



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Unidad de Posgrado

**Actividad antioxidante y antifúngica del aceite esencial  
de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” para la  
formulación de un semisólido dermatológico**

**TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Farmacología con  
mención en Farmacología Experimental

**AUTOR**

José Fidel JÁUREGUI MALDONADO

**ASESOR**

Dra. Norma Julia RAMOS CEVALLOS

Lima, Perú

2023



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Jáuregui J. Actividad antioxidante y antifúngica del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” para la formulación de un semisólido dermatológico [Tesis de maestría]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica/Unidad de Posgrado; 2023.

---

## Metadatos complementarios

<b>Datos de autor</b>	
Nombres y apellidos	José Fidel Jáuregui Maldonado
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06960780
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0003-1796-2030">https://orcid.org/0000-0003-1796-2030</a>
<b>Datos de asesor</b>	
Nombres y apellidos	Norma Julia Ramos Cevallos
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	25469870
URL de ORCID	<a href="https://orcid.org/0000-0003-4361-1330">https://orcid.org/0000-0003-4361-1330</a>
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente del jurado</b>	
Nombres y apellidos	Américo Jorge Castro Luna
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25455526
<b>Miembro del jurado 1</b>	
Nombres y apellidos	Norma Julia Ramos Cevallos
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	25469870
<b>Miembro del jurado 2</b>	
Nombres y apellidos	Oscar Herrera Calderón
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	44789288

<b>Miembro del jurado 3</b>	
Nombres y apellidos	Gloria Clotilde Gordillo Rocha
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	10223170
<b>Datos de investigación</b>	
Línea de investigación	B.2.1.1. Plantas medicinales con potencial farmacéutico y productos naturales terapéuticos: (estudios fitoquímicos, estudios toxicológicos, estudios farmacológicos, procesos de su industrialización)
Grupo de investigación	Grupo de investigación de recursos naturales para el desarrollo de productos farmacéuticos y dermocosméticos
Agencia de financiamiento	No aplica.
Ubicación geográfica de la investigación	Universidad Nacional Mayor de San Marcos Latitud: -12.05819215 Longitud: -77.0189181894387
Año o rango de años en que se realizó la investigación	Enero 2023 – noviembre 2023
URL de disciplinas OCDE	Farmacología, Farmacia <a href="https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05">https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#3.01.05</a>



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**Unidad de Posgrado**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR**  
**AL GRADO ACADÉMICO DE MAGÍSTER EN FARMACOLOGÍA CON MENCIÓN EN FARMACOLOGÍA**  
**EXPERIMENTAL**

Siendo las **11:00 hrs. del 15 de diciembre de 2023** se reunieron en el auditorio de la Unidad de Posgrado de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, el Jurado de tesis, presidido por el Dr. Américo Jorge Castro Luna e integrado por los siguientes miembros: Dra. Norma Julia Ramos Cevallos (asesora), Dr. Oscar Herrera Calderón y la Dra. Gloria Clotilde Gordillo Rocha; para la sustentación oral y pública de la tesis intitulada: **"ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. "ROMERO" PARA LA FORMULACIÓN DE UN SEMISÓLIDO DERMATOLÓGICO"**, presentado por el Bachiller en Farmacia y Bioquímica **José Fidel Jáuregui Maldonado**.

Acto seguido se procedió a la exposición de la tesis, con el fin de optar al Grado Académico de **Magíster en Farmacología con mención en Farmacología Experimental**. Formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.

A continuación el Jurado de la tesis procedió a la calificación, la que dio como resultado el siguiente calificativo:

..... **19 (DIECINUEVE) APROBADO POR DESTACADO** .....

Luego, el Presidente del Jurado recomienda que la Facultad proponga que se le otorgue al Bachiller en Farmacia y Bioquímica **José Fidel Jáuregui Maldonado**, el Grado Académico de **Magíster en Farmacología con mención en Farmacología Experimental**.

Siendo las **11:50** hrs. se levanta la sesión.

Se extiende el acta en Lima, a las **11:54** hrs. del 15 de diciembre de 2023

.....  
Dr. Américo Jorge Castro Luna (P. P. D.E.)  
Presidente

.....  
Dra. Norma Julia Ramos Cevallos (P.P, T.C.)  
Miembro - Asesora

.....  
Dr. Oscar Herrera Calderón (P. Asoc. T.C.)  
Miembro

.....  
Dra. Gloria Clotilde Gordillo Rocha (P. P, T.C.)  
Miembro



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**Unidad de Posgrado**



**Observaciones:**

.....  
.....



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

Universidad del Perú. Decana de América

**Vicerrectorado de Investigación y Posgrado**



### CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Dra. Norma Julia Ramos Cevallos en mi condición de asesora acreditado con la Dictamen N°00093-FFB-UPG-2023 de la tesis, cuyo título es: **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* L. "Romero" PARA LA FORMULACIÓN DE UN SEMISÓLIDO DERMATOLÓGICO**, presentado por la Bach. **José Fidel Jáuregui Maldonado**, para optar el Grado Académico de Magíster en Farmacología con mención en Farmacología Experimental CERTIFICO que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Tesis, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de **18%** de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional**.

Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado correspondiente.

Firma de la Asesora

DNI: 25469870

Dra. Norma Julia Ramos Cevallos





## **DEDICATORIA**

A Leoncio y María, queridos padres, cuyo ejemplo me encaminó a la docencia y a la Farmacia

A Nathalie y José Franco, quiénes son los modelos de perseverancia, tenacidad y resiliencia, y que me enseñaron que se debe culminar bien lo que se emprende.

A Leoncio, Pedro y María Luisa, queridos hermanos, cuyo apoyo y cariño fueron fundamentales en la vida.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi asesora de tesis, Dra. Norma Ramos Cevallos, por su apoyo constante, colaboración y asesoría para culminar la presente investigación y obtener el grado académico correspondiente.

Al D.A. de Farmacotecnia y Administración Farmacéutica y a mis maestros quienes fueron el pilar fundamental en mi formación profesional.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, cuna de grandes investigadores y científicos que aportan día a día con el desarrollo del país.

# ÍNDICE

RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	2
1.1.1 Objetivo general	2
1.1.2 Objetivos específicos	3
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	4
2.1 Antecedentes	4
2.2 Aspectos teóricos	5
2.2.1 Actividad antioxidante	5
2.2.1.1 Actividad antioxidante frente al radical DPPH	6
2.2.1.2 Actividad antioxidante frente al radical ABTS	7
2.2.2 <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	8
2.2.3. El aceite esencial de romero	8
2.2.3.1. Proceso de obtención del aceite de romero	9
2.2.3.2. Principales actividades farmacológicas	9
2.2.4. <i>Candida albicans</i>	10
2.2.5 Análisis bibliométrico del aceite esencial de <i>R. officinalis</i> con actividad biológica.	14
CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	15
3.1 Tipo y diseño de investigación	15
3.2 Procedimientos	15
3.2.1 Recolección de la especie vegetal	15
3.2.2 Obtención del aceite esencial	15
3.2.3 Actividad antioxidante	16
3.2.4 Actividad antifúngica	16
3.2.5 Actividad antioxidante de la crema a base del aceite de romero	16
CAPITULO IV: RESULTADOS	22
CAPITULO V: DISCUSIÓN	29

CAPITULO VI: CONCLUSIONES	31
CAPITULO VII: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	35
CAPÍTULO VIII: ANEXOS	38

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Preparación de tubos para lectura en el espectrofotómetro en el ensayo del radical ABTS.+	18
Tabla 2. Microdilución del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. en el ensayo del radical ABTS <sup>+</sup>	19
Tabla 3. Preparación de los controles para las pruebas de microdilución	20
Tabla 4. Composición química y tiempos de retención analizados por CG-EM del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. “Romero”	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de la actividad antioxidante frente al radical DPPH	6
Figura 2. Mecanismo de la actividad antioxidante frente al radical ABTS+	7
Figura 3. Principales compuestos químicos encontrados en el aceite esencial de <i>R. officinalis</i> L.	10
Figura 4. Los cambios y transiciones morfológicas de <i>Candida albicans</i> durante el proceso de infección.	11
Figura 5. Documentos científicos indexados en la base de datos Scopus con la temática aceite esencial de romero.	11
Figura 6. Los 10 países con mayor producción científica indexados en la base de datos Scopus con la temática aceite esencial de romero.	13
Figura 7. Las 10 instituciones con mayor producción científica indexados en la base de datos Scopus con la temática aceite esencial de romero	13
Figura 8. Las 10 áreas temáticas con mayor producción científica indexados en la base de datos Scopus con la temática aceite esencial de romero.	13
Figura 9. Los 10 autores con mayor producción científica indexados en la base de datos Scopus con la temática aceite esencial de romero.	13
Figura 10. Cromatograma de Gas del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. “Romero”	22
Figura 11. Curva de captación del radical DPPH de aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L	23
Figura 12. Curva de captación del radical ABTS.+ del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	23
Figura 13. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. contra cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	26
Figura 14. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del Ketoconazol contra cepa de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	26
Figura 15. Determinación de la actividad antioxidante de las cremas formuladas con el aceite esencial de romero frente al radical DPPH.	27

Figura 16. Determinación de la actividad antioxidante de las cremas 28  
formuladas con el aceite esencial de romero frente al radical ABTS.

## LISTADO DE ABREVIATURAS

AE: Aceite esencial

CG/EM: cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas

CI<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria 50

MIC: minimum inhibitory Concentration

MFC: concentración mínima de fungicida

DPPH: 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

ABTS: 2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid)



## RESUMEN

Se evaluó la actividad antioxidante y antifúngica sobre *Candida albicans* ATCC 10231 y la composición química del aceite esencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. "romero" mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM). Se utilizó un sistema de hidrodestilación con arrastre de vapor de agua para obtener el aceite esencial, que tuvo un rendimiento de 1,1% v/p. Los componentes químicos se descubrieron mediante el análisis cualitativo de CG/EM. Se utilizaron dos métodos para evaluar la actividad antioxidante del aceite *in vitro*: captación del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) y captación del radical ácido 2,2-azinobis (3-etilbenzodiazolin)-6-sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>). La actividad antifúngica se demostró mediante la determinación de la CMI y la microdilución colorimétrica en microplacas. El análisis CG/EM proporcionó una explicación de 53 componentes químicos. La capacidad antioxidante del método DPPH fue de IC<sub>50</sub> 125 µL/mL, mientras que el método ABTS<sup>•+</sup> alcanzó IC<sub>50</sub> > 400 µL/mL en comparación con el estándar trolox®. La concentración mínima inhibitoria del aceite esencial fue de 1.25 µL/mL a las 24 horas y de 20 µL/mL a las 48 horas, lo que indica una actividad fungistática moderada a débil contra *Candida albicans* ATCC 10231. Los hallazgos indican que el aceite esencial tiene una intensa actividad antioxidante y una actividad fungistática moderada a débil. Los resultados en los semisólidos dermatológicos fueron muy similares, evidenciando la persistencia de la actividad antioxidante en las formulaciones.

**Palabras clave:** Antioxidante; aceite esencial; formulación dermocosmética; antifúngico; *in vitro*; romero.

## ABSTRACT

The antioxidant and antifungal activity of *Candida albicans* ATCC 10231 were examined along with the chemical composition of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. "rosemary" leaves by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). A hydrodistillation system with steam entrainment was used to obtain the essential oil, which had a yield of 1.1% v/w. The chemical components were discovered by qualitative GC/MS analysis. Two methods were used to evaluate the antioxidant activity of the oil in vitro: scavenging of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) and scavenging of the 2,2-azinobis (3-ethylbenzodiazolin)-6-sulfonic acid radical (ABTS). Antifungal activity was demonstrated by MIC determination and colorimetric microdilution in microplates. GC/MS analysis provided an explanation of 53 chemical components. The antioxidant capacity of the DPPH method was  $IC_{50}$  125  $\mu$ L/mL, while the ABTS method reached  $IC_{50} > 400$   $\mu$ L/mL compared to trolox® as a standard. The minimum inhibitory concentration of the essential oil was 1.25  $\mu$ L/mL at 24 hours and 20  $\mu$ L/mL at 48 hours, indicating moderate to weak fungistatic activity against *Candida albicans* ATCC 10231. The findings indicate that the essential oil has excellent antioxidant activity and moderate to weak fungistatic activity. The results in the dermatological semisolids were very similar, evidencing the persistence of the antioxidant activity in the formulations.

