



**UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO**

**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS  
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA**

**Efecto sinérgico antifúngico in vitro del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* y  
clotrimazol sobre *Trichophyton rubrum***

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

**AUTORA:**

**Susel Ravello Alayo (ORCID: 0000-0003-4799-2273)**

**ASESORES:**

**Dra. Llaque Sánchez, María Rocío del Pilar (ORCID: 0000-0002-6764-4068)**

**Mg. Polo Gamboa, Jaime Abelardo (ORCID: 0000-0002-3768-8051)**

**Dra. Irma Luz Yupari Azabache (ORCID: 0000-0002-0030-0172)**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:**

**Enfermedades Infecciosas y Transmisibles**

Trujillo – Perú

2019

## **Dedicatoria**

Este trabajo está dedicado a mi familia, especialmente a mis padres y hermanos por todo el apoyo y cariño brindado para la realización de este trabajo de investigación. Su apoyo moral y económico, fueron esencial para poder culminar este sueño realizado por todos, que es haber estudiado Medicina Humana. Tuve a las personas correctas en mi vida. Gracias doctores y a las personas que me estiman, por siempre estar pendientes de mi, en este largo camino, y sé que estarán conmigo en cada logro. Dios hizo su parte y yo la mía.

## **Agradecimiento**

Agradezco a Dios por la vida y la salud que aún me brinda, por permitirme cumplir cada logro que voy adquiriendo con el pasar de los días.

A mis asesores, tanto a la Dra. María Rocío Llaque por su paciencia, y por ser estricta con este trabajo de investigación, sin sus consejos, sus correcciones, esto no hubiera sido posible, al igual que a mi asesor Mg. Jaime Polo Gamboa por corregirme en la realización de mi trabajo, por apoyarme, enseñarme, y darse su tiempo para la realización de este trabajo de investigación.

A la Universidad César Vallejo, por abrirnos su casa de estudio, para poder desarrollarnos como profesionales en la salud, por brindarnos sus aulas y laboratorio para la elaboración de mi trabajo.

*Ravello Alayo Susel*

El jurado encargado de evaluar la tesis presentada por don (a)  
Susei Ravello Alayo  
 cuyo título es: Efecto Sinérgico antifúngico in vitro del  
aceite esencial de Rosmarinus Officinalis y Clostrimazol  
Sobre Trichophyton rubrum

Reunido en la fecha, escuchó la sustentación y la resolución de preguntas por el  
 estudiante, ortográficamente calificado de: 15 (número) ..... Quince.....  
 ..... 0 /decimas..... (letras)

Lugar y fecha Trujillo 05 de diciembre del 2019



.....  
 MG. Ricci Ponce de López  
 PRESIDENTE



.....  
 Dra. María Rocío del Pilar Llaque Sánchez  
 SECRETARIO



.....  
 Mg. Jaime Abelardo Polo Gamboa.  
 VOCAL

|         |                            |        |                     |        |                                 |
|---------|----------------------------|--------|---------------------|--------|---------------------------------|
| Elaboró | Dirección de Investigación | Revisó | Responsable del SGC | Aprobó | Vice Rectorado de Investigación |
|---------|----------------------------|--------|---------------------|--------|---------------------------------|

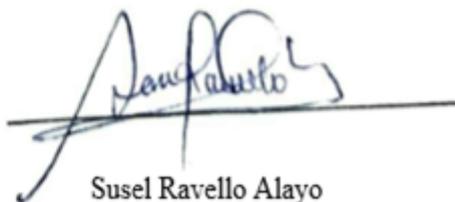
### **Declaratoria de Autenticidad**

Yo, Susel Ravello Alayo con DNI N° 75109237 a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Medicina, declaro bajo juramento que toda la documentación que acompaño es veraz y auténtica.

Así mismo, declaro también bajo juramento que todos los datos e información que se presenta en la presente tesis son auténticos y veraces.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas de la Universidad César Vallejo.

Trujillo, diciembre de 2019



Susel Ravello Alayo

## **PRESENTACIÓN**

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: “**Efecto sinérgico antifúngico in vitro del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* y clotrimazol sobre *Trichophyton rubrum***”, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Médico Cirujano.

