento primario de dermatófitos, con el agregado de cicloheximida y cloranfenicol. El pH final (alrededor de 5,6) es mucho menor que el de la mayoría de los medios y tiende a eliminar el crecimiento bacteriano. Los subcultivos de los hongos aislados originalmente en BHI pueden presentar una morfología más uniforme en agar glucosa de Sabouraud, por esto es útil para la identificación de hongos una vez aislados. **(Hernández, 2009)**

Preparación de medio de cultivo para realizar el antibiograma para *Escherichia coli* y *Candida albicans*

Agar Mueller Hinton: Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Por su composición, ha sido recomendado por el para ser utilizado en forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido, debido a que presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente y una gran cantidad de datos adicionales que han sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo. **(Britania, 2016)**

3.5. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

La distribución de las unidades experimentales para el estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “Romero” frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans*, correspondió a un diseño completamente al azar (D.C.A.), la disposición de unidades experimentales fue de la siguiente manera:

3.6. METODOLOGÍA

3.6.1. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” frente a *Escherichia coli*.

a. Frecuencia de muestreo

Se utilizó cepas de *Escherichia coli*, provenientes del Centro de Referencia de Infección de Transmisión Sexual (CERITS) del mismo hospital. El transporte y bioseguridad se tomaron muy en cuenta ya que estas son sustancias infecciosas, por tanto se aplicó el sistema de embalaje triple. Este sistema de embalaje consto de tres componentes: el recipiente primario, el embalaje secundario y el embalaje externo. El recipiente primario que contiene la muestra debe ser estanco, a prueba de fugas y estar debidamente etiquetado en relación con el contenido, estas fueron envueltas en material absorbente suficiente para absorber todo el líquido en caso de rotura o fuga, posterior a ello de transporte en una caja de tecnopor bien hermetizada, hasta llegar al laboratorio.

Luego se procedió a cultivarlo en agar Eosina azul de metileno (EMB) el cual formara colonias producen colonias de color negro verdoso con brillo metálico los más débiles de ácidos, forman colonias de color violeta. Los no fermentadores de lactosa forman colonias transparentes (Hernández, 2009) (figura 7)

b. Descripción detallada de los procedimientos, equipos y materiales

Preparación del Inoculo

Las cepas *Escherichia* fueron inoculadas en medio de cultivo EMB (Eosina, Azul de Metileno) el cual producen colonias de color negro verdoso con brillo metálico los más débiles de ácidos, forman colonias de color violeta. (Figura 6) Los no fermentadores de lactosa forman colonias transparentes luego de haber sido cultivadas respectivamente con 24 horas este se llega a seleccionar y recoger con asa de Kolle, 5 a 6 colonias, aisladas y con similar morfología, teniendo el cuidado de no recoger parte del medio de cultivo.

Con estas colonias se preparó una suspensión en 5 ml en solución salina. Luego la suspensión bacteriana fue incubada a 35°C hasta alcanzar similitud a la turbidez del estándar. Finalmente se realizó el ajuste a la turbidez del inóculo por comparación visual, agregando solución salina, hasta una turbidez equivalente al tubo 0.5 del estándar de Mc Farland, para ello, se observaron los tubos contra un fondo blanco con una línea negra como contraste(figura 9).

Preparación de medio de cultivo para realizar el antibiograma para *Escherichia coli*

Agar Mueller Hinton: Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Por su composición, ha sido recomendado por el para ser utilizado en forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido, debido a que presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente y una gran cantidad de datos adicionales que han sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo. **(Britania, 2016)**

Método Difusión con Discos (Ramon-Pardo, Sati, & Galas, 2018)

Se sumergió un aplicador de algodón estéril (hisopo), dentro de la suspensión del microorganismo en estudio se colocó el aplicador por encima del nivel del contenido del tubo y rotar contra las paredes del mismo para remover el exceso del inóculo luego se siembra el inóculo uniformemente sobre la superficie del medio con el aplicador el cual se hará la siembra en tres direcciones se tiene evitar inóculos muy concentrados o muy diluidos. Posterior a esto se debe permitir que la superficie del medio sembrado se seque en un promedio de 5 a 10 min , manteniendo la caja con la tapa cerrada(Figura 3).

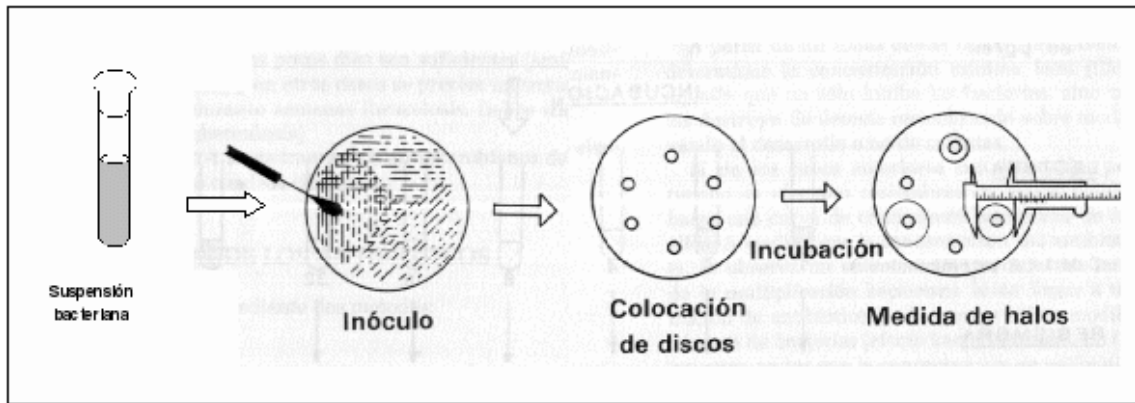


Figura 3. Esquema de la técnica de antibiograma por difusión en agar

Tabla 1 Diseño experimental para la susceptibilidad antimicrobiana para *Escherichia coli*

concentración de Aceite esencial (%)	Medida de halo de inhibición (mm)		
	R1	R2	R3
100	1	1	1
75	1	1	1
50	1	1	1
25	1	1	1
control (+) CIPROFLOXACINO	1	1	1
control (-) agua destilada	1	1	1

Para determinar las medidas de halo de inhibición se trabajó con 18 unidades experimentales, conformado por 3 repeticiones para cada dosis utilizada, en el control positivo se utilizara el medicamento Ciprofloxacino y en el control negativo el disco será embebido con agua destilada cada unidad experimental estuvo constituida por determinados porcentajes de aceite esencial (100 %, 75 %, 50%, 25%) (Tabla 1) Preparación de discos con Aceite Esencial de *Rosmarinus officinalis* “Romero”

Tratamiento 1 (100%): 100 µl de aceite esencial

Tratamiento 2 (75%): 75 µl de aceite esencial

Tratamiento 3 (50%): 50 µl de aceite esencial

Tratamiento 4 (25%): 25 µl de aceite esencial

Tratamiento 5 (12.5%): 12.5 µl de aceite esencial

Tratamiento control positivo (TC): Ciprofloxacino (5 µg)

METODO DE DILUCION EN CALDO

Método de macro dilución.

En el método de macro dilución se emplea por cada combinación microorganismo antimicrobiano una batería de tubos. Habitualmente se prepara la batería de tubos con 1ml de medio estéril sin antimicrobiano. Al primero de ellos se añade 1 ml de la solución inicial del tubo de antimicrobiano hasta conseguir la concentración más alta a estudiar (teniendo en cuenta que este primer paso supone la dilución a la mitad de la solución madre, y que una vez inoculados los tubos, con 1 ml de inóculo, se diluirá nuevamente la concentración de antimicrobiano a la mitad). Tras mezclar adecuadamente, se pasa 1 ml al siguiente tubo; el proceso se repite tantas veces como diluciones se quieran estudiar, eliminando del último tubo de la serie 1 ml de medio con antimicrobiano, con objeto de mantener el volumen final de 1 ml. Para cada paso de dilución se debe emplear una pipeta diferente. La serie de tubos se completa con uno de control sin antimicrobiano que solamente tiene 1 ml de caldo (Cantón, Gómez-lus, & Rodríguez-avial, 2017)

Caldo Mueller Hinton: Medio nutritivo que favorece el crecimiento de diversos microorganismos. Se utiliza para determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI) de los microorganismos frente a los antimicrobianos. Al igual que su presentación en forma de agar, el caldo Mueller Hinton presenta buena reproducibilidad de los resultados lote a lote y tiene un bajo contenido de inhibidores especialmente para sulfamidas, trimetoprima y tetraciclinas.

Tabla 2. Diseño experimental para determinar la CMI del aceite esencial de romero frente a *Escherichia coli*

Crecimiento de *Escherichia coli*

Concentración de aceite esencial (%)	R1	R2	R3	total
100%	1	1	1	3
75%	1	1	1	3
50%	1	1	1	3
25%	1	1	1	3
12.50%	1	1	1	3
6.25%	1	1	1	3
Control negativo	1	1	1	3

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria por el método de dilución en caldo se trabajó con 21 unidades experimentales, conformado por 3 repeticiones para cada dosis utilizada, además se utilizó un control negativo (caldo Mueller Hinton sin aceite esencial), cada unidad experimental estuvo constituida por determinados porcentajes de aceite esencial (100 %, 75 %, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%) (Tabla 2)

Terminado el primer procedimiento para la concentración mínima inhibitoria se procede a determina la concentración mínima bactericida el cual se realizara en placas las cuales se inocularan con los resultados de los tubos que se obtuvieron en la primera parte y se verificara los resultados pasado las 24 horas.