**Keywords:** Antioxidant; essential oil; dermocosmetic formulation; antifungal; *in vitro*; rosemary.

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Los hongos son microorganismos ambientales ubicuos que pueden clasificarse en filamentosos (mohos) o unicelulares (levaduras). Se han descubierto casi un millón de especies de hongos en la naturaleza, de las cuales alrededor de 200 son potencialmente perjudiciales para los humanos. Se ha demostrado que las infecciones por hongos aumentan las tasas de mortalidad y se ha relacionado este fenómeno con ciertos grupos de edad, particularmente bebés, recién nacidos prematuros y personas mayores que tienen sistemas inmunológicos deficientes o subdesarrollados <sup>1</sup>. *Candida sp.*, *Aspergillus sp.* y *Cryptococcus sp.* son las especies más frecuentemente relacionadas con infecciones superficiales e invasivas mortales <sup>2</sup>. Algunos enfoques comunes en la investigación de nuevos antifúngicos están enfocados en identificar nuevos objetivos terapéuticos, el desarrollo de sustancias antifúngicas a través de la síntesis y evaluación de nuevos compuestos químicos con propiedades antifúngicas <sup>3</sup>. En el campo de la nutrición, existe una demanda creciente para reducir el uso de productos químicos como agentes antimicrobianos y para combatir una variedad de infecciones causadas por microorganismos cada vez más agresivos y endógenos que son resistentes a los antimicrobianos sintéticos. Las sustancias derivadas de plantas, como los extractos hidroalcohólicos o los aceites esenciales, ciertamente pueden desempeñar un papel importante en este sentido <sup>1</sup>.

Por otro lado, debido a sus propiedades antimicrobianas, que incluyen actividad antifúngica, los aceites esenciales (AE) han sido objeto de investigación. Estos aceites son extractos altamente concentrados de compuestos volátiles de plantas, y sus componentes químicos, como terpenos, alcoholes, fenoles y aldehídos, los hacen efectivos contra los hongos <sup>4</sup>. Los estudios han permitido clarificar los mecanismos farmacológicos por el cual estos aceites esenciales tienen efecto antifúngico como el daño a la membrana celular, un aceite esencial puede tener efectos sinérgicos, donde la suma de varios componentes tiene una mayor actividad antifúngica que la esperada por la suma de las partes individuales. Los aceites esenciales pueden tener propiedades antifúngicas, pero es importante recordar que los hongos pueden desarrollar resistencia con el tiempo <sup>5</sup>.

El estudio de los aceites esenciales (AE) y su importancia en el campo de los alimentos, cosmética y en formulaciones farmacéuticas; se hace cada vez más aceptable en su demanda frente a sustancias sintéticas que más de un caso no son benéficas a la salud.

La composición química y la aromaticidad característica que poseen, los hacen excelentes aditivos por sus propiedades organolépticas, antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas y antivirales entre otras; ya que también poseen potencial efecto medicinal <sup>4</sup>. Los aceites esenciales son utilizados en el campo industrial, alimentos y en la medicina; siendo también empleados en fitoterapia como espasmolíticos, carminativos, hepatoprotectoras, anticancerígenos y en fragancias entre otras propiedades <sup>5</sup>.

Se ha demostrado en los últimos años que los productos antioxidantes a base de plantas medicinales son muy eficaces para tratar una variedad de enfermedades. Hay muchos aceites esenciales (AE) que tienen propiedades antioxidantes, lo que hace que su uso como antioxidantes naturales sea muy interesante, especialmente en la ciencia de los alimentos, la cosmética y la medicina <sup>6</sup>. Los AE suelen ser productos complejos con más de 50 componentes en diferentes concentraciones. Las sustancias AE descritas con actividad antioxidante representan una fracción significativa del total de compuestos y con frecuencia se indican como una fuente potencial para el descubrimiento y desarrollo de nuevos compuestos bioactivos, con usos médicos, farmacéuticos, cosméticos y otros. En la industria alimentaria, también se han estudiado los AE y sus constituyentes como aditivos alternativos, enfatizando sus ventajas sobre los antioxidantes sintéticos, que con frecuencia tienen efectos negativos sobre la salud <sup>6</sup>.

*Rosmarinus officinalis* L. es una especie que contiene aceite esencial de aplicable uso en medicina, cosmética, fitoterapia y en el campo alimenticio. La finalidad de esta investigación fue estudiar la composición química de su aceite esencial por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM) e identificar los metabolitos secundarios que posee; así mismo, su actividad antioxidante y antifúngica sobre *Candida albicans* ATCC 10231, del aceite solo e incorporado en un semisólido dermatológico

## **1.1 Objetivos**

Evaluar la actividad antioxidante y actividad antifúngica *in vitro* en el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” para formular un semisólido dermatológico.

### 1.1.1. Objetivos específicos

1. Identificar los componentes químicos del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. por cromatografía gaseosa acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).
2. Identificar la actividad antioxidante *in vitro* del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” frente al radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) y el ABTS (2,2'-Azinobis-(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonic Acid).
3. Identificar la actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” frente al *Candida albicans*.
4. Formular un semisólido incluyendo el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero”
5. Identificar la actividad antioxidante del semisólido dermatológico que contiene el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero”

## CAPÍTULO II. ASPECTOS TEÓRICOS

### 2.1. Antecedentes de la investigación

Lagha et al., en su trabajo titulado, “**Antibacterial and Biofilm Inhibitory Activity of Medicinal Plant Essential Oils Against *Escherichia coli* Isolated from UTI Patients**”, concluyó que el aceite de *R. officinalis* tuvo la actividad anti-biopelícula más alta, seguido de *T. zygis* y *O. majorana*. En consecuencia, los aceites probados mostraron actividades antibacterianas y antibiopelículas muy efectivas contra las infecciones urinarias por *E. coli* y pueden considerarse una buena alternativa para la sustitución de antibióticos <sup>7</sup>.

El-Demerdash et al., en su trabajo titulado “**Rosmarinus officinalis essential oil modulates renal toxicity and oxidative stress induced by potassium dichromate in rats**”, concluye que el aceite esencial de romero tenía una capacidad antioxidante potencial para mejorar la nefrotoxicidad inducida por  $K_2Cr_2O_7$ , especialmente en el grupo de protección <sup>8</sup>.

Amaral et al., en su trabajo titulado “**Antibacterial and antioxidant effects of *Rosmarinus officinalis* L. extract and its fractions**”, el extracto de etanólico de *R. officinalis*, dicloro metánico, acetato de etilo y butanólico tuvieron efecto inhibidor en las bacterias Grampositivas y Gramnegativas. En general, el extracto dicloro metánico y etanólico tuvieron los mejores efectos antioxidantes y antibacterianos entre todas las fracciones probadas <sup>9</sup>.

Macedo et al., en su trabajo titulado “**Development and Evaluation of an Antimicrobial Formulation Containing *Rosmarinus officinalis***”, de acuerdo con los resultados, el extracto de romero mostró una actividad antioxidante y antimicrobiana prometedora, y las formulaciones desarrolladas que contenían este extracto se mantuvieron estables durante más de 90 días y tenían características aceptables, lo que sugiere su potencial uso como fitocosmético. Este artículo informa sobre el primer intento de producir una emulsión de aceite en agua utilizando solo excipientes naturales y extracto de

romero, lo cual es una novedad prometedora, ya que no se pueden encontrar productos similares en el mercado o en la literatura científica <sup>10</sup>.

Hussain et al., en su trabajo titulado “*Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities” demostró la presencia por GC-MS en el aceite esencial de *R. officinalis* al 1,8-cineol (38.5%), canfor (17.1%), alfa-pineno (12.3%), limonene (6.23%), canfeno (6.00%) y linalool (5.70%) <sup>11</sup>.

## 2.2. Aspectos teóricos

### 2.2.1. Actividad antioxidante

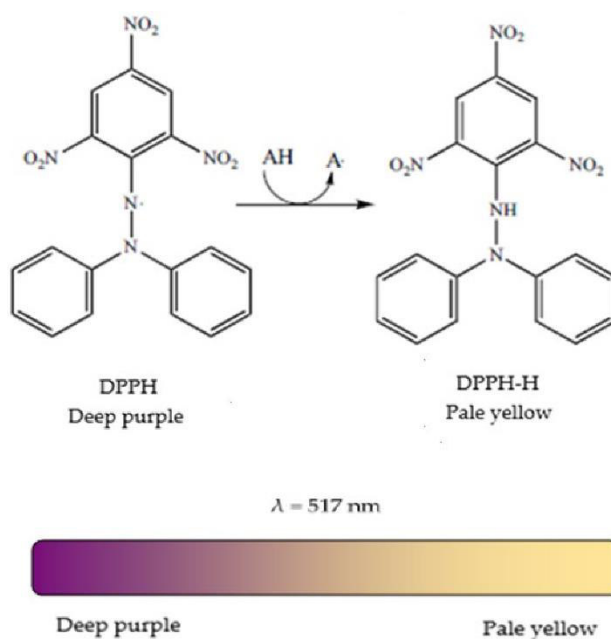
La capacidad de ciertas sustancias para neutralizar o inhibir los efectos nocivos de los radicales libres en el cuerpo se conoce como actividad antioxidante. Los radicales libres son moléculas inestables que pueden dañar las células y contribuir al envejecimiento y una variedad de enfermedades, incluidos el cáncer, las enfermedades cardíacas y las enfermedades neurodegenerativas. Al proporcionar electrones adicionales para estabilizarlos, las sustancias con actividad antioxidante ayudan a combatir estos radicales libres. Algunos de los antioxidantes más conocidos son el selenio, las vitaminas C y E, el betacaroteno y otros elementos que se encuentran en frutas, verduras, frutos secos, granos enteros y algunos tipos de té <sup>12</sup>.

El ensayo ORAC (Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno), entre otros, es una forma de evaluar la actividad antioxidante de una sustancia. El consumo regular de alimentos ricos en antioxidantes se asocia comúnmente con beneficios para la salud, como una reducción del riesgo de enfermedades crónicas y un apoyo al envejecimiento saludable <sup>13</sup>.

Es crucial tener en cuenta que la actividad antioxidante es solo una parte del complejo sistema de defensa antioxidante del cuerpo. Además de obtener antioxidantes de la dieta, mantener un estilo de vida saludable, como hacer ejercicio regularmente, dormir lo suficiente y abstenerse de consumir tabaco y alcohol, también ayuda a protegerse contra el estrés oxidativo <sup>14</sup>.

### 2.2.1.1 Actividad antioxidante frente al radical DPPH

El ensayo del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) es un método comúnmente utilizado para evaluar la actividad antioxidante de compuestos químicos, extractos de plantas, alimentos y otros productos. El radical libre estable DPPH es púrpura y se vuelve amarillo cuando se expone a un antioxidante <sup>15</sup>.



**Figura 1. Mecanismo de la actividad antioxidante frente al radical DPPH <sup>16</sup>. Fuente propia 2023**

Este ensayo se utiliza ampliamente en estudios de investigación y en la industria alimentaria para determinar la capacidad antioxidante de diversas sustancias. El proceso fundamental del ensayo DPPH implica la preparación de una solución DPPH en un solvente adecuado. Luego, esta solución se mezcla con el extracto o compuesto que se está evaluando. Los cambios en la absorbancia o el color a lo largo del tiempo se miden para monitorear la reacción. La capacidad del compuesto para neutralizar el DPPH y, por lo tanto, su actividad antioxidante se indica por un descenso en la absorbancia o un cambio de color <sup>17</sup>.