**Ravello Alayo, Susel**

## Índice

|  |      |
|--|------|
| Dedicatoria.....   | ii   |
| Agradecimiento .....   | iii  |
| Acta de aprobación de tesis .....  | iv   |
| Declaratoria de autenticidad .....   | v    |
| Presentación.....  | vi   |
| Índice .....   | vii  |
| RESUMEN .....  | viii |
| ABSTRACT .....   | ix   |
| <br>   |      |
| I. INTRODUCCIÓN .....  | 1    |
| <br>   |      |
| II. MÉTODO .....   | 10   |
| 2.1. Tipo y diseño de investigación .....  | 10   |
| 2.2. Operacionalización de variables. ....   | 11   |
| 2.3. Población, muestra y muestreo .....   | 12   |
| 2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad..... | 13   |
| 2.5. Procedimiento .....   | 13   |
| 2.6. Método de análisis de datos .....   | 13   |
| 2.7. Aspectos éticos .....   | 14   |
| <br>   |      |
| III. RESULTADOS .....  | 15   |
| IV. DISCUSIÓN .....  | 18   |
| V. CONCLUSIONES .....  | 20   |
| VI. RECOMENDACIONES.....   | 21   |
| REFERENCIAS .....  | 22   |
| ANEXOS .....   | 28   |

## RESUMEN

En este trabajo el objetivo fue evaluar el efecto antifúngico del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero”, el clotrimazol y la sinergia de ambos, sobre *Trichophyton rubrum*. Se diseñó un estudio experimental in vitro. Se obtuvo el aceite esencial por el método de arrastre con vapor de agua y se evaluó mediante el método de difusión con pozos en agar; formando 4 grupos: aceite esencial de romero + clotrimazol; aceite esencial de romero; clotrimazol y DMSO, realizándose 10 repeticiones por cada grupo. Se observó que la asociación de *Rosmarinus officinalis* y clotrimazol formó un halo de inhibición de 34,4mm, el aceite esencial de romero formó 23,4mm y el clotrimazol 32,30 mm. La prueba de ANOVA indica que existe diferencias significativas ( $p=0,0000$ ) entre los efectos antifúngicos de los grupos. Además, la prueba HSD Tukey indica que cada efecto es diferente uno del otro. Se concluye que la combinación de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* con clotrimazol tiene mayor efecto sinérgico antifúngico contra *Trichophyton rubrum* que el clotrimazol sólo.

**Palabras clave:** Agentes antifúngicos, aceites esenciales, *Rosmarinus officinalis*, *Trichophyton*.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antifungal effect of *Rosmarinus officinalis* "rosemary" essential oil, clotrimazole and their synergy on *Trichophyton rubrum*. This was an experimental in vitro study. The essential oil was obtained using the steam distillation method and it was evaluated using the agar diffusion test. Four groups were formed: rosemary essential oil + clotrimazole; rosemary essential oil; clotrimazole and DMSO; 10 repetitions were performed for each group. The zones of inhibition obtained were: *Rosmarinus officinalis* and clotrimazole 34.4mm, rosemary essential oil 23.4mm and clotrimazole 32.30 mm. The ANOVA test indicates that there are significant differences ( $p=0.0000$ ) between the antifungal effects of the groups. Also, Tukey HSD test indicates that each effect is different from each other. It is concluded that the combination of *Rosmarinus officinalis* essential oil with clotrimazole has a greater synergistic antifungal effect on *Trichophyton rubrum* than clotrimazole alone.

**Keywords:** Antifungal agents, essential oils, *Rosmarinus officinalis*, *Trichophyton*.

## I. INTRODUCCIÓN

Los agentes que ocasionan infecciones micóticas dérmicas superficiales son principalmente los dermatofitos. Estos hongos patógenos abarcan muchas especies entre ellos se encuentra el *Trichophyton Rubrum*. Provocando problemas a nivel cutáneo y anexos, cabellos, vellos y uñas, produciendo infecciones severas y crónicas denominadas dermatofitosis, a las cuales también se les denomina tiñas. La OMS indica que existe 10% a 20% de riesgo de adquirir una infección por dermatofitos durante la vida de una persona. Las enfermedades de la piel a nivel mundial son las mas comunes, tienen la prevalencia mucho más alta que las reportadas. (1)

Se estima que entre el 13.8 y el 20% de la población mundial ha tenido una infección por dermatofitos y aproximadamente el 12-13% tiene onicomycosis. En algunos lugares, más del 50% de los niños pueden estar infectado por tiña capitis, de forma similar, existen reportes que más del 40% de la población padece de tiña pedis, en algunos países europeos. La infección por dermatofitos es más común en niños que en adultos. (2)