Tabla 3. Diseño experimental para determinar la CMB del aceite esencial de romero frente a *Escherichia coli*

Concentración de aceite esencial (%)	N° de repeticiones	UFC		
		R1	R2	R3
100	3	1	1	1
75	3	1	1	1
50	3	1	1	1

Para determinar la Concentración Mínima Bactericida se trabajó con 9 unidades experimentales, conformado por 3 repeticiones para cada dosis utilizada, cada unidad experimental estuvo constituida por determinados porcentajes de aceite esencial (100 %, 75 %, 50%) previo a la determinación de concentración mínima inhibitoria. (Tabla 3)

c. Variables que se analizaron

Variable independiente: *Escherichia coli*

Variable dependiente: Concentración de Aceite Esencial de Romero

d. Aplicación de prueba estadística

Los resultados obtenidos de los porcentajes de aceite esencial de romero frente a *Escherichia coli*, fueron tabulados en un diseño experimental completamente aleatorio y consistió de tres tratamientos y tres repeticiones. Los datos obtenidos fueron sujetos a análisis de varianza y prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$), los análisis se realizaron el software estadístico Infostat versión estudiantil.

3.6.2. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), concentración mínima bactericida (CMB) del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” frente a *Candida albicans*.

a. Frecuencia de muestreo

Se utilizó cepas de *Candida albicans*, provenientes del Centro de Referencia de Infección de Transmisión Sexual (CERITS) del mismo hospital. El transporte y bioseguridad se tomaron muy en cuenta ya que estas son sustancias infecciosas, por tanto se aplicó el sistema de embalaje triple. Este sistema de embalaje consto de tres componentes: el recipiente primario, el embalaje secundario y el embalaje externo. El recipiente primario que contiene la muestra debe ser estanco, a prueba de fugas y estar debidamente etiquetado en relación con el contenido, estas fueron envueltas en material absorbente suficiente para absorber todo el líquido en caso de rotura o fuga, posterior a ello de transporte en una caja de tecnopor bien hermetizada, hasta llegar al laboratorio.

Luego se procedió a cultivarlo en agar Sabouraud el cual presentan un color verde de claro a mediano Es posible que otras especies de levaduras produzcan su color natural (crema) o presenten un color rosa o malva de claro a oscuro (figura 7) (Plated, 2003).

a. Descripción detallada de los procedimientos, equipos y materiales

Preparación del Inoculo

Las cepas de *Candida albicans* el cual fueron cultivadas anteriormente en agar Sabouraud con 24 horas, de este se llega a seleccionar y recoger con asa de Kolle, 5 a 6 colonias, aisladas y con similar morfología, teniendo el cuidado de no recoger parte del medio de cultivo.

Con estas colonias se preparó una suspensión en 5 ml en solución salina. Luego la suspensión bacteriana fue incubada a 35°C hasta alcanzar similitud a la turbidez del estándar. Finalmente se realizó el ajuste a la turbidez del inóculo por comparación visual, agregando solución salina, hasta una turbidez equivalente al tubo 0.5 del estándar de Mc Farland, para ello, se observaron los tubos contra un fondo blanco con una línea negra como contraste(figura 9)

Preparación de medio de cultivo para realizar el antibiograma para *Candida albicans*

Agar Mueller Hinton: Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Por su composición, ha sido recomendado por el para ser utilizado en forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido, debido a que presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente y una gran cantidad de datos adicionales que han sido evaluados y avalados usando este medio de cultivo (Britania, 2016).

Método Difusión con Discos (Ramon-Pardo et al., 2018)

Se sumergió un aplicador de algodón estéril (hisopo), dentro de la suspensión del microorganismo en estudio se colocó el aplicador por encima del nivel del contenido del tubo y rotar contra las paredes del mismo para remover el exceso del inóculo luego se siembra el inóculo uniformemente sobre la superficie del medio con el aplicador el cual se hará la siembra en tres direcciones se tiene evitar inóculos muy concentrados o muy diluidos. Posterior a esto se debe permitir que la superficie del medio sembrado se seque en un promedio de 5 a 10 min , manteniendo la caja con la tapa cerrada.

Preparación de discos con Aceite Esencial de *Rosmarinus officinalis* “Romero”

Tratamiento 1 (100%): 100 µl de aceite esencial

Tratamiento 2 (75%): 75 µl de aceite esencial

Tratamiento 3 (50%): 50 µl de aceite esencial

Tratamiento 4 (25%): 25 µl de aceite esencial

Tratamiento 5 (12.5%): 12.5 µl de aceite esencial

Tratamiento control positivo (TC): fluconazol (25 µg)

Tabla 4. Diseño experimental para la susceptibilidad antimicrobiana para *Candida albicans*

Concentración de aceite esencial (%)	Medida de halo de inhibición (mm)		
	R1	R2	R3
100	1	1	1
75	1	1	1
50	1	1	1
25	1	1	1
control (+) Fluconazol	1	1	1
control (-) agua destilada	1	1	1

Para determinar las medidas de halo de inhibición se trabajó con 18 unidades experimentales, conformado por 3 repeticiones para cada dosis utilizada, en el control positivo se utilizara el medicamento fluconazol y en el control negativo el disco será embebido con agua destilada cada unidad experimental estuvo constituida por determinados porcentajes de aceite esencial (100 %, 75 %, 50%, 25%) (Tabla 4).

MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO

Método de macro dilución.

En el método de macro dilución se emplea por cada combinación microorganismo antimicrobiano una batería de tubos. Habitualmente se prepara la batería de tubos con 1ml de medio estéril sin antimicrobiano. Al primero de ellos se añade 1 ml de la solución inicial del tubo de antimicrobiano hasta conseguir la concentración más alta a estudiar (teniendo en cuenta que este primer paso supone la dilución a la mitad de la solución madre, y que una vez inoculados los tubos, con 1 ml de inóculo, se diluirá nuevamente la concentración de antimicrobiano a la mitad). Tras mezclar adecuadamente, se pasa 1 ml al siguiente tubo; el proceso se repite tantas veces como diluciones se quieran estudiar, eliminando del último tubo de la serie 1 ml de medio con antimicrobiano, con objeto de mantener el volumen final de 1 ml. Para cada paso de dilución se debe emplear una pipeta diferente. La serie de tubos se completa con uno de control sin antimicrobiano que solamente tiene 1 ml de caldo ((Cantón et al., 2017)

Tabla 5. Diseño experimental para determinar la CMI del aceite esencial de romero frente a *Candida albicans*

Crecimiento de *Candida albicans*

Concentración de aceite esencial (%)	R1	R2	R3	total
100%	1	1	1	3
75%	1	1	1	3
50%	1	1	1	3
25%	1	1	1	3
Control negativo	1	1	1	3

Para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria por el método de dilución en caldo se trabajó con 15 unidades experimentales, conformado por 3 repeticiones para cada dosis utilizada, además se utilizó un control negativo (caldo Mueller Hinton sin aceite esencial), cada unidad experimental estuvo constituida por determinados porcentajes de aceite esencial (100 %, 75 %, 50%, 25%) (Tabla 5).

Terminado el primer procedimiento para la concentración mínima inhibitoria se procede a determina la concentración mínima bactericida el cual se realizara en placas las cuales se inocularan con los resultados de los tubos que se obtuvieron en la primera parte y se verificara los resultados pasado las 24 horas.

Tabla 6. Diseño experimental para determinar la CMF del aceite esencial de romero frente a *Candida albicans*

Concentración de aceite esencial (%)	N° de repeticiones	UFC		
		R1	R2	R3
100	3	1	1	1
75	3	1	1	1
50	3	1	1	1

Para determinar la Concentración Mínima Fungicida se trabajó con 9 unidades experimentales, conformado por 3 repeticiones para cada dosis utilizada, cada unidad experimental estuvo constituida por determinados porcentajes de aceite

esencial (100 %, 75 %, 50%) previo a la determinación de concentración mínima inhibitoria. (Tabla 6)

b. Variables que se analizaron

Variable independiente: *Candida albicans*

Variable dependiente: Concentración de aceite esencial de Romero

c. Aplicación de prueba estadística

Los resultados obtenidos de los porcentajes de aceite esencial de romero frente a *Candida albicans*, fueron tabulados en un diseño experimental completamente aleatorio y consistió de tres tratamientos y tres repeticiones. Los datos obtenidos fueron sujetos a análisis de varianza y prueba de medias de Tukey ($P \leq 0.05$), los análisis se realizaron el software estadístico Infostat versión estudiantil.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI), CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DEL ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* “ROMERO” FRENTE a *Escherichia coli*

Inhibición en porcentaje (%) antimicrobiana del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) frente a *Escherichia coli*

La inhibición porcentual del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre *Escherichia coli*, para el control positivo (Ciprofloxacino) se tuvo un valor promedio de 21.3 mm, para la primera concentración al 100 % se obtuvo un promedio de 30.77 mm, los cuales oscilaron entre 30.7 mm y 30.9 mm; para la segunda concentración al 75% se obtuvo un promedio de 25.23 mm los cuales oscilaron entre 24.6 mm y 25.6 mm; para la tercera concentración al 50% se obtuvo un promedio de 21.83 mm las cuales oscilaron entre 21.2 mm y 22.2 mm; para la última concentración al 25% se obtuvo un promedio de 16.27 mm cuales oscilaron entre 15.8 mm y 16.7 mm. (Tabla 7 y Figura 12)

Tabla 7. Inhibición en porcentaje (%) antimicrobiana del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) frente a *Escherichia coli*, laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, Octubre 2019.