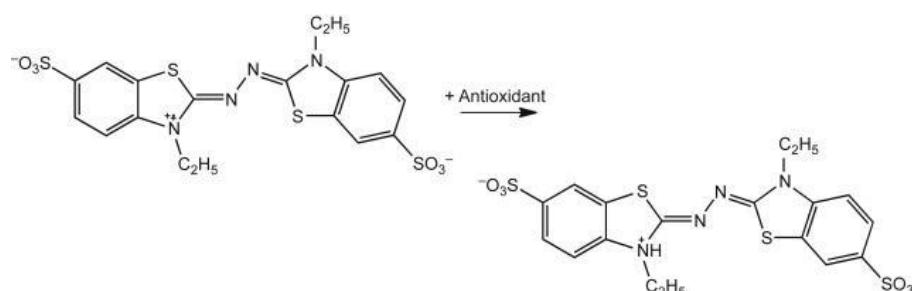
Es importante destacar que los resultados pueden variar según las condiciones experimentales particulares, como la concentración del DPPH, el tiempo de reacción y la temperatura. Además, la interpretación de los



resultados debe tener en cuenta la especificidad del ensayo en lugar de generalizar la actividad antioxidante a todas las condiciones biológicas. En resumen, la actividad antioxidante frente al DPPH es una medida comúnmente utilizada para evaluar la capacidad de un compuesto para neutralizar radicales libres y proporciona información sobre su potencial beneficio antioxidante.

### 2.2.1.2 Actividad antioxidante frente al radical ABTS

El radical ABTS es un radical cationico incoloro que, al ser reducido por un agente antioxidante, se vuelve verde azulado. La reducción del radical ABTS se usa para medir la capacidad antioxidante. Esto genera un cambio de absorbancia a una longitud de onda específica. La preparación de una solución de ABTS radical cationico es el paso fundamental en el ensayo de la actividad antioxidante con ABTS. Luego se mezcla esta solución con el compuesto o extracto que se está evaluando. La reducción del radical ABTS generalmente se mide midiendo la absorbancia a una longitud de onda determinada <sup>18,19</sup>.



**Figura 2. Mecanismo de la actividad antioxidante frente al radical ABTS<sup>+</sup> <sup>16</sup>. Fuente propia 2023**

Los resultados pueden variar según las condiciones experimentales específicas, como la concentración de la solución de ABTS, el tiempo de reacción y la temperatura, al igual que en otros ensayos antioxidantes. Este ensayo se utiliza con frecuencia en estudios de investigación e industria para evaluar y comparar la capacidad antioxidante de diferentes sustancias. La actividad antioxidante frente al radical ABTS es una herramienta útil para la investigación sobre antioxidantes porque revela la capacidad de una sustancia para neutralizar radicales libres, lo que puede tener implicaciones

para la salud y la prevención de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo <sup>20</sup>.

Los ensayos TEAC permiten la identificación de una amplia gama de compuestos antioxidantes debido a la rápida reacción entre el radical ABTS•+ y varios antioxidantes sintéticos y naturales que se encuentran en componentes de los alimentos, como fenoles, aminoácidos, péptidos, vitamina E y vitamina C. La prueba de antioxidantes TEAC tiene la capacidad de utilizarse en una amplia gama de valores de pH. Sin embargo, es importante tener en cuenta que el valor del pH puede verse influenciado por la muestra específica que se está evaluando para determinar su actividad antioxidante. La variación del pH podría conducir a diferentes mecanismos de reacción, como la promoción del transporte de electrones en condiciones ácidas. La solubilidad de ABTS•+ tanto en ambientes tamponados como orgánicos ha impulsado el desarrollo de técnicas para evaluar la actividad antioxidante hidrófila y lipófila. La combinación de estos enfoques permite una medición precisa de la capacidad antioxidante de los productos <sup>21</sup>.

### **2.2.2. *Rosmarinus officinalis* L.**

La especie *Rosmarinus officinalis* L. es una especie conocida como romero. Es un arbusto originario de la región mediterránea que puede crecer hasta 2 metros de altura y tiene hojas perennes de color verde. Ha sido ampliamente utilizado en la medicina tradicional y en la industria alimentaria debido a sus propiedades medicinales y nutricionales <sup>22</sup>.

En cuanto a la composición química del romero, se ha identificado una variedad de compuestos en su aceite esencial, como el 1,8-cineol, el  $\alpha$ -pineno, el alcanfor, el  $\beta$ -pineno, el bornilo acetato, el  $\beta$ -cariofileno y otros terpenos volátiles. Estos compuestos son responsables de las propiedades antiinflamatorias y de otras actividades biológicas atribuidas al aceite esencial de romero. El romero es una planta medicinal con numerosas propiedades terapéuticas, como su actividad antiinflamatoria. Su aceite esencial, obtenido de las hojas de la planta, contiene una variedad de compuestos con potencial terapéutico. Su uso en la medicina tradicional y en la industria alimentaria es ampliamente reconocido, y su estudio

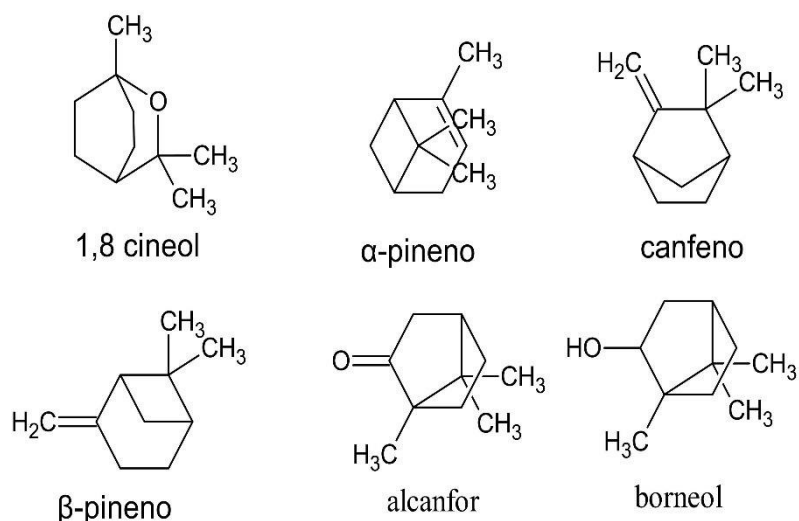
científico continúa demostrando sus diversas aplicaciones medicinales y nutricionales <sup>23</sup>.

### **2.2.3. El aceite esencial de romero**

El aceite esencial de romero ha demostrado que tiene propiedades medicinales y nutricionales, y se utiliza tanto en medicina tradicional como en la industria alimentaria. La actividad antiinflamatoria del romero es particularmente destacada y se ha utilizado en el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación. La composición química del aceite de romero incluye diversos compuestos, como el 1,8 cineol, el  $\alpha$ -pineno, el camfeno, el  $\beta$ -pineno, el alcanfor, el borneol, el acetato de bornilo, el  $\beta$ -cariofileno, el p-cimeno, el  $\beta$ -mirceno, el limoneno, el  $\alpha$ -terpineno, el  $\gamma$ -terpineno, el verbenone, el  $\alpha$ -terpineol, el linalool y el terpinen-4-ol <sup>24,25</sup>.

#### **2.2.3.1. Proceso de obtención del aceite de romero**

El aceite esencial de romero se obtiene mediante un proceso de destilación al vapor de la planta *R. officinalis*. Durante este proceso, las partes verdes de la planta, como las hojas y los tallos, se someten a vapor de agua, lo que ayuda a liberar los compuestos volátiles presentes en la planta. El vapor que contiene estos compuestos se condensa y se recoge, separándolo del agua. El aceite esencial de romero obtenido es entonces purificado y envasado para su uso. Este método de destilación al vapor es ampliamente utilizado en la industria para obtener aceites esenciales de diferentes plantas. El aceite esencial de romero es muy apreciado por sus propiedades medicinales y su capacidad para aliviar la inflamación <sup>26</sup>.



**Figura 3. Principales compuestos químicos encontrados en el aceite esencial de *R. officinalis* L. Fuente propia 2023**

### 2.2.3.2. Principales actividades farmacológicas

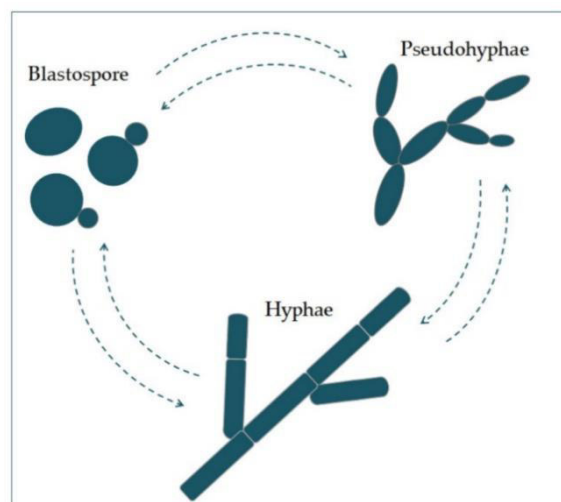
El aceite esencial de *R. officinalis* tiene diversas actividades farmacológicas principales. Algunas de estas actividades incluyen su potencial antiinflamatorio, antidepresivo, antialérgico, antioxidante, relajante muscular y antifúngico <sup>24</sup>.

### 2.2.4. El *Candida albicans*

El *Candida albicans* puede aparecer en una variedad de formas, como blastosporas, pseudohifas e hifas (Figura 2). La división asexual de las blastosporas se conoce como gemación. Durante ese proceso, se forma material celular nuevo en la superficie de la blastospora. El nuevo brote se desarrolla a partir de una pequeña blastospora seleccionada y generalmente se ubica distalmente del sitio de la cicatriz del nacimiento. Después de eso, comienza la etapa de desarrollo. Después de la fase de crecimiento, las células se dividen, lo que hace que la célula hija se separe de la célula madre y forme una partición.

Las pseudohifas tienen cadenas de células de levadura alargadas, pero las cadenas de células tubulares ramificadas en los sitios de septación no se estrechan. Un pH alcalino, suero y altas concentraciones de CO<sub>2</sub> promueven la filamentación. Se potencia también en ausencia de nitrógeno o carbono

en presencia de N-acetilglucosamina (GlcNAc). Esta transición de una blastospora a una hifa se marca por la activación de una compleja red reguladora de rutas de señales, que incluye varios factores de transcripción. La principal distinción entre la composición de la levadura y las hifas es el contenido ligeramente mayor de quitina en la pared de las hifas. La pared celular está formada por proteínas, glucano y quitina. Su tarea es proteger a la célula de los cambios osmóticos, la deshidratación y los cambios de temperatura, así como de las defensas inmunitarias del huésped. Además, produce proteínas como Als1-7, Als9 y Hwp1 y es responsable de la adhesión de las células huésped. Una célula puede comunicarse con el mundo exterior gracias a su membrana celular. Los esteroides están presentes en la membrana celular porque brindan estabilidad, rigidez y resistencia a los estresantes físicos. El ergosterol, que se encuentra en la membrana celular de los hongos, es el esteroide más representado. Se sintetiza en el retículo endoplásmico y los cuerpos lipídicos. La membrana celular está compuesta por dos capas de fosfolípidos, cada una de las cuales contiene proteínas que realizan funciones de receptores y transportadoras y transductoras. En su metabolismo, el *Candida albicans* usa la glucosa como fuente de carbono y los aminoácidos como fuente de nitrógeno.