A nivel mundial, el dermatofito *Trichophyton rubrum* es la causa principal de tiña pedis y onicomycosis. Por lo tanto la onicomycosis constituye un importante problema de salud pública la morbilidad asociada. La prevalencia de onicomycosis es tan alta como el 23% en toda Europa y el 20% en Asia oriental. En América del Norte, la incidencia de onicomycosis es de hasta el 14%, y la infección micótica es responsable del 50% de todas las enfermedades de las uñas. El tratamiento de dermatofitosis es un problema de salud pública de mucha importancia que requiere constante revisión e investigación de nuevas alternativas de tratamiento, además que presenta un alto costo ,debido que la onicomycosis es más difícil de tratar que la mayoría de las dermatofitosis por su crecimiento lento inherente de la uña. (3)

La incidencia de dermatofitos superficiales son elevadas en América Latina. Se realizó un estudio donde se encontró que la micosis superficial en 285 pacientes, 150 (52.63%) fueron en niños de 8 años(4). En Colombia, el *Trichophyton*

*rubrum*, tuvo un 32,4 % (5). En Brasil, un estudio informo 9048 casos de dermatofitosis, 14214 casos de micosis superficiales, entre ellos la onicomycosis de pies , provocado por *Trichophyton rubrum*. (6)

Un estudio de 30 años realizado en Lima- Peru, reportan que analizaron 12990 casos de dermatomycosis, en donde dio como resultado que los pacientes menores de 30 años fueron los más afectados (42,7%) y en mujeres (52,1%). Encontraron que la onicomycosis fue la mas frecuente (43,6%).El dermatofito que mayor destaco fue *Trichophyton rubrum* (33,2%). (7) Desarrollaron un estudio en el distrito de La Esperanza, Trujillo, donde se evidencio que menores de 9 años con dermatofitosis el 77.4% tienen animales domesticos en su hogar. (8)

Por otro lado, son muchos los estudios que investigan la susceptibilidad de *Trichophyton rubrum* frente compuestos de plantas medicinales, como el *Rosmarinus officinalis* “romero”. Esto tiene importancia médica porque dan a conocer agentes antifúngicos naturales, como alternativa a los fármacos antifúngicos convencionales contra este patógeno, uno de los dermatofitos más comunes que generan micosis superficiales en nuestra comunidad.

**Sudan P et al (India, 2019)**, realizaron una investigación cuya finalidad fue observar el efecto antifúngico con extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* contra *Trichophyton rubrum*. Con el método de difusión en pozo de agar se obtuvo una actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico del 5% y 10%,. Observaron que *Rosmarinus officinalis* tenía 86,09% de inhibición del crecimiento micelial. Se obtuvo halos de inhibición de 27 mm concluyendo que es efectivo el extracto hidroalcohólico al 10% contra *T. rubrum*. (9)

**Mekonnen A et al (Etiopía, 2016)**, realizo una investigación donde se evaluó la actividad antimicrobiana in vitro de *R. officinalis* contra bacterias y hongos. Utilizando el método de difusión en agar evaluaron la actividad de los aceites esenciales. Encontrando que el aceite esencial de *R. officinalis* tuvo efecto antifúngico contra *Trichophyton spp.* formando una zona de inhibición de 28,6±1,2 mm de diámetro. Concluyendo que el *R. officinalis* como aceite esencial tenia mayor acción antifungica que los demás aceites evaluados. (10)

**Guerra L et al (México, 2015)**, llevo a cabo un estudio en donde la actividad antifúngica y composición de aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis* Midieron mediante un ensayo de difusión en agar. Demostrando que no mostro actividad antifúngica, por lo que no inhibió el crecimiento de los dermatofitos. Concluyeron que el *R. officinalis* no tiene efecto antifúngico. (11)

**Papajani V et al (Italia, 2015)**, hicieron una investigación donde se comparo la actividad antifúngica del *Rosmarinus officinalis*. Evaluando por método de difusión en disco la actividad antimicótica del aceite esencial de *Trichophyton rubrum*. Resultados: Observaron que la actividad antifúngica del *R. officinalis* exhibe actividad antifúngica contra *T. rubrum* (38,21mm). Finalizando que el *Rosmarinus officinalis* tiene mayor actividad antifúngica solo sobre algunos dermatofitos. (12)