Medida de halo de inhibición					
(mm)					
Concentración de aceite esencial (%)	R1	R2	R3	Prom	C. V. (%)
100	30.7	30.9	30.7	30.77	0.38
75	25.6	25.5	24.6	25.23	2.18
50	21.5	22.2	21.8	21.83	1.61
25	16.7	15.8	16.3	16.27	2.77
control (+) CIPROFLOXACINO	20.1	22.5	21.3	21.30	5.63
control (-) ALCOHOLO AL 96%	0	0	0	0.00	0.00

Dónde: R = repetición; prom = promedio; C.V. = Coeficiente de Variación

Los valores de las medidas de los halos de inhibición por aplicación del aceite esencial de romero frente a *Escherichia coli*, se evidencia que el control positivo (Ciprofloxacino) presentó un halo de inhibición de 21.30 mm, mientras que la menor formación de halo de inhibición fue la de 25% con 16.27 mm y la mayor inhibición fue al 100% con 30.77 mm. Los halos de inhibición bacteriana obtenida por Ciprofloxacino de 5 ug y las cuatro concentraciones presentaron diferencia estadística significativa ($F = 965.56$; $gl = 5$; $P < 0.001$), siendo mayor el efecto inhibitorio a la concentración de 100% de aceite esencial de romero; mientras que los halos de inhibición del aceite esencial de romero al 50% y el antibacteriano Ciprofloxacino no presentaron diferencia estadística significativa (Anexo 1 y Figura 4). Todos los tratamientos experimentados fueron superior al control negativo (alcohol 96 %)

En la investigación de Purca (2013), la concentración del aceite de romero de 25 ul (25%) determinó el mayor diámetro de halo de inhibición con mediciones de 24 mm y el menor de 9.5 mm con un promedio de 16.27 mm de halo de inhibición, asimismo, la concentración del aceite de romero de 50 ul (50%) originó el mayor diámetro de halo de inhibición con 29 mm, el menor con 12.5 mm y con un promedio de 20.75 mm de halo de inhibición; para la concentración del aceite de romero de 75 ul (75%) se observa el mayor diámetro de halo de inhibición mide 32 mm y el menor 15 mm con un promedio de 23.5 mm de halo de inhibición, estos resultados presentaron similitud con el presente proyecto a excepción en la concentración de 25 ul (25%).

El aceite esencial de hojas de romero (*R. officinalis*) exhibió un amplio espectro de acción antimicrobiana tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativas. La inhibición del crecimiento de *E. coli* se alcanzó a una concentración de 4096 ppm, mientras que para *S. sonnei* y *S. typhimurium* fue a 512 ppm. Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Celikel y Kavas, (2008) quienes demostraron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de hojas de *R. officinalis* contra varias cepas de *E. coli*, con halos de inhibición entre 18 mm y 21 mm con un promedio de 19.5 mm.

El aceite esencial de romero, también mostró una apreciable actividad antibacteriana contra cepas de *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. enteritidis* y *S. sonnei*, con halos de

inhibición entre 19.8 mm y 25 mm, con un promedio de 22.4 mm para las cepas evaluadas, pero sin haber determinado las correspondientes CIM (Biljana, 2007). Sin embargo, los resultados de este estudio no coinciden con los reportados por Bernarda y Majda Guzed, (2009) quienes observaron que las bacterias Gram positivas (*B. cereus* y *S. aureus*) fueron más sensibles que las Gram negativas (*C. jejuni* y *Salmonella infantis*) a la acción inhibitoria de extractos de *Rosmarinus officinalis*; en otro caso determinaron la actividad antimicrobiana y antiadherente del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) a diluciones que varían de: 1:1 a 1:512 y clorhexidina al 0.12 %, contra cepas estandarizadas de: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus sanguis* y *Lactobacillus casei*; los resultados demostraron que todas la cepas fueron sensibles al extracto de romero, excepto *Streptococcus mitis*. Los halos de inhibición formados varían de 11 mm a 18 mm con un promedio de 14.5 mm de halo de inhibición. En las diluciones que van de 1:1 a 1:4; mientras que con la clorhexidina al 0.12 % halos de inhibición fueron de 10 mm a 24 mm con un promedio de 17 mm de halo de inhibición (Estomatología, 2017)

Se puede observar las barras el cual ejemplifica la Tabla 9, en este caso tenemos que el tratamiento al 100% (A) y el tratamiento al 75% (B) existe diferencia estadística, en cambio entre el tratamiento al 50% (C) y el control positivo (Ciprofloxacino) (C) no existe diferencia estadística así mismo el tratamiento al 25% (D) y el control negativo (alcohol 96%) presentaron un gran diferencia estadística (Figura 4 y Figura 17)

Teniendo en cuenta la interpretación de cada medicamento en este caso Ciprofloxacino que fue utilizado para el control positivo según (Sacsquispe Contreras y Velásquez Pomar, 2002) indica los diámetros de halo de inhibición que presenta el Ciprofloxacino en los cuales podemos encontrar a comparación con los tratamientos 100%, 75%, 50 % de aceite esencial de romero y el medicamento Ciprofloxacino se encuentran dentro del rango de sensible (S) lo que indicaría una inhibición satisfactoria, el tratamiento al 25% de aceite esencial de romero se encuentra dentro del rango de intermedio (I) lo que indicaría una inhibición intermedia según dicho medicamento , en cambio el control negativo (alcoholo 96%) se encuentra dentro del rango de resistente (R) lo que indicaría una baja probabilidad de eficacia en tratamiento para dicha bacteria .

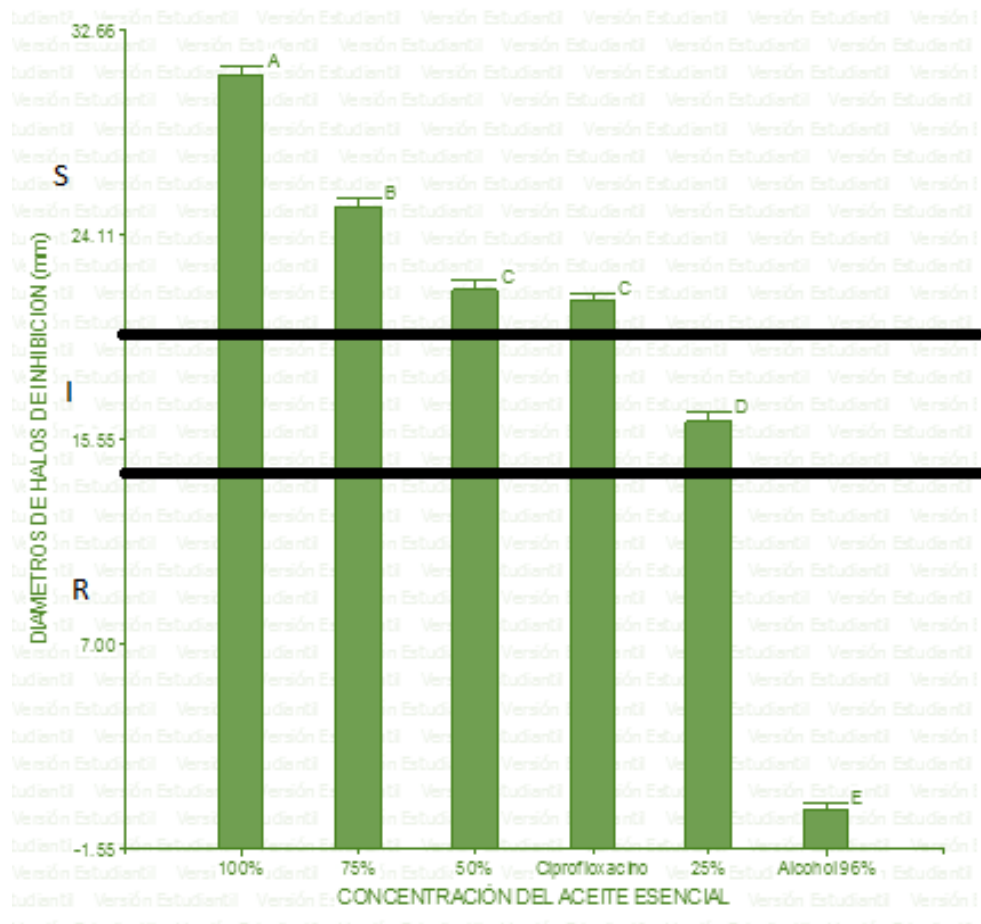


Figura 4. Prueba de Tukey de los diámetros de inhibición bacteriana aplicando cuatro concentraciones de aceite esencia de romero, laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019.

Concentración mínima inhibitoria por método de dilución de caldo

El crecimiento de *Escherichia coli* frente a las diferentes concentraciones de aceite esencial de romero (*Rossmarinus officinalis*) resultaron que la concentración mínima inhibitoria en todas las concentraciones fue al 25% evidenciado por la ausencia de crecimiento bacteriano. En los resultados de 3 repeticiones se observa que en el rango de concentración del aceite de 12.5% y 6.25% presentó crecimiento de UFC (unidades formadoras de colonias) de la bacteria *Escherichia coli*, es decir estas concentraciones no fueron las suficientes para inhibir el crecimiento de dicha bacteria, mientras que las dosis de 25% hasta 100% presenta una evidencia del crecimiento de la bacteria por la turbidez que observa (Figura 13 y Tabla 8)

Tabla 8: Concentración Mínima Inhibitoria del aceite de romero frente a *Escherichia coli*, laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, Octubre 2019.