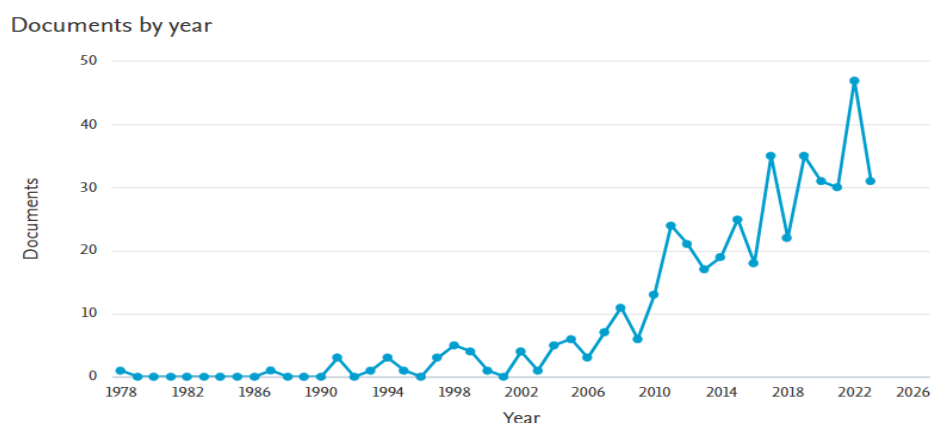


**Figura 4. Los cambios y transiciones morfológicas de *Candida albicans* durante el proceso de infección. Fuente propia 2023**

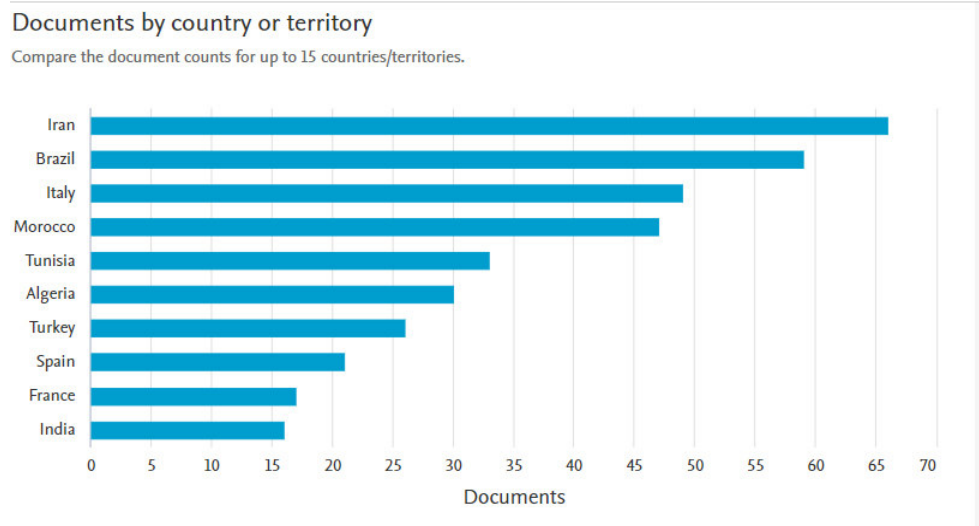
La infección por *Candida spp.* son una de las infecciones por hongos más comunes en dermatología. Aunque *Candida albicans* es responsable del 80 al 90% de las infecciones, otras especies de la bacteria con frecuencia se consideran los patógenos. En la mayoría de los casos, las infecciones por *Candida* se consideran oportunistas porque *Candida albicans* es un hongo normalmente comensal. Sin embargo, una infección patógena puede ocurrir cuando la inmunidad del huésped se ve afectada por una variedad de razones posibles. En general, el equilibrio entre el sistema de defensa del huésped y los factores de virulencia de *Candida albicans* es esencial para la relación comensal. Mientras que *Candida albicans* causa infecciones cutáneas superficiales, son raras las micosis "profundas" que afectan la dermis y el tejido subcutáneo. Sin embargo, una infección fúngica invasiva puede ocurrir en pacientes gravemente inmunocomprometidos, lo que provoca una penetración profunda y candidiasis sistémica, a menudo fatal <sup>27,28</sup>.

### 2.2.5 Análisis bibliométrico del aceite esencial de *R. officinalis* con actividad biológica.

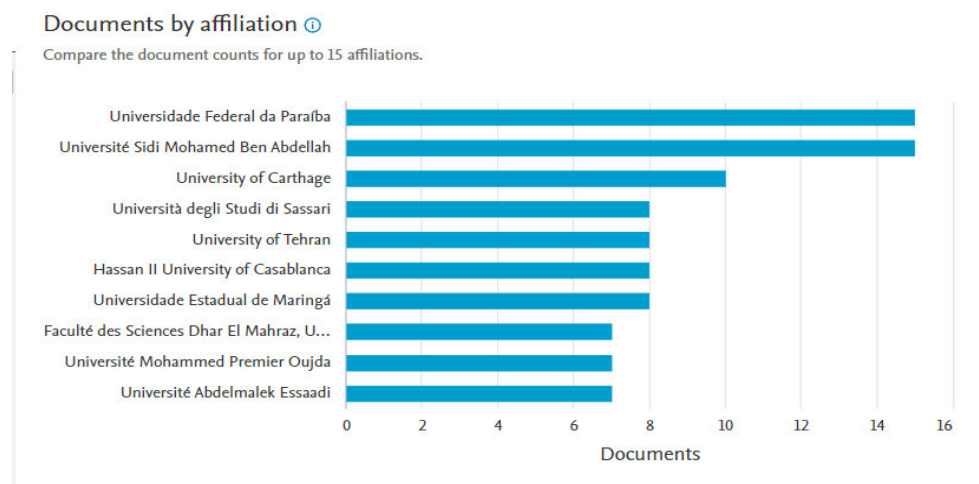
De acuerdo, al análisis bibliométrico los documentos científicos respecto al aceite de romero y su actividad biológica, los artículos científicos han ido creciendo con el pasar de los años desde 1978 hasta el 2024. Con un incremento pico en el año 2023.



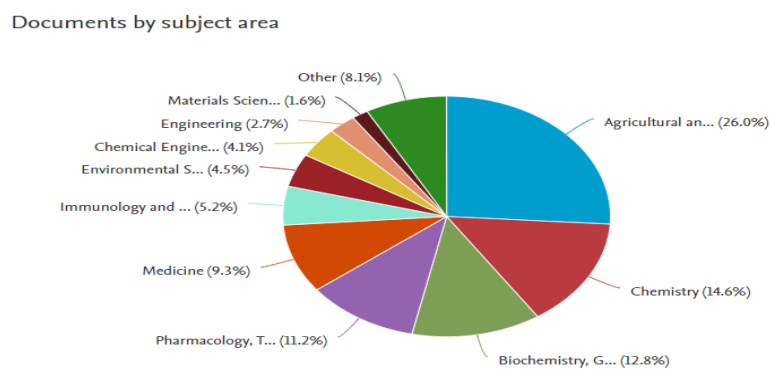
**Figura 5.** Documentos científicos indexados en la base de datos Scopus con la temática aceite esencial de romero.



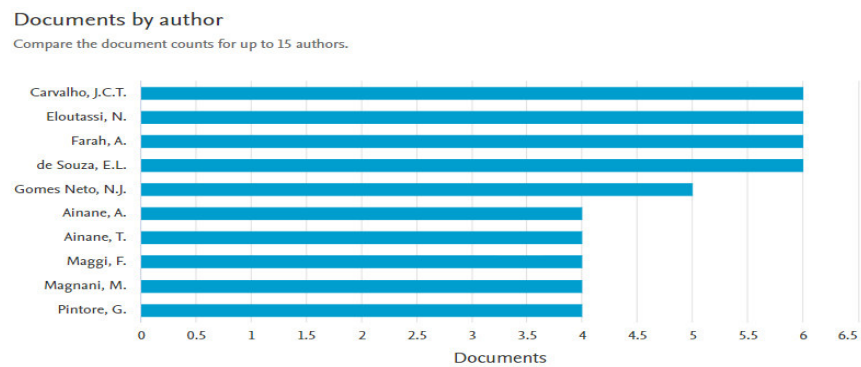
**Figura 6.** Los 10 países con mayor producción científica indexados en la base de datos Scopus con la temática aceite esencial de romero.



**Figura 7.** Las 10 instituciones con mayor producción científica indexados en la base de datos Scopus con la temática aceite esencial de romero.



**Figura 8.** Las 10 áreas temáticas con mayor producción científica indexados en la base de datos Scopus con la temática aceite esencial de romero.



**Figura 9.** Los 10 autores con mayor producción científica indexados en la base de datos Scopus con la temática aceite esencial de romero.



## **CAPÍTULO III. METODOLOGÍA**

### **3.1. Tipo de investigación**

El presente trabajo fue de tipo experimental, con un grupo control y dos grupos con el tratamiento a diferentes concentraciones del aceite esencial de romero.

### **3.3. Diseño metodológico**

El diseño de la investigación es analítico, prospectivo y transversal. El presente trabajo se realizó en los ambientes del Instituto de Investigación en Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales "Juan de Dios Guevara", el Instituto de Investigación en Química Biológica, Microbiología y Biotecnología y en el Laboratorio de Farmacotecnia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, así como en el Laboratorio de Toxicología y Medicina Legal de la Morgue Central de Lima.

### **3.4. Unidad de análisis**

El aceite esencial de las hojas de la especie vegetal *Rosmarinus officinalis* L. obtenido por arrastre de vapor.

### **3.5. Población de estudio**

Las partes aéreas de *R. officinalis*, especie recolectada en la provincia de Tarma, departamento de Junín, Región Junín, Perú ubicada a 3259 metros de altitud.

### **3.6. Muestra o tamaño de muestra**

100 mL de aceite esencial de las hojas de romero (*R. officinalis*) obtenido por arrastre de vapor con una densidad de 0.987 mg/mL.

### **3.7. Técnicas de recolección de la información o de datos**

#### **3.7.1. Material Vegetal**

Las hojas de la especie *Rosmarinus officinalis* L. se recolectaron en la provincia de Tarma, departamento de Huancayo, Región Junín, y fue identificado por el botánico José Campos de la Cruz.

### **3.7.2. Aislamiento del aceite esencial**

Las hojas frescas de romero fueron colocadas en un equipo de obtención de aceites esenciales tipo Clevenger, el proceso duró aproximadamente 3 horas. Después de separarse y deshidratarse con sulfato de sodio anhidro, se conservó en una botella de color ámbar a 8 °C.

### **3.7.3. Análisis del aceite esencial**

Se realizó un análisis cualitativo del aceite esencial de *R. officinalis* por cromatografía de gases/espectrometría de masas (CG/EM) en un equipo Perkin Elmer modelo GC: Clarus 600T y MS: Turbo Mass en las condiciones siguientes. La columna capilar de sílica gel de 30 m de largo tiene un diámetro de 0,25 mm y se eleva a 230°C en 60 minutos. El volumen de inyección fue de 1 mL y la temperatura de inyección fue de 250°C. Los componentes químicos se detectaron y explicaron comparándolos con los estándares de espectros de masas de las bibliotecas correspondientes.

### **3.7.4. Actividad antioxidante *in vitro***

#### **Método de inhibición *in vitro* del radical orgánico 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)**

##### **Preparación de la muestra**

Se trabajaron con diluciones del AE de *R. officinalis* con un rango entre 200, 150, 100 y 50 µL/mL. Para diluir el aceite esencial se usó el diclorometano. Luego se preparó una solución de DPPH pesando 20 mg del reactivo y se diluyó con 50 mL de metanol.

El diclorometano se utilizó como solvente porque el aceite esencial de romero precipitaba en presencia de etanol absoluto y otros alcoholes. Preparando una solución DPPH. Se pesó 20 mg de DPPH y se diluyó con

50 mL de metanol. La solución se conservó en un frasco de vidrio ámbar y se conservó en refrigeración a 4°C. La solución resultante de DPPH se midió a 517nm en y se encontró una variación de 0,600 a 0,700.

### Procedimiento

- Blanco: 800 µL de metanol y 400 µL de diclorometano.
- Muestra: 400 µL de aceite esencial de romero (con concentraciones de 50, 100, 150 y 200 µL/mL) y 800 µL de la solución de DPPH.
- Luego se dejó en reposo durante 30 min en la oscuridad con un espectrofotómetro UV a una longitud de onda de 517nm.
- Control: Estuvo constituido por el DPPH, el diclorometano, el solvente de dilución. El ensayo fue realizado en triplicado:
  - Blanco de muestra, un tubo para cada concentración, que contenía 400 µL de aceite esencial de *R. officinalis* y 800 µL de metanol. El porcentaje de inhibición se calculó utilizando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Abs. DPPH} - \text{Abs. muestra})}{\text{Abs. DPPH}} \times 100$$

### Método de captación del radical ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzodiazolin)-6-sulfónico (ABTS<sup>•+</sup>).

- **Preparación de la muestra:** Se trabajaron con diluciones del AE de *R. officinalis* con un rango entre 200, 150, 100 y 50 µL/mL. Para diluir el aceite esencial se usó el diclorometano. Luego se preparó una solución de ABTS.
- **Preparación de la solución stock de ABTS<sup>•+</sup>:** Para activar la solución, se preparó una solución acuosa de reserva de ABTS 7 mM y se agregó persulfato de potasio 2.45 mM y se dejó reaccionar en oscuridad y a temperatura ambiente durante 16 horas.
- **Medición de la actividad antioxidante frente al radical ABTS:** Para medir la actividad antioxidante la absorbancia tuvo un punto de inicio de  $0.700 \pm 0.02$  a 734 nm. El blanco contenía 980 µL de etanol absoluto y 20 µL de diclorometano.