**Sukandar E et al (Indonesia, 2017)**, desarrollaron un estudio con el propósito de evaluar algunas hierbas extraídas de Indonesia con actividad antifúngica. Seleccionaron 11 hierbas estableciendo la concentración inhibitoria mínima y la concentración fungicida mínima de los extractos de las hojas (*Rosmarinus officinalis*) y de las otras 10 hierbas, mediante métodos de microdilución y difusión por agar. Luego, combinaron los extractos para evaluar otras actividades. Encontraron que el extracto etanólico de hojas de romero (*R. officinalis*) tuvo reacción antifúngica contra *Trichophyton Rubrum*, alcanzando una zona de inhibición de  $14,6 \pm 0,27$  mm. Se determino que el romero, tuvo la mayor potencia antifúngica, comparable a ketoconazol como fármaco de referencia. (13)

**Ibrahim S et al (Egipto, 2015)**, Evaluaron la actividad antimicótica de veintiséis aceites esenciales comerciales derivados de plantas contra *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. Evaluaron la concentración inhibitoria mínima (CIM) de aceites extraídos puros y combinados. Los resultados revelaron que el efecto de *Rosmarinus officinalis* a 4µl/ml, inhibió el crecimiento moderadamente de *Trichophyton rubrum*. La MIC estaba a 50 µg/disco para aceites puros. Concluyeron que los aceites esenciales son eficaces y seguras para el control de los dermatofitos patógenos. (14)

**Mikaeili A et al (Irán, 2016)**, realizaron un estudio con la finalidad de investigar los efectos antifúngicos del romero. Prepararon extractos acuosos e hidroalcohólicos de hojas de romero. observaron que ambos extractos mostraron efectos antifúngicos. El extracto hidroalcohólico tuvo una concentración inhibitoria mínima de 10mg/ml para *Trichophyton yoncurans* y 5mg/ml para *Microsporum canis*. Concluyeron que el extracto hidroalcohólico fue más eficaz que el extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis*, sobre los dos dermatofitos. (15)

**Endo E et al (Brasil, 2015)**, investigaron la actividad de los extractos hidroalcohólicos de *R. officinalis* contra *Trichophyton rubrum*. Evaluaron el extracto hidroalcohólico de *R. officinalis* contra especies de dermatofitos por la técnica de microdilución. *R. officinalis* fue muy activo contra los dermatofitos, y la concentración inhibitoria mínima (CIM) que se necesitó para inhibir a *T. rubrum* fue de 62,5µg/ml. Por lo tanto, afirman que *R. officinalis* es fuente potencial de nuevos compuestos para el desarrollo de fármacos antimicóticos. (16)

Los dermatofitos patógenos ocasionan las infecciones micóticas superficiales en humanos y animales, como factores predisponentes y según región geográfica. Dentro de estas infecciones, el pie de atleta es la dermatofitosis más importante a nivel mundial. La tiña no es una infección potencialmente mortal, pero se conoce como una infección irritante. Son hongos anamorfos de los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*; se distinguen entre sí por sus conidios, en especial por los macroconidios, los cuales son específicos para cada género. (17,18)

*Trichophyton rubrum* es un hongo antropofílico que se ha convertido en el dermatofito más ampliamente distribuido en humanos. Con frecuencia causa infecciones crónicas de la piel, las uñas y rara vez el cuero cabelludo. A veces pueden aparecer lesiones granulomatosas. Los gatos y los perros son las principales fuentes de infección. Los pelos invadidos muestran una infección por ectotrix. No se sabe que invada el cabello in vivo y no se han informado requerimientos específicos de crecimiento. (19)

Los dermatofitos son hongos queratinofílicos que limitan su presencia a estructuras que contienen queratina: pelos, uñas y capa córnea. Constituyen un grupo extenso y homogéneo de hongos con características taxonómicas, fisiológicas, antigénicas y patogénicas similares, y sólo presentan leves diferencias nutricionales y enzimáticas. Los propágulos que transmiten la enfermedad son artroconidios o clamidoconidios que se encuentran en los epitelios de descamación o en pelos. Se han identificado 43 especies anamorfas; casi todas viven como saprófitos del suelo; sólo 11 se consideran importantes como agentes patógenos. Los dermatofitos, según su distribución ecológica, se dividen en geofílicos (telúricos), zoofílicos y antropofílicos, y se difunden del suelo al humano, de los animales a éste o de una persona a otra, de manera directa o por medio de fómites. Los dermatofitos inician la infección por un fenómeno de adherencia a la capa córnea; después, estos elementos germinan y empiezan la invasión de los queratinocitos; la infección se confina al estrato córneo y los anexos; de manera excepcional afecta la capa granulosa. (18,20,21)