Crecimiento de <i>Escherichia coli</i>				
Concentración de aceite esencial (%)	R1	R2	R3	CMI
100%	N	N	N	
75%	N	N	N	
50%	N	N	N	
25%	N	N	N	25%
12.50%	P	P	P	
6.25%	P	P	P	

En la investigación la evaluación de la CMI del aceite esencial de *Petroselinum crispum* (Milli) “perejil” se demostró actividad significativa frente a *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 100 y 50% y para *Pseudomonas aeruginosa* a la concentración de 100%; teniendo de poca a ninguna actividad frente a *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* a diferencia que el aceite esencial de “matico” extraído tiene escasa actividad bacteriana sobre *E. coli* Gauch y Marques-da-Silva, (2014) asimismo la concentración mínima inhibitoria (CMI) del aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.) Frente a EPEC, “*in vitro*” fue de 2.5 %. Se determinó además que el efecto de la inhibición comparativo porcentual del aceite esencial de menta frente a *Escherichia coli* enteropatógena respecto al control positivo tetraciclina (Jhonny, 2017) mientras que en la evaluación de la actividad antimicrobiana sobre *Porphyromonas gingivalis* frente al aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* y el metronidazol se mostró, respectivamente; donde se observa que la CMI obtenida para metronidazol y el aceite esencial fue de 0.071 ug/ml y 1000 µg/ml, respectivamente; con un coeficiente de variación de 7% y un $p \leq 0.0001$ que rechaza la hipótesis nula de que todos los tratamientos eran semejantes (Hussain, 2010), igualmente evaluaron la concentración inhibitoria mínima del aceite esencial sobre la cepa *E. coli* ATCC 25158 y determinaron una CIM de 0.6 ml/100 ml (Celikel & Kavas, 2008).

El análisis HPLC reveló la presencia de bajas cantidades de ácido ursólico y ácido oleanólico en la cual las fracciones obtenidas con resultados obtenidos sugieren que la actividad antimicrobiana del extracto de las hojas de *Rosmarinus officinalis* se atribuye principalmente a la acción del ácido carnósico y el carnosol (Bernardes, 2008).

CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

Previa lectura de la Concentración mínima inhibitoria, a partir del tubo que no se observó crecimiento bacteriano (Inhibición del crecimiento), se contaron 4 tubos que no presentaron turbidez. De cada tubo seleccionado se extrajo 0.1 ml para realizar la técnica de siembra por superficie en placas con agar Mueller Hinton.

La concentración mínima bactericida del aceite esencial *Rosmarinus officinalis* “romero” sobre *Escherichia coli* fue al 50%, en razón de que se observó crecimiento bacteriano a concentraciones de aceite esencial hasta el 25% y a partir del 50% al 100% de concentración de aceite esencial, no se determinó crecimiento bacteriano alguno (Tabla 9 y Figura 15).

Tabla 9: Concentración Mínima Bactericida del aceite de romero frente a *Escherichia coli*, laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, Noviembre 2019.

Concentración de aceite esencial (%)	N° de repeticiones	UFC			CMB
		R1	R2	R3	
100	3	0	0	0	
75	3	0	0	0	
50	3	0	0	0	50%
25	3	2	1	2	

A comparación con los resultados presentados por (Zúñiga, 2016), este autor observa que para *Escherichia coli* no hubo crecimiento bacteriano en las tres primeras placas que corresponden a concentraciones de 25%, 50% y 100% con la única diferencia de que en la presente investigación no presentó crecimiento en el tratamiento del 100%, 75% y 50% de aceite esencial, el cual muestra una pequeña diferencia de una concentración al 25%.

Puede que sea su actividad biosida así se encuentran en plantas como el romero con diferentes bondades y varios efectos como antiinflamatorios, astringentes, antiespasmódicos además del efecto bactericida. El romero contiene más de 40 principios antibacterianos y más de 20 antivíricos, en su composición se encuentran, terpenoides, flavonoides, ácidos fenólicos, pequeñas cantidades de alcaloide rosmaricina y un 2% de aceite esencial, las propiedades antimicrobianas del romero han presentado interés en el campo alimentario y farmacéutico (Argote *et al.*, 2017). El aceite esencial es un aceite intenso, estimulante. Tiene propiedades analgésicas, antisépticas, antidiarreicos, antirreumáticas, antiespasmódicas, es un estimulante

circulatorio, sudorífico, cicatrizante, hepático y tonificante. En dosis altas puede ser toxico (Estrada, 2010)

4.2. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI), CONCENTRACIÓN MÍNIMA FÚNGICA (CMF) DEL ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* “ROMERO” FRENTE A *Candida albicans*.

Inhibición en porcentaje (%) antimicrobiana del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) frente a *Cándida albicans*

La inhibición porcentual del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) sobre *cándida albicans*, para el control positivo (fluconazol) se tuvo un valor promedio de 22.4 mm los cuales oscilaron entre 22.3 mm y 22.5 mm, para la primera concentración al 100% se obtuvo un promedio de 31.17 mm los cuales oscilaron entre 30.8 mm y 31.5; para segunda concentración al 75% se obtuvo un promedio de 23.93 mm los cuales oscilaron entre 23.6 mm y 24.1 mm; para la tercera concentración al 50% se obtuvo un promedio de 20.07 mm las cuales oscilaron entre 19.8 mm y 20.3 mm; para la última concentración al 25% se obtuvo un promedio de 0 mm ya que esta no hubo inhibición. El coeficiente de variabilidad menor fue para el tratamiento positivo (Tabla 10 y Figura 11)

Tabla 10. Inhibición en porcentaje (%) antimicrobiana del aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinalis*) frente a *Candida albicans*, laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, Octubre 2019.

Concentración de aceite esencial (%)	Medida de halo de inhibición (mm)			Prom	C. V. (%)
	R1	R2	R3		
100	31.5	30.8	31.2	31.17	1.13
75	24.1	23.6	24.1	23.93	1.21
50	19.8	20.3	20.1	20.07	1.25
25	0	0	0	0.00	0.00
control (+)	22.3	22.5	22.4	22.40	0.45
FLUCONAZOL					
control (-) agua destilada	0	0	0	0.00	0.00

Se observa para los valores de las medidas de los halos de inhibición por aplicación del aceite esencial de romero frente a *Candida albicans*, se evidencia que el control positivo (fluconazol) presento un halo de inhibición de 22.40 mm, mientras que la menor formación de halo de inhibición fue la de 50% con 20.07 mm y en una mayor inhibición fue en un 100% con (31.17 mm). Los halos de inhibición micótica obtenida por Fluconazol 25 ug) y las cuatro concentraciones presentaron diferencia estadística significativa ($F=11083.55$; $gl=5$; $P<0.001$), siendo mayor a una concentración de 100% de aceite esencia de romero con un promedio de halo de inhibición de 31.17 mm, mientras que a una concentración del 25% del aceite esencial fue similar al control negativo (Anexo 2 y Figura 5).

Según (Gauch & Marques-da-Silva, 2014) el aceite esencial de orégano al 100 % tuvo un promedio en los halos de inhibición de 56.25 mm y 3.40 mm; el aceite esencial de orégano al 50 % tuvo un promedio de 23.67 mm y 1.94 mm; el aceite esencial de menta al 100 % tuvo un promedio de 39.46 mm y 0.42 mm; el aceite esencial de menta al 50 % tuvo un promedio de 12.82 mm y 0,66 mm; el aceite esencial de hierba luisa al 90 % con un promedio de 76.15 mm y 0.42 mm; el aceite esencial de hierba luisa al 50% con un promedio de 19.59 mm y 0.29 mm; y con nistatina con un promedio de 13.21 mm y 0.98 mm. Al comparar las concentraciones al 100% del aceite esencial de *Mentha piperita* (menta) y *Origanum vulgare* (orégano), y al 90% de *Cymbopogon citratus* (hierba luisa), se observó que tienen diferencias estadísticamente significativa con un $p < 0.001$. Sin embargo (Churata-Oroya et al., 2016) experimento con diferentes concentraciones de aceite esencial de *Citrus paradisi* “toronja” al 25%, 12.5%, 6.25%, 3.13% y 1.56% el cual presentaron un halo de inhibición promedio de 12.6 mm, 10.3 mm, 7.8 mm, 6.8 mm y 6.3 mm respectivamente, mientras que al 0,78 % y 0,39 % no presentaron actividad antifúngica.

En cambio (Noel Martell, 2017) trabajó con medicamentos el cual obtuvo como resultado los halos de inhibición grupos tratados con 20µg fluconazol con un promedio de 6 mm, 40µg fluconazol con un promedio de 11.64 mm y con el tratamiento de 2ul de aceite de orégano con un promedio de 81.71 mm y tratamiento conjunto con un promedio de 84.98 mm de halo de inhibición las cuales muestran diferencias significativas ($p < 0.001$).