- Se introdujeron 20 µL de aceite esencial de romero en un tubo de ensayo a concentraciones de 250, 200, 150, 100 y 50 µL/mL, así como 980 µL de la solución de trabajo de ABTS<sup>•+</sup>. Luego se dejó en reposo en la oscuridad durante 7 minutos. Finalmente, la absorbancia fue leída 734 nm. Para cada concentración, se utilizaron un tubo para colocar 980 µL de etanol absoluto y 20 µL de aceite esencial de romero en blancos de muestra. Para determinar el porcentaje de inhibición, se utiliza la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(\text{Abs. ABTS} - \text{Abs. muestra})}{\text{Abs. ABTS}} \times 100$$

**Tabla 1. Preparación de tubos para lectura en el espectrofotómetro en el ensayo del radical ABTS<sup>•+</sup>**

	TUBO BLANCO (calibración)	TUBO CONTROL ABTS	TUBO MUESTRA A.E. ROMERO	TUBO BLANCO DE MUESTRA
ACEITE ESENCIAL DE ROMERO	-	-	20 µL	20 µL
SOLVENTE A.E. ROMERO (diclorometano)	20 µL	20 µL	-	-
ETANOL ABSOLUTO	980 µL	-	-	980 µL
ABTS	-	980 µL	980µL	-
Reposar por 7 minutos alejado de la luz. Leer a 734 nm				

**Fuente propia 2023**

### 3.7.5. Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro*

#### **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de Microdilución Colorimétrico en Microplaca**

##### **Fundamento del procedimiento**

Esta prueba se basa en la dilución de los aceites esenciales en un medio líquido para inhibir el crecimiento bacteriano. Luego, el indicador redox resazurina se utiliza como marcador de bacterias vivas para demostrar que no hay crecimiento en los pozos. Se realizó una prueba de microdilución cuantitativa de una muestra de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. para encontrar la concentración más baja que podría detener el crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231.

## Material de origen biológico.

### *Candida albicans* ATCC 10231

Preparación de muestras para pruebas de microdilución

Para la prueba de microdilución, se adaptó el esquema de dilución de drogas insolubles en agua de los protocolos CLSI M27-A2 y el aceite esencial se diluyó en DMSO en dos diluciones seriadas. Esto condujo a diez diluciones finales doblemente concentradas que oscilaban entre 0,078125 y 40  $\mu\text{L}/\text{mL}$ . La concentración final de DMSO fue del 5% o menos en relación con la velocidad de flujo.

**Tabla 2.** Microdilución del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. en el ensayo del radical ABTS<sup>+</sup>

Paso	Fuente	Volumen (mL)	+ DMSO (mL) solvente	= Concentración intermedia ( $\mu\text{L}/\text{mL}$ )	= Concentración 2X a 1:50
1	1000 Stock			1000 $\mu\text{L}/\text{mL}$	80 (1:12)
2	1000 stock			1000	40 (1:25)
3	1000 stock			1000	20
4	1000 stock	0.5	0.5	500	10
5	1000 stock	0.5	1.5	250	5
6	1000 stock	0.5	3.5	125	2.5
7	125 Paso 6	0.5	0.5	62.5	1.25
8	125 Paso 6	0.5	1.5	32.25	0.625
9	125 Paso 6	0.5	3.5	16.125	0.3125
10	16.125 Paso 9	0.5	0.5	8.0625	0.15625

DMSO: Dimetilsulfóxido

## Fuente propia 2023

### Preparación de ketoconazol

Es el antifúngico de referencia. Se preparó realizar una serie de diluciones seriales dobles para obtener un rango de concentraciones de 0,0313 – 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ketoconazol.

**Tabla 3.** Preparación de los controles para las pruebas de microdilución

Paso	Fuente	Volumen (mL)	+ DMSO (mL) solvente	= Concentración intermedia (µg/mL)	= Concentración 2X a 1:50
1	1,600 Stock			1600 µg/mL	32
2	1,600 stock	0.5	0.5	800	16
3	1,600 stock	0.5	1.5	400	8.0
4	1,600 stock	0.5	3.5	200	4.0
5	200 Paso 4	0.5	0.5	100	2.0
6	200 paso 4	0.5	1.5	50	1.0
7	200 Paso 4	0.5	3.5	25	0.5
8	25 paso 7	0.5	0.5	12.5	0.25
9	25 paso 7	0.5	1.5	6.25	0.125
10	25 paso 7	0.5	3.5	3.13	0.0625

DMSO: Dimetilsulfóxido

### Fuente propia 2023

#### Preparación de *Candida albicans* ATCC 10231 inóculo

Se hizo un repique de *Candida albicans* ATCC 10231, 24 horas antes de la prueba de determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en agar dextrosa Sabouraud, que se incubó a 37°C en condiciones aerobias, para aumentar la cantidad de células viables. Se transfirió una pequeña cantidad de la bacteria a un tubo de prueba con una solución salina estéril del 0,85% el día del experimento. El grado de turbidez alcanzado fue comparable al tubo 0.5 de la escala de McFarland, lo que equivale a  $1,5 \times 10^6$  UFC/mL (inóculo concentrado). Después, se realizó una dilución doble con caldo RPMI 1640 para obtener  $1-5 \times 10^3$  UFC/mL de inóculo (inóculo 2x).

#### Proceso de preparación de Resazurina

La resazurina se preparó a una concentración de 20 mg/mL. Se pesó asepticamente 200 mg de resazurina para producir 10 mL de solución de resazurina y se agregó agua destilada estéril hasta los 10 mL en una fiola estéril. Luego se filtró a través de filtración de membrana con un filtro de poro de 0,22 µm. Después de eso, se almacenó en un recipiente de vidrio ambar estéril y se mantuvo en refrigeración hasta que se utilizó.

### **Preparando el inóculo utilizando el indicador de resazurina**

Para la prueba de microdilución, se agregó 0,1 mL de la solución de resazurina 20 mg/mL. Un valor de 10 mL por cada 20 mL de suspensión de inóculo dos veces.

### **Procedimiento para evaluar la microdilución colorimétrica**

La prueba de microdilución se llevó a cabo en microplacas de 96 pozos estériles, de fondo en U (Brand). En cada pozo se colocaron 100 µL de la dilución 2x de la muestra o control correspondiente, luego se agregaron 100 µL de inóculo 2x con un indicador de resazurina. Por otro lado, los pozos que se utilizan para controlar el crecimiento y la esterilidad también se toman en cuenta. Ambos tipos de pozos incluyen caldo RPMI 1640 solo con el inóculo de *Candida albicans* ATCC 10231.

### **El proceso de incubación de la placa**

Las microplacas se incubaron durante 24 horas en condiciones aeróbicas a 37°C.

### **Lectura de los resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).**

La lectura de los resultados se llevó a cabo visualmente. Se registró un cambio de color de púrpura a rosado o incoloro. La concentración más baja a la que no se produce el cambio de color se consideró el valor de CMI. El promedio de dos valores se calculó y se informó como CMI.

### **3.8. Procesamiento de la información o de datos**

A los datos obtenidos se realizará un tratamiento estadístico usándose estimadores como medida aritmética, desviación estándar y ANOVA usando el programa Microsoft Excel 2003 y SPSS versión 25.

## CAPÍTULO IV. RESULTADOS

### 4.1. Análisis por Cromatografía Gaseosa acoplada a Espectrometría de Masas (CG/EM).

El resultado del análisis por Cromatografía de Gases /Espectrometría de Masas (CG/EM), se presenta en la figura 10 y tabla 4. Como se observa en la Figura 10, el compuesto con mayor abundancia relativa es el Cariofileno, seguido por el alcanfor, el eucaliptol y el  $\beta$ -pineno.

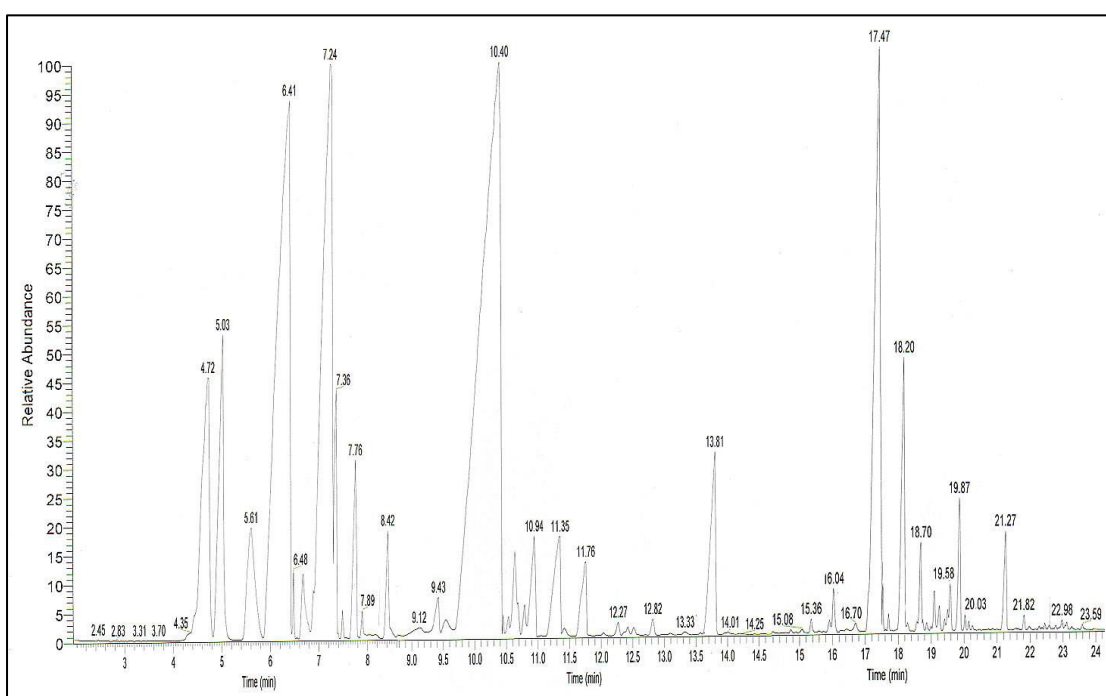


Figura 10. Cromatograma de Gas del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. "Romero"

Fuente propia 2023



**Tabla 4. Composición química y tiempos de retención analizados por CG-EM del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero”**

<b>Compuestos químicos volátiles</b>	<b>Tiempo de Retención (TR)</b>
alfa-Pineno	4,72
Canfeno	5,03
beta-Pinene	5,61
$\alpha$ -Felandreno	6,48
d-Limoneno	6,89
Eucaliptol	7,24
Bicyclo[3,1,1]hept-2-ene, 2,6,6-trimethyl-, ( $\pm$ )-	7,36
Benzeneacetaldehido	7,40
p-Mentha-1,4-dien-7-ol	7,76
(Z)-.beta.-Terpineol	7,89
Terpinoleno	8,42
Linalool	9,43
Alloocimeno	9,55
Canfor	10,40
Cyclohexanol, 5-methyl-2-(1-methylethenyl)-, [1R-(1 $\alpha$ ,2 $\beta$ ,5 $\alpha$ )]-	10,45
Isopinocarveol	10,53
(+)-borneol	10,64
alpha-Terpineol	10,69
Terpinen-4-ol	10,93
Myrtenol	11,44

D-Verbenona	11,76
beta-Citronellol,	12,27
p-Menth-4(8)-en-3-ona	12,41
8-p-Menthen-2-ol	12,51
3-Cyclohexen-1-one 2-isopropyl-5-methyl-	12,82
Bornyl acetato	13,81
Limonen-6-ol, pivalato	14,01
3,5-Heptadienal, 2-ethylidene-6-methyl-	15,08
$\alpha$ -Cubebeno	15,36
Copaeno	15,90
Cariofileno	17,47
Germacreno D	17,54
Cadineno	18,29
beta-Bisaboleno	19,50
$\tau$ -Cardineno	19,58
$\alpha$ -Cubebeno	20,03
$\alpha$ -Muuroleno	20,15
Cadala-1(10),3,8-triene	20,25
Cariofileno oxide	21,27
Humulene epoxide I	21,82

---

**Fuente propia 2023**

#### 4.2. Actividad antioxidante del aceite esencial de *R. officinalis*

Los resultados de la actividad antioxidante realizados por los métodos de DPPH y ABTS<sup>+</sup> se presentan en las figuras 11 y 12.