Muchos animales salvajes y domésticos, incluidos perros y gatos, están infectados con ciertas especies de dermatofitos y representan un gran reservorio para la infección de humanos. Los dermatofitos requieren de unos días a una semana o más para iniciar el crecimiento. La mayoría crece mejor a 25°C en el agar de Sabouraud, que generalmente se usa para el cultivo. Aunque se han descubierto formas teleomórficas (sexuales), los dermatofitos de importancia médica continúan siendo identificados en su estado anamórfico (asexual) más familiar. Las hifas son septadas y sus conidias pueden transmitirse directamente sobre las hifas o sobre los conidióforos. Pequeños microconidia pueden o no formarse; sin embargo, los macroconidios más grandes y distintivos son usualmente la base para la identificación. (22,23)

Aunque diferentes tipos de medicamentos antifúngicos están disponibles en la actualidad, la farmacoterapia tópica es la primera opción. La respuesta negativa al tratamiento tópico puede ser una buena evidencia para administrar medicamentos antimicóticos sistémicos. Los antifúngicos más comunes son los azoles (clotrimazol, miconazol, econazol, oxiconazol y tioconazol) y alilaminas (terbinafina y naftifina), que se utilizan como un comercio tradicional para tratar

las micosis superficiales. La terbinafina y el itraconazol se han utilizado como fármacos orales. En el huésped, estos fármacos están diseñados contra la vía biosintética del ergosterol. Sus intenciones son insuficientes debido a la existencia paralela entre hongos y hospedadores. Además, el potencial de resistencia de los agentes causales contra el fármaco conduce a un mal funcionamiento en el manejo de la micosis. (17,24)

Por lo tanto, el control de los dermatofitos, principalmente, requiere la síntesis de un nuevo agente antidermatofítico efectivo natural de amplio espectro y sin efectos secundarios irreversibles en el huésped. En los últimos años, se han generado intereses en el desarrollo de agentes antifúngicos más seguros a partir de productos naturales de plantas tales como aceites esenciales y extractos para controlar las enfermedades fúngicas. Los aceites esenciales se consideran compuestos no fitotóxicos y son potencialmente eficaces contra muchos patógenos fúngicos. Por ello, se pueden usar como una terapia natural para inhibir el crecimiento de los dermatofitos. (24,25)

Los compuestos antimicrobianos activos de los aceites esenciales son generalmente terpenos, que son de naturaleza fenólica, atacan a los patógenos a través de la pared celular y la membrana celular. Por lo tanto, los compuestos fenólicos activos podrían tener varios objetivos invasivos que podrían conducir a la inhibición de patógenos fúngicos infecciosos humanos. En el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, las actividades biológicas reportadas se atribuyen a varias moléculas, principalmente monoterpenos, como 1,8-cineol, borneol, pineno, limoneno, canfeno, alcanfor y mirceno. (25,26)

El aceite esencial de *R. officinalis* es un líquido incoloro o amarillo pálido con un aroma intenso y especiado. Representa aproximadamente el 1-2.5% del peso total de la planta y su composición química, al igual que otros aceites esenciales, divergen de acuerdo con el área geográfica donde se recolecta la planta, el clima, parte de la planta utilizada y el método de extracción. El aceite esencial de *R. officinalis* presenta tres compuestos principales, de los cuales, son tres monoterpenos: cineol (28.5%), alcanfor (27.7%) y alfa-pineno (21.3%). Sin embargo, esto puede variar de acuerdo a muchos factores, como la estación del

año. Por ejemplo, el alfa-pineno puede tener una diferencia hasta de 1,94% de diferencia entre verano e invierno; o 1,8 cineol puede variar en 4.71% entre invierno y primavera. (26,27,28)

**El problema planteado fue: ¿Es eficaz el efecto sinérgico antifúngico del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* y clotrimazol sobre *Trichophyton rubrum*, en un estudio in vitro?**

La utilización con plantas medicinales es una práctica común y muy antigua para el tratamiento de diversas enfermedades, incluido las ocasionadas por microorganismos. La eficacia que presentan es materia constante de estudio y demostración a través de investigaciones de todo tipo (29).