Para *Candida albicans* se evaluaron los efectos anti fúngico del extracto de *Rosmarinus officinalis* (romero) contra levaduras y se comparó con clorhexidina al 0.12 % que utilizaron como control positivo se observó que la inhibición alrededor de los discos de extracto de romero fue 11.5 mm el que más se aproxima al de la clorhexidina que fue de 14.6 mm, estos halos de inhibición coinciden con los de nuestro estudio ya que en el caso del aceite el halo más grande fue de 15.2 mm, por lo que estamos de acuerdo con este autor en cuanto a resultados obtenidos (Roman, 2009)

Teniendo en cuenta la interpretación de cada medicamento en este caso Fluconazol que fue utilizado para el control positivo según (Sacsquispe Contreras & Velásquez Pomar, 2002) indica los diámetros de halo de inhibición que presenta el Fluconazol en los cuales podemos encontrar a comparación con los tratamientos 100%, 75%, 50% de aceite esencial de romero y el medicamento Fluconazol se encuentran dentro del rango de sensible (S) lo que indicaría una inhibición satisfactoria, el tratamiento al 25% de aceite esencial de romero y el control negativo (alcohol 96%) se encuentra dentro del rango de resistente (R) lo que indicaría una baja probabilidad de eficacia en tratamiento para dicha microorganismo (figura 5 y Tabla 10)

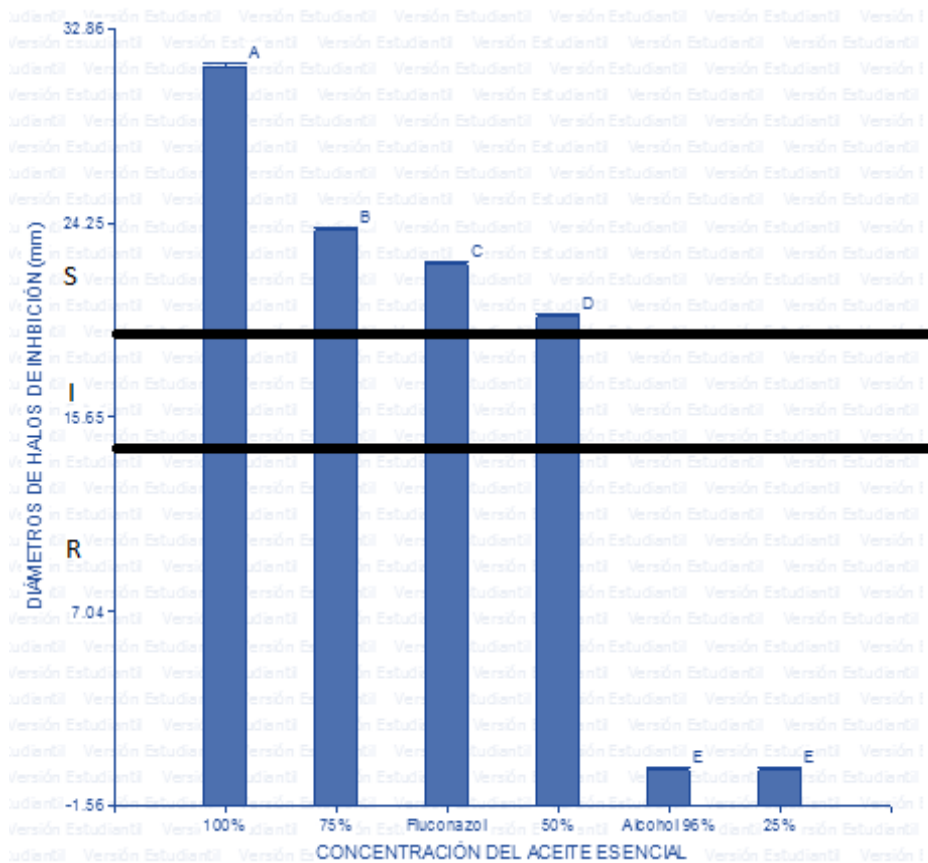


Figura 5. Prueba de Tukey de los diámetros de inhibición micótica aplicando cuatro concentraciones de aceite esencia de romero, laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019

De la prueba de Normalidad de Shapiro-Wilk los valores de significación son superiores a 0,05 (95% de confiabilidad), luego se acepta H_0 , esto es las muestras provienen de poblaciones con distribución Normal, por tanto para realizar las comparaciones se lo hace con pruebas paramétricas: ANOVA según (Valverde, 2017) el cual comprobaría la teoría de dicho proyecto en cambio (Churata-Oroya et al., 2016) realizó la prueba de Kruskal Wallis y se determinó que existe diferencia estadísticamente significativa $p < 0.05$ de promedios entre las concentraciones.

Concentración mínima inhibitoria por método de dilución de caldo

Se observa los resultados del crecimiento de *Candida albicans* frente a las diferentes concentraciones de aceite esencial de romero (*Rosmarinus officinales*) se estableció que la concentración mínima inhibitoria en todas las concentraciones fue a un

50% evidenciado por la ausencia de crecimiento bacteriano. En los resultados de 3 repeticiones se observa que en el rango de concentración del aceite de 25% y 12.5% presentó crecimiento de UFC (unidades formadoras de colonias) de *Candida albicans*, es decir estas concentraciones no fueron las suficientes para inhibir el crecimiento de dicha bacteria, mientras que las dosis de 50% a 100% presenta una evidencia de la ausencia de *Candida albicans* por la falta de turbidez (Tabla 11 y Figura 15).

Tabla 11: Concentración Mínima Inhibitoria del aceite de romero frente a *Cándida albicans*, laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, Octubre 2019.

Crecimiento de <i>Candida albicans</i>				
Concentración de aceite esencial (%)	R1	R2	R3	CMI
100%	N	N	N	
75%	N	N	N	
50%	N	N	N	50%
25%	P	P	P	
12.50%	P	P	P	

Teniendo los datos se puede observar la respuesta de cada especie frente a los 2 antifúngicos que se evaluaron, mediante el intervalo de valores de CMI y los valores de la moda, CMI(50) y CMI(90) expresados en $\mu\text{g/ml}$ (Cueto-Vigil, 2010) el cual la menor concentración empleada de anfotericina B ($0.125 \mu\text{g/ml}$) fue suficiente para inhibir 50 % de todas las cepas (Barrionuevo, 1995), mientras que la CMI₉₀ fue de $0,25 \mu\text{g/ml}$ (Cueto-Vigil, 2010). Las especies con un intervalo más amplio fueron *C. krusei* ($0.125-2 \mu\text{g/ml}$) dado por un aislamiento con CMI igual a $2 \mu\text{g/ml}$ y *C. albicans* ($0,125-1 \mu\text{g/ml}$) con un aislamiento de CMI igual a $1 \mu\text{g/ml}$. El valor de la moda para todas las especies fue de $0.125 \mu\text{g/ml}$ (Gauch & Marques-da-Silva, 2014).

Según (Churata-Oroya et al., 2016) la concentración mínima inhibitoria promedio para *Candida albicans* fue de 6.25 % a lo contrario con el presente trabajo que la concentración mínima inhibitoria fue al 50 %. El aceite esencial de romero presenta propiedades antimicrobiales contra una variedad de agentes patógenos, posiblemente debido al alto contenido de 1,8-cineol (Estrada, 2010)

CONCENTRACIÓN MÍNIMA FUNGICIDA (CMF)

Previa lectura de la Concentración mínima inhibitoria, a partir del tubo que no se observó crecimiento fungicida (Inhibición del crecimiento), se contaron 3 tubos que no presentaron turbidez. De cada tubo seleccionado se extrajo 0.1 ml para realizar la técnica de siembra por superficie en placas con agar Mueller Hinton.

Se determinó los rangos de la concentración mínima bactericida del aceite esencial *Rosmarinus officinalis* “romero” se tomó en cuenta el procedimiento previo a esta la cual fue concentración mínima inhibitoria (CMI) el cual se tomó en cuenta los tubos en la que no habría presencia bacteriana a simple vista y estas se volvieron a cultivar en agar Mueller Hinton como resultado de ello, se consideró la CMB, a la placa que no presento crecimiento bacteriano, teniendo la menor concentración de aceite el cual fue de 75 % (Tabla 12 y Figura 16)

Tabla 12: Concentración Mínima Fungicida del aceite de romero frente a *Candida albicans*, laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, Noviembre 2019.

Concentración de aceite esencial (%)	N° de repeticiones	UFC			CMB
		R1	R2	R3	
100	3	0	0	0	
75	3	0	0	0	75%
50	3	17	15	24	

Dada la Concentración Mínima Fungicida (CMF) en esta investigación de (Zapata Miranda, 2017) fue la de 25mg/ml claro esta luego de realizar el replique de los tubos a la placa, donde el crecimiento no se dio en la concentración indicada, estos resultados se presentaron en las tres repeticiones realizadas al igual que la concentración mínima fungicida (CMF) del aceite esencial de menta (*Mentha piperita*) frente a *Candida*

albicans, “in vitro” fue 2.5 %. Se determinó además que el efecto de la inhibición comparativo porcentual del aceite esencial de menta frente a *Candida albicans* (Jhonny, 2017) .

Por otro lado, el presente autor no dice que varios fármacos, incluyendo compuestos de azol, terbinafina y ciclopiroxolamina son particularmente útiles en el tratamiento anti fúngico. Sin embargo en nuestro estudio el Fluconazol que fue nuestro medio control no genero halos de inhibición (Miguel et al., 2007) caso contrario al presente trabajo que si realizo un halo de inhibición. *Rosmarinus officinalis* tiene efecto sobre el factor de virulencia de hongos primarios (es decir, el tubo germinal). Este trabajo coincide con nuestros resultados ya que el efecto fúngico del aceite no solo destruye la membrana sino que también impide que la *Candida albicans* se vuelva patógena Gauch y Marques-da-Silva, (2014). En cuanto al uso del aceite esencial, en concentraciones elevadas puede ser tóxico para el sistema nervioso y asi provocar convulsiones. Por lo cual, no se recomienda el uso durante períodos de tiempo prolongados o a dosis mayores a las recomendadas se debe tener especial cuidado cuando se usa en niños, la esencia de romero puede causar dermatitis y eritema en personas hipersensibles Estrada (2010).