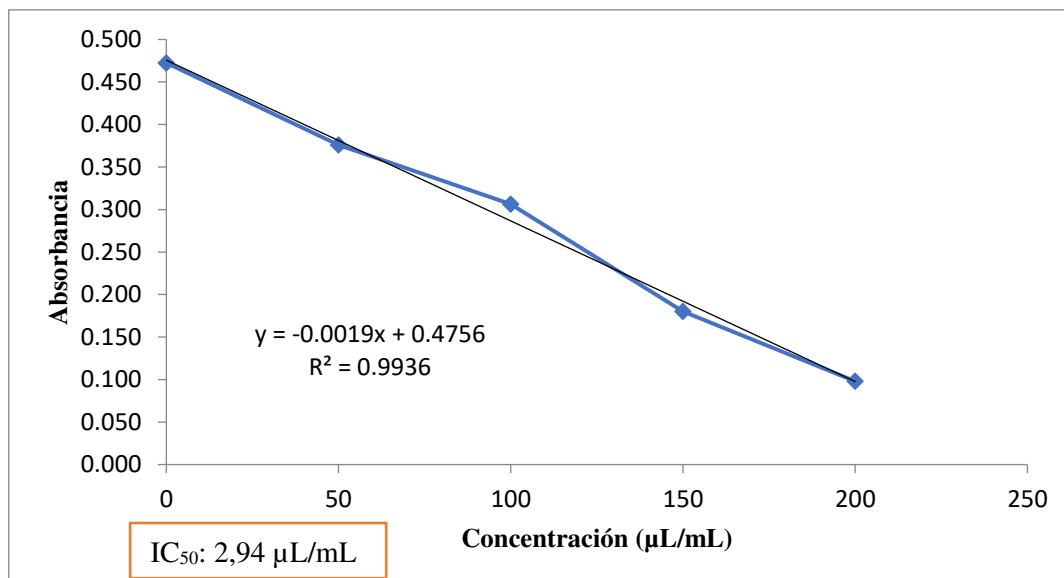


Figura 11. Curva de captación del radical DPPH de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L

Fuente propia 2023

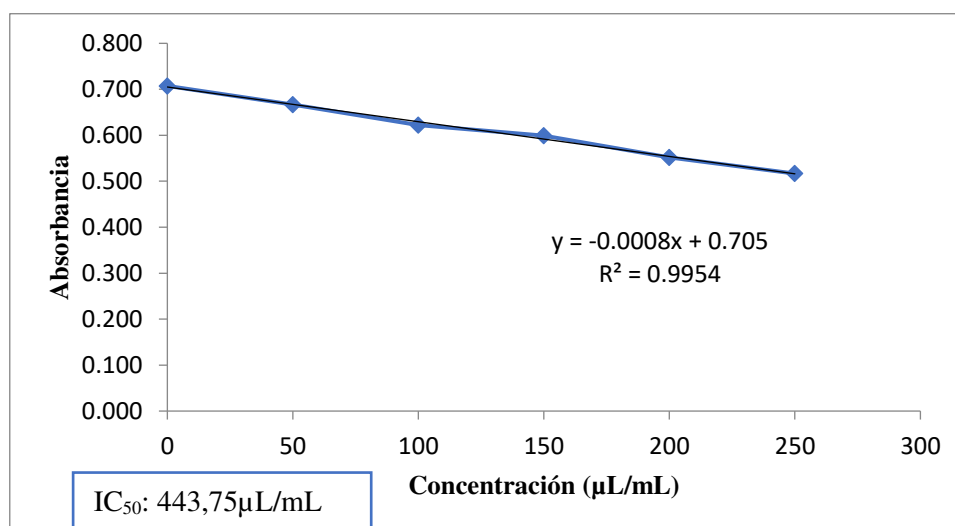


Figura 12. Curva de captación del radical ABTS<sup>+</sup> del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L.

Fuente propia 2023

### 4.3. Actividad antifúngica del aceite esencial de *R. officinalis*

Los resultados de la actividad antifúngica sobre el *Candida albicans* se muestran las figuras 13 y 14.

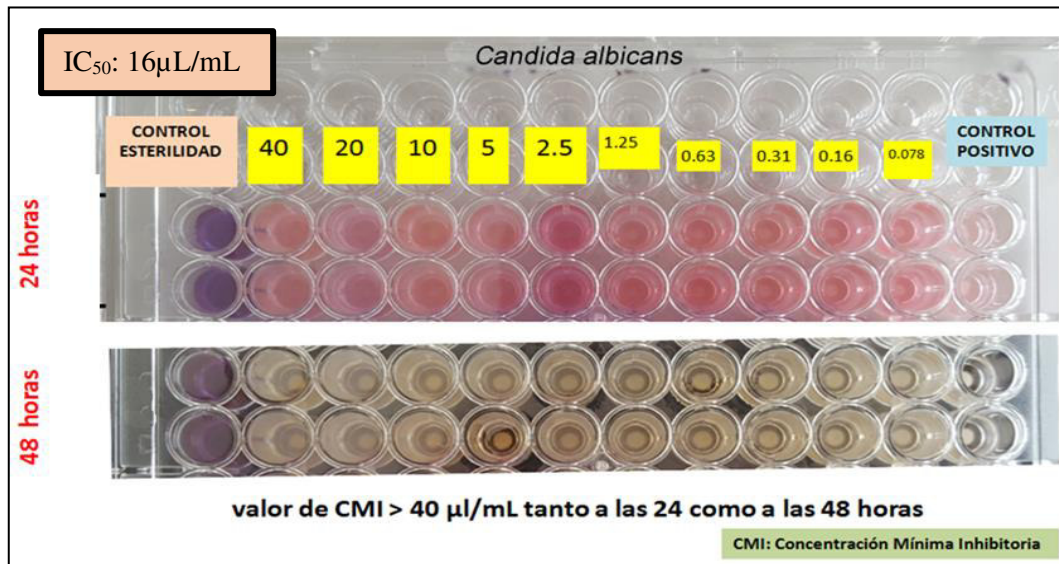


Figura 13. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. contra cepa de *Candida albicans* ATCC 10231.

Fuente propia 2023

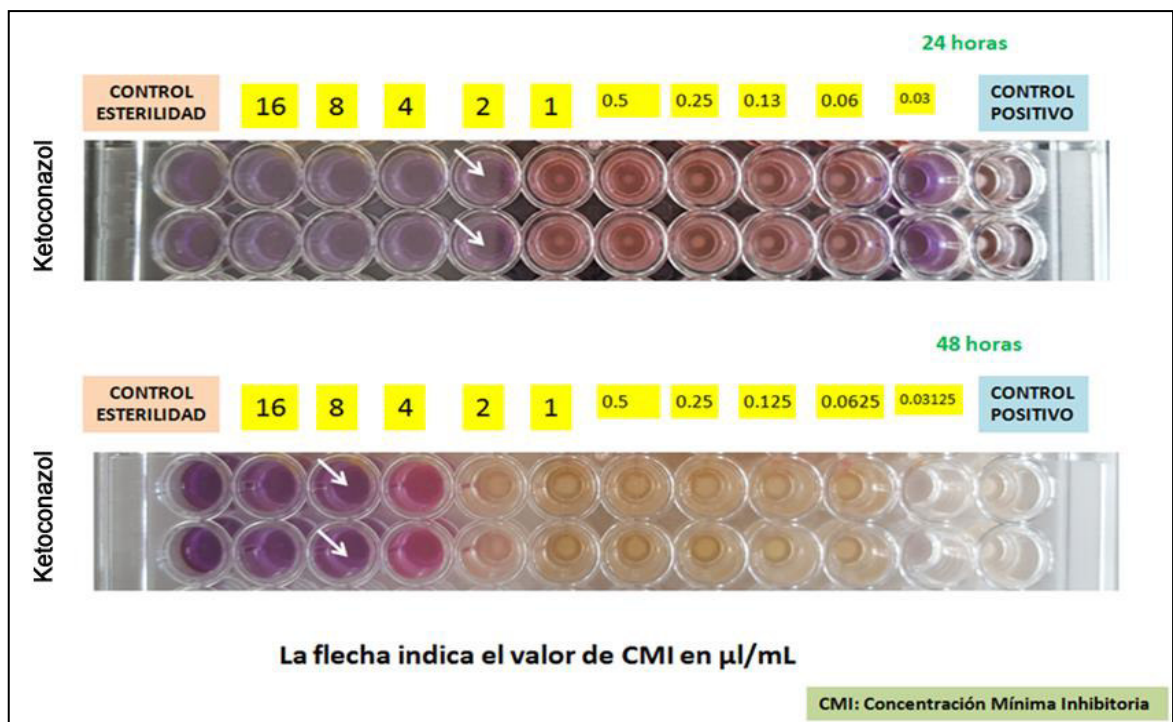
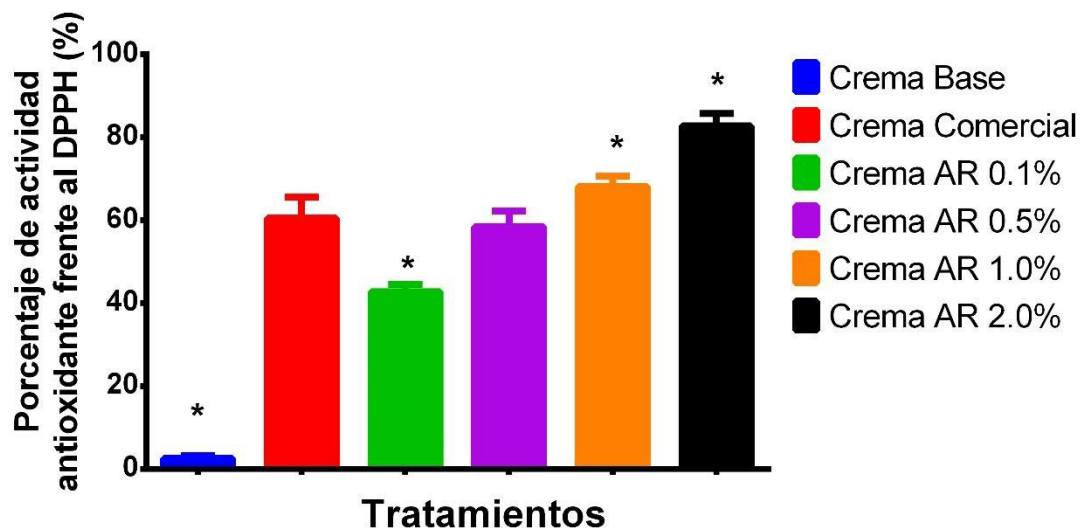


Figura 14. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del Ketoconazol contra cepa de *Candida albicans* ATCC 10231. Fuente propia 2023

#### 4.3. Actividad antioxidante de las cremas formuladas a base del aceite esencial de *R. officinalis*.

La actividad de las cremas formuladas a base del aceite esencial de *R. officinalis* tuvieron un efecto antioxidante frente al radical DPPH dependiente de la concentración, donde la crema a base del aceite esencial de romero al 2,0 % tuvo mejor efecto antioxidante con  $82,7 \pm 3,0$  % ( $P < 0.0001$ ), seguido por el de 1,0% con  $68,1 \pm 2,4$ % ( $P < 0.0001$ ). La crema con el aceite esencial a la concentración del 0,5 % no tuvo diferencia estadísticamente significativa con el grupo de la crema comercial con  $P = 0.8910$ .



**Figura 15. Determinación de la actividad antioxidante de las cremas formuladas con el aceite esencial de romero frente al radical DPPH.**  
Fuente propia 2023

La actividad de las cremas formuladas a base del aceite esencial de *R. officinalis* tuvieron un efecto antioxidante frente al radical ABTS dependiente de la concentración, donde la crema a base del aceite esencial de romero al 2,0 % tuvo mejor efecto antioxidante con  $78,3 \pm 3,0$  % ( $P < 0.0001$ ), seguido por el de 1,0% con  $62,8 \pm 1,5$ % ( $P < 0.0001$ ). La crema con el aceite esencial a la concentración del 0,5 % no tuvo diferencia estadísticamente significativa con el grupo de la crema comercial con  $P = 0.9954$ .