Este trabajo de investigación, dará a conocer una importante información sobre efecto antifungico, debido que, no existe trabajos iguales ni similares en nuestro medio. Con ello, se dará el primer paso y se señalará la vía para otros trabajos, tanto *in vitro* como *in vivo*, frente al aceite esencial de *R. officinalis*.

La hipótesis que se manejó en este estudio fueron : H1: El efecto sinérgico del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” y clotrimazol es eficaz como antifúngico sobre *Trichophyton rubrum*, en estudio in vitro. Sin embargo, también se consideró la hipótesis nula.

Para responder al problema y contrastar la hipótesis, se plantearon como objetivo general: **Evaluar el efecto sinérgico antifúngico del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” y clotrimazol sobre *Trichophyton rubrum*, en estudio in vitro.**

Y como objetivos específicos: Determinar el efecto antifúngico del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” sobre *Trichophyton rubrum*; determinar el efecto del clotrimazol sobre *Trichophyton rubrum*; Identificar si la combinación de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* con clotrimazol es eficaz como antifúngico sobre *Trichophyton rubrum*.

## II. MÉTODO

### 2.1. Tipo y diseño de investigación.

**Tipo de estudio:** Básico (30)

**Diseño de investigación:** Experimental, con post prueba y repeticiones múltiples.  
(30)

|                 |                |                |
|-----------------|----------------|----------------|
| RG <sub>1</sub> | X <sub>1</sub> | O <sub>1</sub> |
| RG <sub>2</sub> | X <sub>2</sub> | O <sub>2</sub> |
| RG <sub>3</sub> | X <sub>3</sub> | O <sub>3</sub> |
| RG <sub>4</sub> | X <sub>4</sub> | O <sub>4</sub> |

En donde:

RG<sub>1 al 5</sub>: Cepa de *Trichophyton rubrum*

X<sub>1</sub>: Aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* y clotrimazol

X<sub>2</sub>: Aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*

X<sub>3</sub>: Clotrimazol (control positivo)

X<sub>4</sub>: DMSO (control negativo)

O<sub>1 al 4</sub>: Efecto antifúngico (halo de inhibición).

#### Variables:

**Variable Independiente:** Agente antifúngico

- **Agente antifúngico no farmacológico:** Aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis*.

- **Agente antifúngico farmacológico:** Clotrimazol.

**Variable Dependiente:** Efecto antifúngico

- **Eficaz:** Zona de inhibición,  $\geq 22$  mm.

- **No Eficaz:** Zona de inhibición  $< 22$  mm

| VARIABLE           | DEFINICION CONCEPTUAL  | DEFINICIÓN OPERACIONAL   | INDICADORES   | ESCALA DE MEDICIÓN         |
|--------------------|--|--|---|----------------------------|
| Agente antifúngico | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sustancia que altera las estructuras de una célula fúngica inhibiendo su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente. (31)</li> <li>• Tratamiento no farmacológico con <i>Rosmarinus officinalis</i> “romero”.</li> <li>• Tratamiento farmacológico con Clotrimazol.</li> </ul> | <p>Se hará la división en los siguientes grupos:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aceite esencial de romero y clotrimazol</li> <li>• Aceite esencial de romero</li> <li>• Clotrimazol</li> <li>• DMSO</li> </ul> | <p>RG1<br/>RG2<br/>RG3<br/>RG4</p>  | <p>Cualitativa nominal</p> |
| Efecto antifúngico | <p>Acción que ejerce un agente antifúngico, para inhibir o eliminar a los hongos en un determinado momento y con dosis ya establecida. (32)</p>  | <p>Se medirá la zona de inhibición de crecimiento, considerando los criterios del Estándar M61 (33) del CLSI:</p> <p>Sensible <math>\geq 22</math> mm<br/>Resistente <math>&lt; 22</math> mm</p>                             | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Eficaz: <math>\geq 22</math>mm</li> <li>• No eficaz: <math>&lt; 22</math>mm</li> </ul> | <p>Cualitativa nominal</p> |

### 2.3. Población, muestra y muestreo.

**Población:** La población estuvo constituida por todos los cultivos de los dermatofitos *Trichophyton rubrum*, procesados en el laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo.