V. CONCLUSIONES

1. El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” presenta actividad antimicrobiana frente *Escherichia coli* formando así cada uno halos de inhibición en diferentes concentraciones asimismo resulto efectiva la concentración al 100%, incluso para el menor porcentaje que fue el de 25% el cual presentó un halo de inhibición mínimo de 16.27mm. Para la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Escherichia coli* por método de dilución en caldo se pudo determinar que el aceite de romero no presento turbidez a una concentración del 25%, asimismo se evaluó la concentración mínima bactericida (CMB) el cual no hubo presencia de UFC en una concentración al 50%.
2. El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” presenta actividad antimicrobiana frente *Candida albicans* formando así cada uno halos de inhibición en diferentes concentraciones asimismo resulto efectiva la concentración al 100% incluso el para el menor porcentaje de halo de inhibición fue al 50 % con 20.07mm, Para la concentración mínima inhibitoria (CMI) de *Candida albicans* por método de dilución en caldo se pudo determinar que el aceite de romero no presento turbidez a un concentración al 50%, asimismo se evaluó la concentración mínima fungicida (CMF) el cual no hubo presencia de UFC en una concentración al 75%.

VI. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar la concentración mínima inhibitoria menor al 12.5 % de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” para así verificar si presenta un grado de eficacia.
2. Determinar la concentración mínima bactericida y fúngica tanto especies bacterianas y fúngicas frente a *Rosmarinus officinalis* “romero ya que tuvo un favorable resultado.
3. Conociendo la actividad inhibitoria del aceite de romero se debe realizar un seguimiento con la investigación mediante la elaboración de un fitofármaco capaz de poseer propiedades antisépticas contra enfermedades infecciosas.
4. Se recomienda que para el material biológico trabajar con microorganismos ATCC específicamente

VII. REFERENCIAS

- Aguilar Velasquez, M. A., Tovar Giombini, D. A., & Sanéz Burrola, A. (1987). *Evaluación antimicrobiana Rosmarinus officinalis en cepas de tracto digestivo*. 1–7.
- Alzamora, L. (2001). *Medicina Tradicional en el Perú : Actividad Antimicrobiana in vitro de los Aceites Esenciales Extraídos de Algunas Plantas Aromáticas*.
- Argote, F., Suarez Montenegro, Z., Tobar Delgado, M., Pérez Alvarez, J., Hurtado, A., & Delgado Ospina, J. (2017). Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en staphylococcus aureus y escherichia coli. *Bioteología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial: BSAA*, 15(2), 52–60.
[https://doi.org/10.18684/bsaa\(v15\)ediciónespecialn2.578](https://doi.org/10.18684/bsaa(v15)ediciónespecialn2.578)
- Barrionuevo, D. (1995). *Presencia de Candida albicans y su relación con los valores de CD4+ en pacientes con infección por VIH*. 116.
- Bernarda , Guzed ; MAJDA, H. K. (2009). Actividad antimicrobiana y antioxidante in vitro de formulaciones comerciales de extracto de romero. *Journal of Food Protection*.
- Bernardes, W. ; et al. . (2008). *Ácido Carnósico : Um Diterpeno Isolado De Rosmarinus Officinalis Com Potencial Antibacteriano frente a Bactérias Bucais*. (Ic), 50308.
- Biljana, B. (2007). Propiedades antimicrobianas y antioxidantes de los aceites esenciales de romero y salvia (Rosmarinus officinalis L. y Salvia officinalis L., Lamiaceae). *American Chemical Society*.
- Bonilla, D. M., Mendoza, Y., Moncada, C. E., Murcia, O., Calle, J., & Nerio, L. (2016). *Effect of essential oil of Rosmarinus officinalis on Porphyromonas*. 45(2), 275–287.
- Borboa, J. ; et al. (2010). Evaluación de la Actividad Antibacteriana In Vitro de Aceites Esenciales contra Clavibacter michiganensis subespecie michiganensis (Vol. 12).
- Borja, J. (2007). *Actividad Antibacteriana y Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de Cymbopogon citratus frente al Streptococcus mutans in vitro*.
- Britania. (2016). Mueller hinton agar. *HiMedia Laboratories*, 3. Retrieved from <http://himedialabs.com/TD/M173.pdf>
- Bruno, L. (2019). CIPROFLOXACINO. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (Enfermedad, Vol. 53, pp. 1689–1699).
<https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Cantón, R., Gómez-lus, M. L., & Rodríguez-avial, C. (2017). OMS | La OMS publica la

- lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos.
Who. Retrieved from
<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>
- Carol, B. (2009). *Enfermedades Infecciosas en Pediatría* (Panamericana, Ed.). Madrid-España: PANAMERICANA.
- Castaño. (2010). *Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de Rosmarinus officinalis L. sobre algunas bacterias de interés alimentario*.
- Castro Mendez, C., & Martín Mazuelo, E. (2010). Diagnostico de la infección fúngica por levaduras del género *Candida*: *Candida dubliniensis*. *Control Calidad SEIMC*, 1–10.
- Celikel, N., & Kavas, G. (2008). Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech Journal of Food Sciences*, 26(3), 174–181. <https://doi.org/10.17221/1603-cjfs>
- Chodosh, S., Schreurs, A., Siami, G., Barkman, Jr., H. W., Shan, A. A., Moesker, H., ... Group, the B. S. (1998). Efficacy of Oral Ciprofloxacin vs. Clarithromycin for Treatment of Acute Bacterial Exacerbations of Chronic Bronchitis. *Clinical Infectious Diseases*, 27(4), 730–768. <https://doi.org/10.1086/514934>
- Churata-Oroya, D. E., Ramos-Perfecto, D., Moromi-Nakata, H., Martínez-Cadillo, E., Castro-Luna, A., & Garcia-de-la-Guarda, R. (2016). Efecto antifúngico del *Citrus paradisi* “toronja” sobre cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con estomatitis subprotésica. *Revista Estomatológica Herediana*, 26(2), 78. <https://doi.org/10.20453/reh.v26i2.2869>
- Cueto-Vigil, M. (2010). In Vitro Evaluation of Probiotic Potential of Lactic Bacteria Acid Isolated From Coastal Serum. *Actualidades Biológicas*, 32(93), 129–138.
- Dalirsani. (2011). In Vitro Comparison of the Antimicrobial Activity of Ten Herbal Extracts Against *Streptococcus mutans* with Chlorhexidine. *Journal of Applied Sciences*.
- Dominguez, X. (2009). Destilación por arrastre de vapor, características, ventajas y aplicaciones. *Química Orgánica*, (1311), 8. Retrieved from <http://organica1.org/1311/1311pdf10.pdf>
- Dudin, V. ; et al. (1970). The effect of cyclic loads on the elasticity and inelasticity of concretes. *Hydrotechnical Construction*, 4(5), 420–422. <https://doi.org/10.1007/BF02376139>

- Estomatología, E. D. E. (2017). *Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de Rosmarinus officinalis (romero) sobre Enterococcus faecalis ATCC 29212*.
- Estrada, S. (2010). Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*). *Tesis de Grado*, 87.
- Flores, K. (2016). *Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica*.
- Gabriel, A. ; et al. (2012). Técnica para aislamiento de bacteriófagos específicos para *E.coli* DH5 α a partir de aguas residuales. *Revista MVZ Cordoba*, 17(1), 2852–2860. <https://doi.org/10.21897/rmvz.253>
- Gauch, L. ; et al. , & Marques-da-Silva, S. H. (2014). Effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil on germ tube formation by *Candida albicans* isolated from denture wearers. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 47(3), 389–391. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0137-2013>
- Gonzales, A. (2004). Obtención De Aceites Esenciales y Extractos Etanolicos de Plantas del Amazonas (Vol. 2004). Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cbdv.200490137/abstract>
- Guerra Ordoñez, M. et a. (2004). Actividad antimicrobiana del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus*. *Rev Cubana Plant Med.*
- Hernández, A. M. (2009). Microbiología clínica. *Universidad Europea de Madrid*.
- Hussain, A. (2010). Aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*: actividades antiproliferativas, antioxidantes y antibacterianas. *Brazilian Journal of Microbiology*.
- Inga, M., & Giovanna, G. (2012). *Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de Mentha piperita (menta), Origanum vulgare (orégano) y Cymbopogon citratus (hierba luisa) sobre Streptococcus mutans ATCC 25175, Lactobacillus acidophilus ATCC 10746 y Candida albicans ATCC 90028*.
- Jhonny, Z. (2017). *ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA “in vitro” DEL ACEITE ESENCIAL DE MENTA (Mentha piperita L.) FRENTE A Escherichia coli ENTEROPATÓGENA (EPEC)*.
- Jiang, Y. (2011). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Enviromental Toxicology and Pharmacology*.
- Lizcano, A. (2008). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales*.
- Lucimari, T. (2012). *Avaliação do uso do Extrato de Alecrim de Jardim (Rosmarinus*