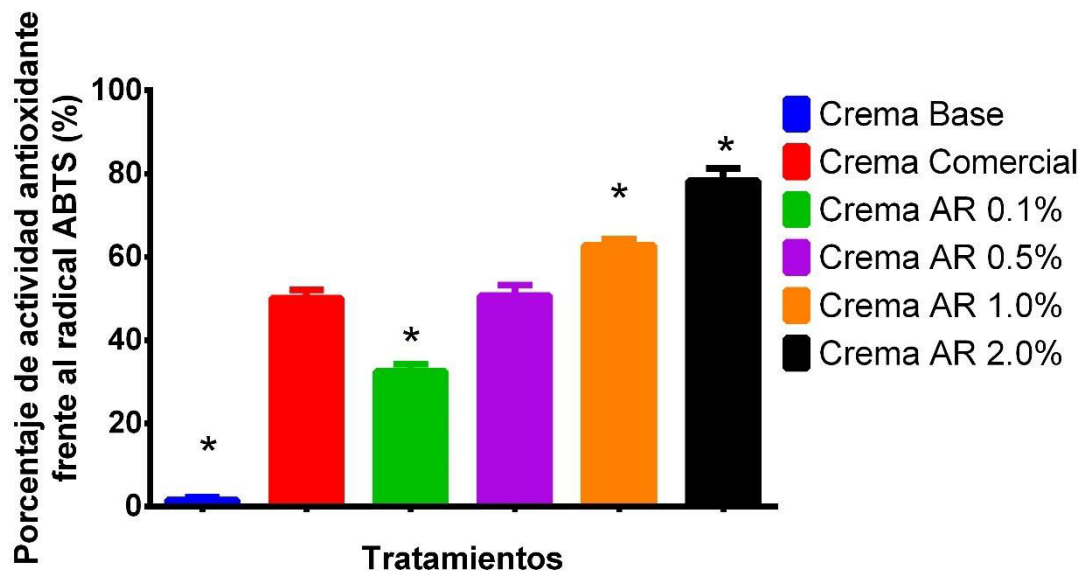


Figura 16. Determinación de la actividad antioxidante de las cremas formuladas con el aceite esencial de romero frente al radical ABTS.

Fuente propia 2023

## DISCUSIÓN

De acuerdo con nuestros resultados del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* mostrados en la tabla 5, cuatro compuestos identificados por cromatografía gaseosa acoplado a espectrometría de masas tuvieron mayor abundancia relativa los cuales fueron el cariofileno, seguido por el alcanfor, el eucaliptol (1,8-cineol) y el  $\beta$ -pineno. En otro estudio se han identificado algunos compuestos de acuerdo con la estación recolectada de la especie como el  $\beta$ -pineno, el  $\gamma$ -terpineno, el  $\alpha$ -terpinoleno y el acetato de bornilo los cuales variaron significativamente durante las 4 estaciones. El  $\beta$ -pineno y el acetato de bornilo mostraron la máxima producción durante la primavera, mientras que la menor se encontró en otoño; el  $\gamma$ -terpineno y terpinoleno mostraron la mayor producción durante el verano, mientras que los valores mínimos se encontraron en invierno y otoño, respectivamente. Además, los porcentajes relativos de  $\alpha$ -terpinoleno y acetato de bornilo están influenciados tanto por la adhesión como por las condiciones estacionales. Según estos datos, parece que la adhesión y las condiciones ambientales afectan la composición de AE tanto del compuesto principal como del secundario <sup>29</sup>.

Por otro lado, nuestros resultados son similares a otros estudios donde algunos de nuestros compuestos identificados por CG-EM han sido también identificados como el 1,8-cineol (5,63–26,89%), alcanfor (1,66–24,82%) y  $\alpha$ -pineno (14,69–20,81%) <sup>30</sup>. Mientras el  $\alpha$ -pineno (54,8%) y 1,8-cineol (22,2%) fueron los componentes más representativos en una muestra de aceite esencial de romero de procedencia iraní <sup>31</sup>. En el trabajo de Ati-Santos, el aceite de romero procedente de Brasil tuvo como compuestos principales al alfa-pineno (40,55 a 45,10%), 1,8-cineol (17,40 a 19,35%), canfeno (4,73 a 6,06%), verbenona (2,32 a 3,86%) y borneol (2,24 a 3,10%). Otros componentes se encontraron en menor cantidad (< 2%) <sup>31</sup>.

Con respecto a la actividad antioxidante *in vitro* se trabajó frente a dos radicales libres como son el DPPH y el ABTS, demostrando una capacidad de eliminación de radicales DPPH relativamente alta con un valor de IC<sub>50</sub> de 2,94  $\mu$ L/mL para el radical del DPPH y de 443,75  $\mu$ L/mL para el radical ABTS. Nuestros resultados están de acuerdo con datos previos informados sobre la actividad antioxidante de los aceites esenciales de romero. La actividad eliminadora de radicales libres y la composición química del aceite que investigamos también fueron similares a las del aceite esencial obtenido del romero cultivado en el suroeste de Túnez, como se demostró en el estudio de Kadri et al <sup>32</sup>. Los valores de IC<sub>50</sub> generalmente varían considerablemente entre los estudios, lo

que puede explicarse por las diferentes composiciones químicas de los aceites esenciales de romero. Recientemente se ha demostrado que el quimiotipo de aceites esenciales de romero ricos en mirceno tiene la mayor actividad antioxidante <sup>33</sup>. En el estudio destinado a evaluar y comparar las propiedades eliminadoras de radicales libres del aceite esencial de romero con tres de sus componentes (1,8-cineol,  $\alpha$ -pineno y  $\beta$ -pineno), el AE exhibió un valor de IC<sub>50</sub> más bajo y, por lo tanto, una mayor actividad antioxidante que todos sus componentes. y también que el antioxidante sintético hidroxitolueno butilado (BHT) <sup>34</sup>. Esto significa que, además de los compuestos principales, los componentes menores también pueden contribuir significativamente a la actividad del aceite esencial de romero. En otro estudio, se probaron las propiedades antioxidantes de los aceites esenciales de cinco plantas ampliamente utilizadas en la dieta mediterránea (orégano, tomillo, clavo, salvia y romero), utilizando seis métodos *in vitro*, y los resultados mostraron que el aceite esencial de romero tenía la mayor capacidad quelante del hierro <sup>35</sup>.

En estudio publicado el aceite esencial de *R. officinalis* presentó CIM entre 0,62 mg/mL y 2,50 mg/mL y MFC entre 1,25 mg/mL y 2,50 mg/mL cuando se administró a *C. albicans* y *C. tropicalis*. Mientras en el estudio de demostraron la actividad antifúngica del aceite esencial de *R. officinalis*. Ambos investigadores demostraron actividad fungistática a concentraciones superiores al 8% utilizando la técnica de difusión en agar. En la evaluación de la actividad antifúngica de productos naturales, la técnica de microdilución es más sensible para identificar CIM (Concentración Mínima Inhibitoria) y CMF (Concentración Mínima de Fungicida) <sup>36</sup>.



## CONCLUSIONES

1. El aceite esencial de romero presentó compuestos volátiles como el cariofileno, seguido por el alcanfor, el eucaliptol (1,8-cineol) y el  $\beta$ -pineno.
2. El aceite esencial de romero tuvo actividad antioxidante frente al radical DPPH a una concentración de 2 uL/mL y de 413 uL/mL para el radical ABTS.
3. La concentración mínima inhibitoria del aceite esencial fue de 1.25  $\mu$ L/mL a las 24 horas y de 20  $\mu$ L/mL a las 48 horas, lo que indica una actividad fungistática moderada a débil contra *Candida albicans* ATCC 10231.
4. La formulación seleccionada y que incorporó el aceite esencial de romero a unas concentraciones de 0.1, 0,5, 1 y 2% fue la más estable y con características de extensibilidad adecuadas.
5. La formulación con una concentración del 2% del aceite esencial de romero tuvo la actividad antioxidante más intensa frente a los radicales DPPH y ABTS.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Elshafie HS, Mancini E, Camele I, Martino L De, De Feo V. In vivo antifungal activity of two essential oils from Mediterranean plants against postharvest brown rot disease of peach fruit. *Ind Crops Prod*. 2015 Feb 1;66:11–5.
2. Rashed AA, Rathi DNG, Nasir NAHA, Rahman AZA. Antifungal Properties of Essential Oils and Their Compounds for Application in Skin Fungal Infections: Conventional and Nonconventional Approaches. *Molecules* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2023 Dec 1];26(4). Available from: [/pmc/articles/PMC7922942/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35422942/)
3. Nazzaro F, Fratianni F, De Martino L, Coppola R, De Feo V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*. 2013 Nov 25;6(12):1451–74.
4. Puškárová A, Bučková M, Kraková L, Pangallo D, Kozics K. The antibacterial and antifungal activity of six essential oils and their cyto/genotoxicity to human HEL 12469 cells. *Scientific Reports* 2017 7:1 [Internet]. 2017 Aug 15 [cited 2023 Dec 1];7(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-017-08673-9>
5. Abdi-Moghadam Z, Mazaheri Y, Rezagholizade-shirvan A, Mahmoudzadeh M, Sarafraz M, Mohtashami M, et al. The significance of essential oils and their antifungal properties in the food industry: A systematic review. *Heliyon*. 2023 Nov 1;9(11):e21386.
6. Macwan SR, Dabhi BK, Aparnathi KD, Prajapati JB. Essential Oils of Herbs and Spices: Their Antimicrobial Activity and Application in Preservation of Food. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*. 2016 May 15;5(5):885–901.
7. Lagha R, Abdallah F Ben, AL-Sarhan BO, Al-Sodany Y. Antibacterial and Biofilm Inhibitory Activity of Medicinal Plant Essential Oils Against *Escherichia coli* Isolated from UTI Patients. *Molecules* [Internet]. 2019 [cited 2023 Aug 5];24(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30909573/>
8. El-Demerdash FM, El-Sayed RA, Abdel-Daim MM. *Rosmarinus officinalis* essential oil modulates renal toxicity and oxidative stress induced by potassium dichromate in rats. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2021 Sep 1;67:126791.
9. Amaral GP, Mizdal CR, Stefanello ST, Mendez ASL, Puntel RL, de Campos MMA, et al. Antibacterial and antioxidant effects of *Rosmarinus officinalis* L. extract and its fractions. *J Tradit Complement Med* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2023 Aug 5];9(4):383–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31453135/>
10. Macedo LM de, Santos ÉM dos, Ataide JA, Silva GT de S e., Guarnieri JP de O, Lancellotti M, et al. Development and Evaluation of an Antimicrobial Formulation Containing *Rosmarinus officinalis*. *Molecules* [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2023 Aug 5];27(16). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36014289/>
11. Hussain AI, Anwar F, Chatha SAS, Jabbar A, Mahboob S, Nigam PS. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Braz J Microbiol* [Internet]. 2010 [cited 2023 Aug 5];41(4):1070–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24031588/>

12. Kumar V, Mathela CS, Kumar M, Tewari G. Antioxidant potential of essential oils from some Himalayan Asteraceae and Lamiaceae species. *Med Drug Discov.* 2019 Mar 1;1:100004.
13. Guleria S, Tiku AK, Koul A, Gupta S, Singh G, Razdan VK. Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Essential Oil and Extracts of *Zanthoxylum alatum* Grown in North-Western Himalaya. *The Scientific World Journal* [Internet]. 2013 [cited 2023 Dec 1];2013. Available from: [/pmc/articles/PMC3679694/](https://pmc/articles/PMC3679694/)
14. Farias PKS, Lopes Silva JCR, de Souza CN, da Fonseca FSA, Brandi IV, Martins ER, et al. Antioxidant activity of essential oils from condiment plants and their effect on lactic cultures and pathogenic bacteria. *Ciência Rural* [Internet]. 2019 Feb 28 [cited 2023 Dec 1];49(2):e20180140. Available from: <https://www.scielo.br/j/cr/a/RKCSxyMsChg36jSyHWXzj3q/>
15. Kedare SB, Singh RP. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *J Food Sci Technol* [Internet]. 2011 Aug [cited 2023 Dec 1];48(4):412. Available from: [/pmc/articles/PMC3551182/](https://pmc/articles/PMC3551182/)
16. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol 22, Page 3380 [Internet]. 2021 Mar 25 [cited 2023 Nov 20];22(7):3380. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/7/3380/htm>
17. Baliyan S, Mukherjee R, Priyadarshini A, Vibhuti A, Gupta A, Pandey RP, et al. Determination of Antioxidants by DPPH Radical Scavenging Activity and Quantitative Phytochemical Analysis of *Ficus religiosa*. *Molecules* [Internet]. 2022 Feb 1 [cited 2023 Dec 3];27(4). Available from: [/pmc/articles/PMC8878429/](https://pmc/articles/PMC8878429/)
18. Ilyasov IR, Beloborodov VL, Selivanova IA, Terekhov RP. ABTS/PP Decolorization Assay of Antioxidant Capacity Reaction Pathways. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2023 Dec 1];21(3). Available from: [/pmc/articles/PMC7037303/](https://pmc/articles/PMC7037303/)
19. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999 May 1;26(9–10):1231–7.
20. Apak R, Özyürek M, Güçlü K, Çapanoğlu E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and Lipid Peroxidation Assays. *J Agric Food Chem.* 2016 Feb 10;64(5):1028–45.
21. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999 May;26(9–10):1231–7.
22. Borges RS, Ortiz BLS, Pereira ACM, Keita H, Carvalho JCT. *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *J Ethnopharmacol.* 2019 Jan 30;229:29–45.
23. Rahbardar MG, Hosseinzadeh H. Therapeutic effects of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and its active constituents on nervous system disorders. *Iran J Basic*