- officinalis* Linn) no controle do Biofilme Dental.
- Magariños, M. (2005). *Infección orofaríngea*. (4), 443–448.
- María R. Calixto. (2006). Plantas medicinales utilizadas en odontología. *Kiru*, 3(Parte I), 80–85.
- Marta, D., Bastos, E., Filipe, I. L., Schuch, D., Dra, I., Prestes, L. D. S., ... Mello, B. De. (2011). *Actividad antimicrobiana de aceite esencial de Origanum vulgare L. ante bacterias aisladas en leche de bovino Antimicrobial action of Origanum vulgare L. essential oil against bacteria isolated from bovine milk*. 16(3), 260–266.
- Miguel, M. G., Guerrero, C., Rodrigues, H., Brito, J., Duarte, F., Venancio, F., & Tavares, R. (2007). Essential oils of *Rosmarinus officinalis* L., effect of harvesting dates, growing media and fertilizers. *EEESD '07: Proceedings of the 3rd IASME/WSEAS International Conference on Energy, Environment, Ecosystems and Sustainable Development*, (April 1997), 65–70.
- Noel Martell, C. E. (2017). “ *Efecto Sinergico In Vitro del Fluconazol Y El Aceite Esencial De Origanum vulgare frente a Candida albicans .*” 1–41.
- Plated, R. (2003). INSTRUCTIONS FOR USE – BD □ Sabouraud GC Agar / CHROMagar □ Candida Medium (Biplate) INTENDED USE. *Sabouraudia*, (June), 1–5.
- Purca, T. (2013). *Efectividad antibacteriana " in vitro " del extracto etanólico de Rosmarinus officinalis (romero) sobre flora salival*.
- Ramon-Pardo, P., Sati, H., & Galas, M. (2018). “One health” approach in the actions to address antimicrobial resistance from a Latin American standpoint. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 35(1), 103–109.
<https://doi.org/10.17843/rpmesp.2018.351.3605>
- Ramos, M. (2013). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de aceites esenciales e hidrosoles de Rosmarinus officinalis y Taraxacum officinale frente a microorganismos patógenos*.
- Reyes, S. (2011). *Escherichia coli*, Universidad Veracruzana. 14. Retrieved from <https://www.uv.mx/personal/sbonilla/files/2011/06/Escherichia-coli-I.pdf>
- Rocha Morales, R. M. (2016). Efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial del *rosmarinus officinalis* (romero) sobre el *streptococcus mutans* atcc 25175. *Universidad Nacional de Trujillo*. Retrieved from <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/7525>

- Roman, R. (2009). *Pincipios activos del romero*. 81–84.
- Romero, R., & Rosmarinus, L. (1887). *Hábitat natural*. 175–176.
- Rondón, R. (2013). *Evaluación antimicrobiana in vitro del aceite esencial de Rosmarinus officinalis L. “romero” frente a bacterias patógenas Grampositivas y Gramnegativas*. 113.
- Rožman, T., & Jeršek, B. (2009). Antimicrobial activity of rosemary extracts (Rosmarinus officinalis L.) against different species of Listeria. *Acta Agriculturae Slovenica*, 93(1), 51–58. <https://doi.org/10.2478/v10014-009-0007-z>
- Sacsquispe Contreras, R. E., & Velásquez Pomar, J. (2002). *Manual de procedimientos anual para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Organismo Público Descentralizado de Sector Salud*. Retrieved from http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual_sensibilidad_2.pdf
- Saldarriaga, A. (2016). *Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida del aceite esencial de Citrus sinensis (Naranja) variedad Tangelo en el crecimiento de Staphylococcus aureus y de Escherichia coli*. 57.
- Suárez, I. de M. S. R. (2013). *Actividad antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de Rosmarinus officinalis (romero) sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con bolsa periodontal Isabel de María San Román Suárez*.
- Valverde, P. (2017). *Efectividad antimicótica del aceite de oregano de l provincias de Chimborazo Y Santa Elena al 100 % De concentracion sobre Candida albicans*.
- Vasconez, G. (2016). *Efecto anti fúngico “in vitro” de aceite esencial y extracto alcoholico de Rosmarinus officinalis “Romero” sobre Candida albicans cepa ATCC 10231*.
- Zapata Miranda, E. (2017). “Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica ‘in vitro’ del extracto hidro-alcoholico de Cestrum hediondinum Dun. ‘Hierba santa’ en bacterias patógenas gram negativas, gram positivas y hongos.” *Universidad Nacional de San Agustín*. Retrieved from <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/4531>
- Zúñiga, J. S. H. (2016). *Efecto bactericida de desinfectantes sobre cepas de Escherichia coli y Listeria innocua en superficies de uso en la Industria Alimentaria*. 54. Retrieved from <http://repositorio.uchile.cl/bitstream/handle/2250/142693/Efecto-bactericida-de-desinfectantes-sobre-cepas-de-Escherichia-coli-y-Listeria-innocua.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

VIII. ANEXOS

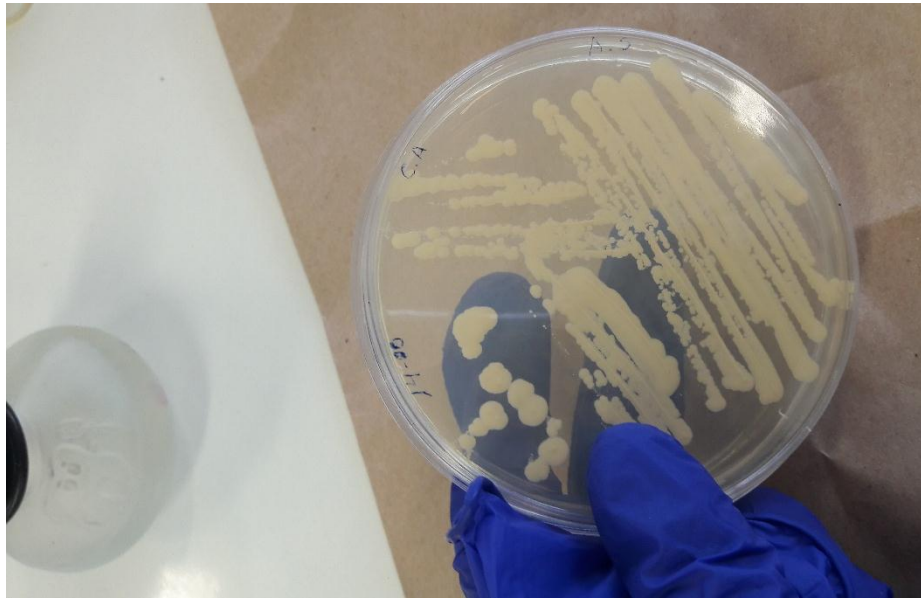


Figura 6. Muestra de *Candida albicans* previa replica, realizado en laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019

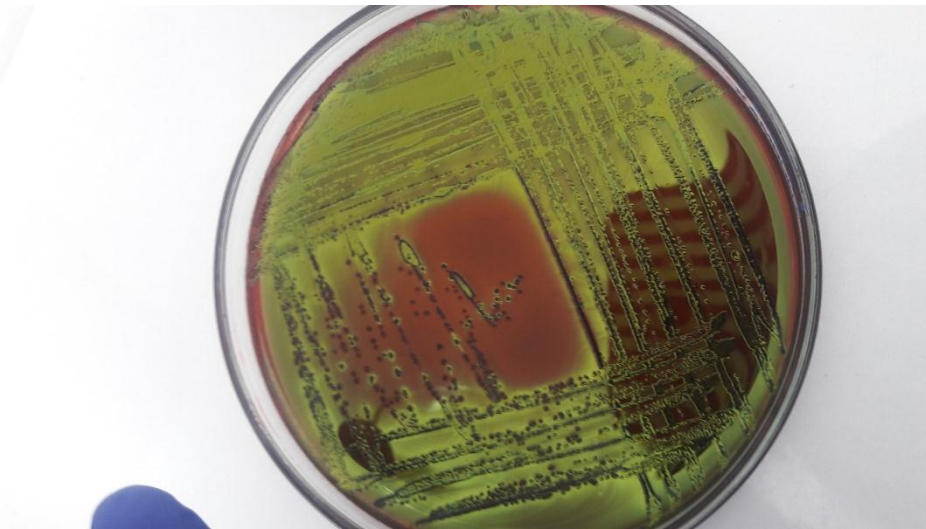


Figura 7. Muestra de *Escherichia coli* previa replica, realizado en el laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019



Figura 8. Aceite esencial de romero procesado en la Facultad de Ingeniería Química, agosto 2019

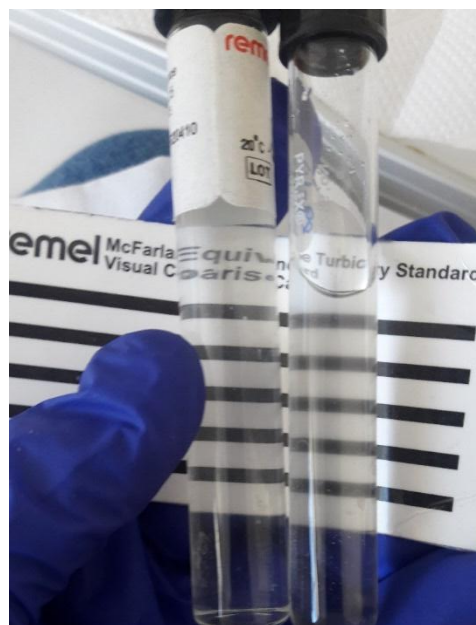


Figura 9. Preparación de la escala de Mc Farland, proporcionado por el laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019 en cual tiene la turbidez estándar de 0.5 UFC.



Figura 10. Preparación para el antibiograma realizado en laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019

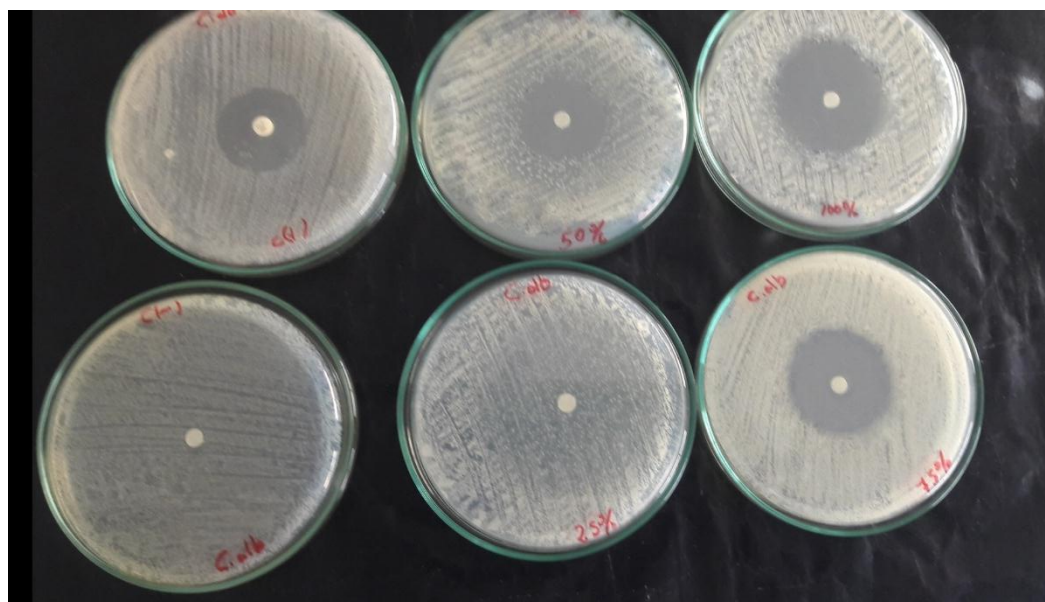


Figura 11. Resultados de los antibiogramas para *Candida albicans* obtenidos en el laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019

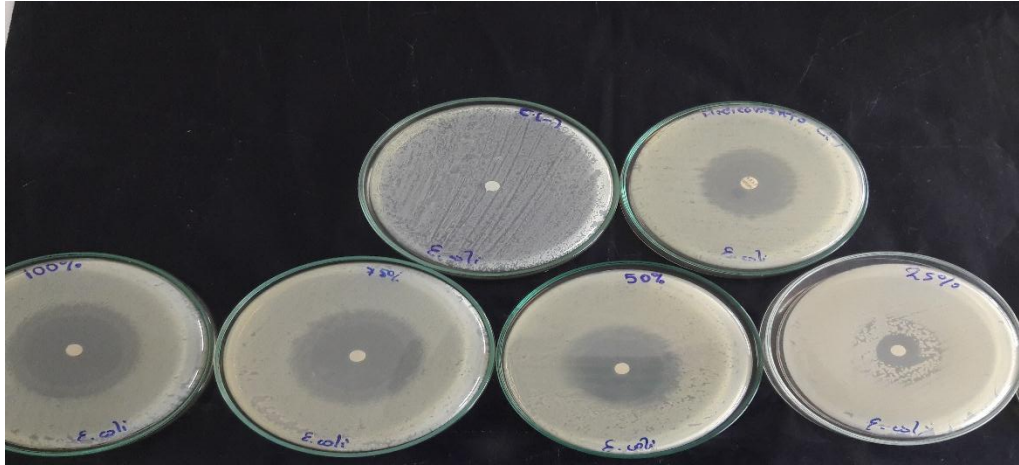


Figura 12. Resultados de los antibiogramas para *Escherichia coli* obtenido en el laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, Octubre 2019



Figura 13. Concentración para evaluar la concentración mínima inhibitorio (CMI) de *Escherichia coli* ejecutado en el laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019

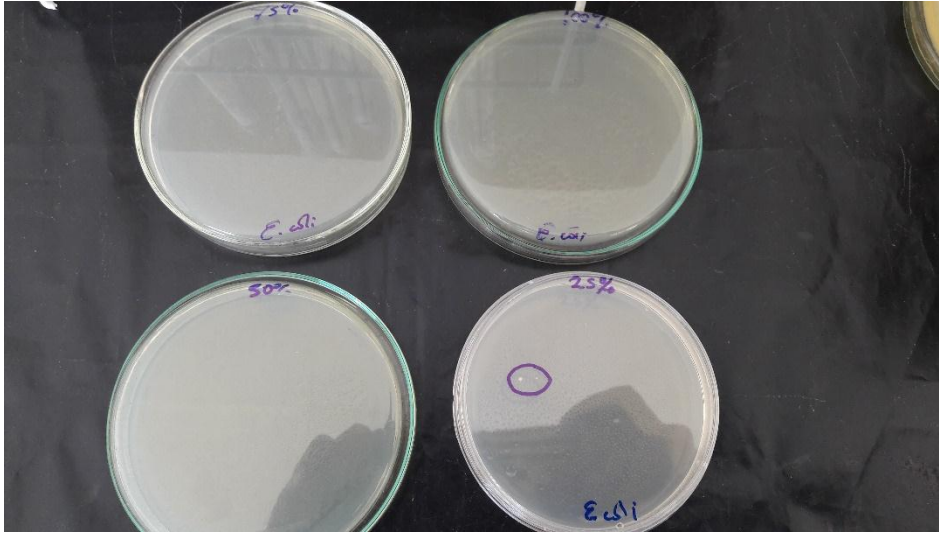


Figura 14. Resultados para la concentración mínima bactericida (CMB) previo resultado de la concentración mínima inhibitorio (CMI) realizado en el laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019

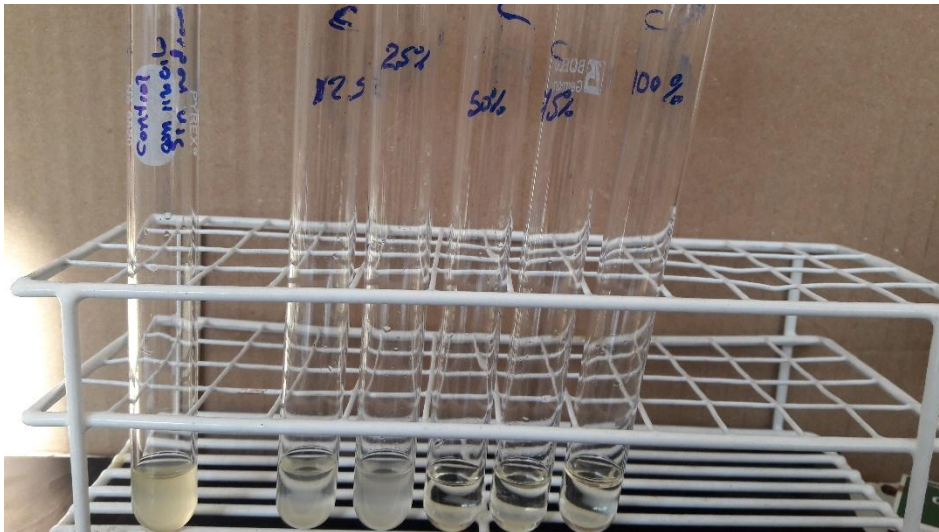


Figura 15. Concentración para evaluar la concentración mínima inhibitorio (CMI) de *Candida albicans* ejecutado en el laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019



Figura 16. Resultados para la concentración mínima fungicida (CMF) previo resultado de la concentración mínima inhibitorio (CMI) obtenidos en el laboratorio de Botánica y Biotecnología – FCCBB, octubre 2019

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Halos	18	1.00	1.00	3.06

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1676.31	5	335.26	965.56	<0.0001
Concentración	1676.31	5	335.26	965.56	<0.0001
Error	4.17	12	0.35		
Total	1680.48	17			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=1.61606

Error: 0.3472 gl: 12

Concentración	Medias	n	E.E.	
100%	30.77	3	0.34	A
75%	25.23	3	0.34	B
50%	21.83	3	0.34	C
Ciprofloxacino	21.30	3	0.34	C
25%	16.27	3	0.34	D
Alcohol 96%	0.00	3	0.34	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Figura 17. Resultados de los datos en análisis de varianza realizado en infoStat para *Escherichia coli*

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Halos	2	18	1.00	1.33

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

	F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		2586.16	5	517.23	11083.55	<0.0001
Concentración	2	2586.16	5	517.23	11083.55	<0.0001
Error		0.56	12	0.05		
Total		2586.72	17			

Test: Tukey Alfa=0.05 DMS=0.59246

Error: 0.0467 gl: 12

Concentración	2	Medias	n	E.E.	
100%		31.17	3	0.12	A
75%		23.93	3	0.12	B
Fluconazol		22.40	3	0.12	C
50%		20.07	3	0.12	D
Alcohol 96%		0.00	3	0.12	E
25%		0.00	3	0.12	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0.05)

Figura 18. Resultados de los datos en análisis de varianza realizado en infoStat para *Candida albicans*



Universidad Nacional del Altiplano de Puno
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Biología
Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico
Laboratorio de Botánica y Biotecnología



CONSTANCIA

EL QUE SUSCRIBE, JEFE DEL LABORATORIO DE BOTÁNICA Y BIOTECNOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNA – PUNO.

HACE CONSTAR:

Que la Bachiller ANAÍS NEMESIA ILLANES QUISPE, egresada de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, ha realizado su trabajo de investigación titulado: **EFEECTO ANTIMICROBIANO DEL ACEITE DE *Rosmarinus officinalis* “ROMERO” FRENTE A *Escherichia coli* Y *Candida albicans***, en el laboratorio de Botánica y Biotecnología, del Programa Académico de Microbiología y Laboratorio Clínico de la Escuela Profesional de Biología, entre los meses de agosto a noviembre del 2019.

Se le expide la presente Constancia a solicitud de la interesada para los fines que se estime por conveniente.

Puno, 07 de enero del 2020.

Dr. Cs. ALVARO GABINO SARMIENTO MENA
Jefe de Laboratorio de Botánica y Biotecnología
FCCBB – UNA Puno