- Med Sci [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2023 Dec 1];23(9):1100. Available from: /pmc/articles/PMC7491497/
24. Hussain AI, Anwar F, Chatha SAS, Jabbar A, Mahboob S, Nigam PS. Rosmarinus officinalis essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. Brazilian Journal of Microbiology [Internet]. 2010 [cited 2023 Dec 1];41(4):1070. Available from: /pmc/articles/PMC3769777/
  25. Szumny A, Figiel A, Gutiérrez-Ortiz A, Carbonell-Barrachina ÁA. Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method. J Food Eng. 2010 Mar 1;97(2):253–60.
  26. Alvarado-García PAA, Soto-Vásquez MR, Rosales-Cerquin LE, Benites SM, Cubas-Romero TL, Jara-Aguilar DR, et al. Effect of *Rosmarinus Officinalis* Essential Oil On Anxiety, Depression, And Sleep Quality. Pharmacognosy Journal. 2023 Mar 1;15(2):343–9.
  27. Ciurea CN, Kosovski IB, Mare AD, Toma F, Pinteá-Simon IA, Man A. Candida and Candidiasis—Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. Microorganisms 2020, Vol 8, Page 857 [Internet]. 2020 Jun 6 [cited 2023 Dec 1];8(6):857. Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/6/857/htm>
  28. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, et al. Candida albicans—The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. Journal of Fungi [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2023 Dec 1];7(2):1–19. Available from: /pmc/articles/PMC7912069/
  29. Melito S, Petretto GL, Chahine S, Pintore G, Chessa M. Seasonal variation of essential oil in *rosmarinus officinalis* leaves in sardinia. Nat Prod Commun [Internet]. 2019 Jul 23 [cited 2023 Dec 1];14(7). Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1934578X19864005>
  30. Bajalan I, Rouzbahani R, Pirbalouti AG, Maggi F. Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. Ind Crops Prod. 2017 Nov 15;107:305–11.
  31. Bajalan I, Rouzbahani R, Pirbalouti AG, Maggi F. Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. Ind Crops Prod. 2017 Nov 15;107:305–11.
  32. Kadri A, Zarai Z, Chobba I Ben, Békir A, Gharsallah N, Damak M, et al. Chemical constituents and antioxidant properties of *rosmarinus officinalis* L. essential oil cultivated from South-Western Tunisia. Journal of Medicinal Plants Research [Internet]. 2011 Nov 9 [cited 2023 Dec 1];5(25):5999–6004. Available from: <https://ksascholar.dri.sa/en/publications/chemical-constituents-and-antioxidant-properties-of-rosmarinus-of>
  33. Ojeda-Sana AM, van Baren CM, Elechosa MA, Juárez MA, Moreno S. New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. Food Control. 2013 May 1;31(1):189–95.
  34. Wang W, Wu N, Zu YG, Fu YJ. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. Food Chem [Internet]. 2008 Jun 1

[cited 2023 Dec 1];108(3):1019–22. Available from:  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26065766/>

35. Viuda-Martos M, Ruiz Navajas Y, Sánchez Zapata E, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. *Flavour Fragr J* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2023 Dec 1];25(1):13–9. Available from:  
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ffj.1951>
36. Cavalcanti YW, De Fátima D, De Almeida L, Padilha WWN. Anti-adherent activity of *Rosmarinus officinalis* essential oil on *Candida albicans*: an SEM analysis. *Revista Odonto Ciência* [Internet]. 2011 [cited 2023 Dec 1];26(2):139–44. Available from:  
<https://www.scielo.br/j/roc/a/QPVWBLwf3zjspCwNMvTPZLc/?lang=en>

## ANEXOS

### ANEXO1: Clasificación taxonómica de la especie vegetal estudiada

**JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ**  
**CONSULTOR BOTÁNICO**  
C. B. P. 3796  
Cel: 963689079  
Email: jocamde@gmail.com



### **CERTIFICACION DE IDENTIFICACION BOTANICA**

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO. CBP 3796 – INSCRITO EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIONES DE IDENTIFICACION TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA – RESOLUCIÓN DIRECTORAL N.º 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

#### **CERTIFICA:**

Que, el profesor **JAUREGUI MALDONADO José Fidel**, estudiante de la Maestría de Farmacología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos., con fines de investigación ha solicitado la identificación y certificación botánica de una planta cultivada conocida con el nombre vulgar de “romero”, la muestra ha sido estudiada y se identificó como *Rosmarinus officinalis* L. Según la base de datos de W<sup>3</sup>Tropicos del Missouri Botanical Garden que sigue el sistema moderno de clasificación de las angiospermas (APG), publicado en 1998 por el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas, revisado por APG II (2003), APG III (2009), actualizado por APG IV (2016), este sistema APG evita el uso de la nomenclatura taxonómica clásica por arriba de orden. Y Chase & Reveal en APG III (2009) consideran a todas las plantas verdes en la Clase Equisetopsida. Teniendo en cuenta los datos de W<sup>3</sup>Tropicos y el Sistema APG, para la especie identificada se adapta las siguientes categorías taxonómicas y clados:

Reino: Plantae  
División: Angiospermas  
Clase: Equisetopsida  
Subclase: Magnoliidae  
Orden: Lamiales  
Familia: Lamiaceae  
Género: Rosmarinus  
Especie: *Rosmarinus officinalis* L.

Nombres vulgares: “romero”

Se expide la presente certificación a solicitud del interesado para fines de investigación.

Lima, 03 de julio del 2023

  
José R. Campos De La Cruz  
BIÓLOGO  
C.B.P. 3796

Jr. Sánchez Silva 156 – Piso 2–Urb. Santa Luzmila –Lima 07 -Lima

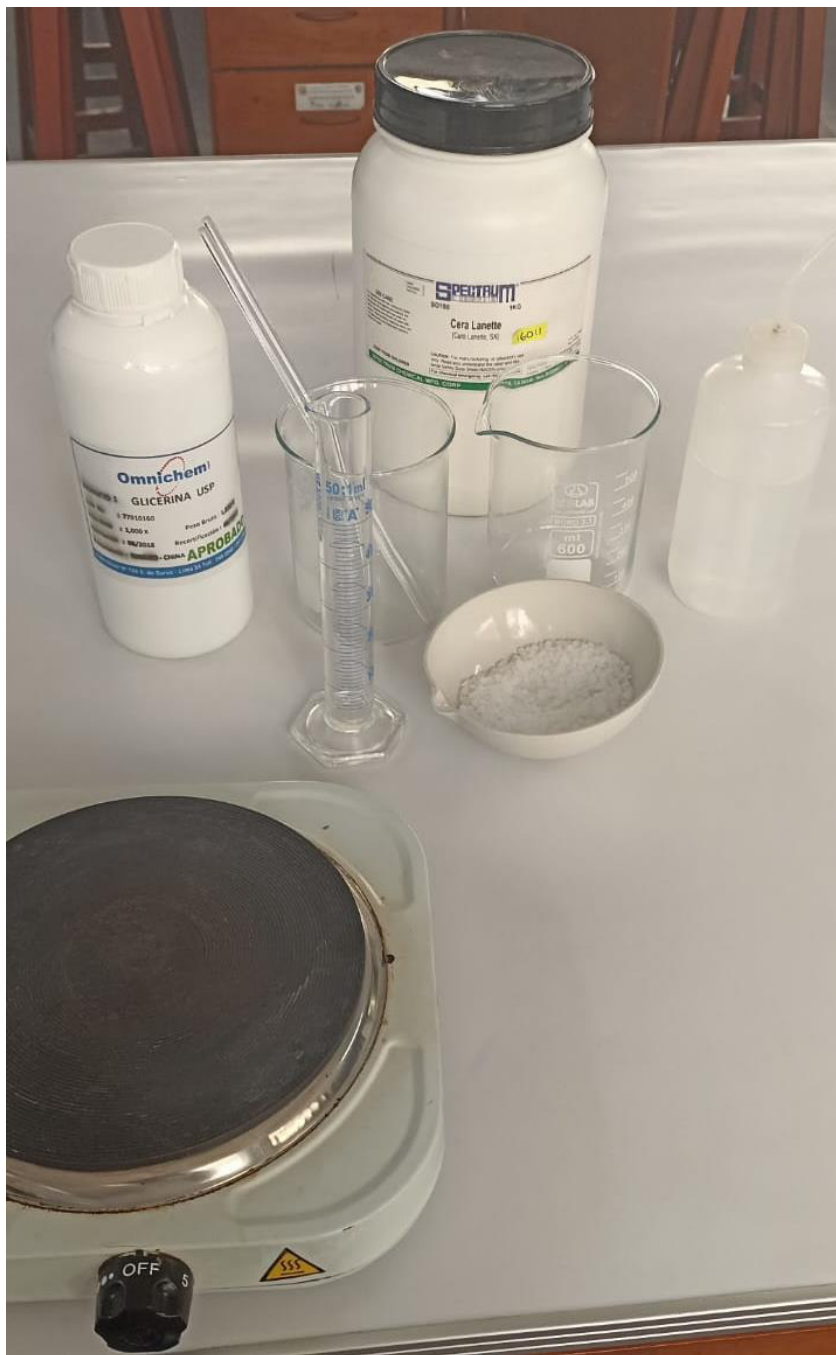


Fig.01.- Materiales usados en la preparación de las formulaciones



Fig. 02.- Agitador de 4 hélices.



Fig. 03.- Calentamiento de agua y fusión de la fase lipídica



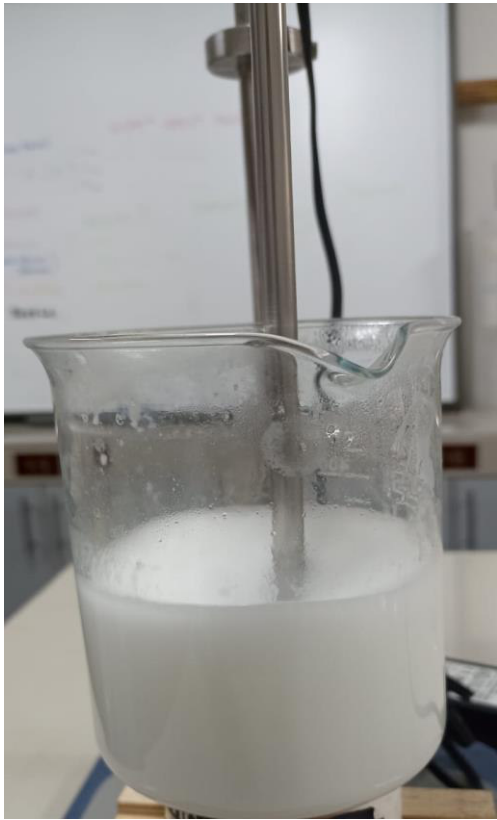


Fig.04.- Mezcla de fase interna y externa



Fig.05.- Formulación I



Fig.06.- Formulación II



Fig. 07. Formulación I lista para envasar



Fig.08.- Formulación II, lista para envasar