**Tamaño de muestra:** La selección de la muestra se hizo considerando la fórmula estadística para comparación de dos promedios y estimación de la diferencia que existe entre ellas. (Anexo 1)

**Unidad de análisis:** Estuvo constituida por cada placa Petri con cultivo del dermatofito *Trichophyton rubrum*.

**Muestreo:** muestreo no paramétrico aleatorio simple de cada grupo de dermatofitos.

#### **Criterios de selección**

##### **Criterios de inclusión:**

- Todas las cepas de *Trichophyton rubrum*, cultivadas en fase de esporulación.
- Todas las cepas de *Trichophyton rubrum*, con 15 días de cultivadas.

##### **Criterios de exclusión:**

Cultivos de cepas de *Trichophyton rubrum*, contaminadas.

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

**Técnica:** fue la observación directa del experimento y la medición de los halos de inhibición. (34)

### 2.5. Procedimiento. (Anexo 2)

- a. Se identificó taxonómicamente la planta *Rosmarinus officinalis* en el Herbario de la Universidad Antenor Orrego de Trujillo.

- b. El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* se obtuvo mediante el método de arrastre con vapor de agua. (35)
- c. La cepa de *Trychophyton rubrum* fue cultivada mediante la técnica por agotamiento en superficie, en medio de cultivo agar Sabouraud. (36)
- d. El efecto sinérgico antifúngico fue evaluado mediante el método de difusión con pozos en agar. (37)

**Instrumento:** estuvo conformado por una ficha de recolección de datos que muestra: el número de placas, las concentraciones del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, del clotrimazol (control positivo) y el DMSO (control negativo). (ver anexo 3)

**Validación del Instrumento:** La ficha de recolección de datos fue evaluada por tres profesionales conocedores del tema, quienes evaluaron la utilidad de la información contenida en la ficha para la presente investigación.

## 2.6. Método de análisis de datos.

Los datos que se obtuvieron en los resultados fueron tratados y almacenados virtualmente en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel 2013, a partir de donde se exportó al Software estadístico SPSS v.25, y se realizó las pruebas estadísticas. Se hicieron las pruebas estadísticas de análisis de varianza (ANOVA) y Post Hoc HSD Tukey. Asimismo, se hizo un gráfico de Cajas y bigotes para observar el grupo más eficaz. (38)

## 2.7. Aspectos éticos.

El estudio se realizó respetando los criterios de bioseguridad en el laboratorio con las personas y con el medio ambiente. Se consideró los protocolos de tratamiento de material potencialmente infeccioso y no exposición al peligro de las personas, según el “Manual de Bioseguridad en el Laboratorio” de la OMS. (39)

### III. RESULTADOS

**Tabla 1.** Analisis descriptivos de los halos de inhibición del efecto antifúngico del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, el clotrimazol y la sinergia de ambos, sobre *Trichophyton rubrum*

| Agente   | N  | Media | Desv. estándar | Error estándar | 95% del intervalo de confianza para la media |                 | Mín | Máx |
|----------|----|-------|----------------|----------------|--|-----------------|-----|-----|
|          |    |       |                |                | Límite inferior                              | Límite superior |     |     |
| AERO+CTM | 10 | 34,40 | 1,897          | ,600           | 33,04  | 35,76           | 32  | 38  |
| AERO     | 10 | 23,40 | 1,350          | ,427           | 22,43  | 24,37           | 21  | 26  |
| CTM      | 10 | 32,30 | 1,829          | ,578           | 30,99  | 33,61           | 29  | 35  |
| DMSO     | 10 | ,00   | ,000           | ,000           | ,00  | ,00             | 0   | 0   |
| Total    | 40 | 22,53 | 13,891         | 2,196          | 18,08  | 26,97           | 0   | 38  |

**Fuente:** Bases de datos obtenidos por la autora.

NOTA: De=Derivacion estándar, Min=mínimo , Max=máximo, Me=media

AERO: Aceite Esencial de *Rosmarinus officinalis*

CTM: Clotrimazol

DMSO: Dimetil Sulfóxido

**Tabla 2.** Análisis de Varianza de las medias del efecto antifúngico del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, el clotrimazol y la sinergia de ambos, sobre *Trichophyton rubrum*

**ANOVA**

|                  | Suma de<br>cuadrados | gl | Media<br>cuadrática | F        | Sig.* |
|------------------|----------------------|----|---------------------|----------|-------|
| Entre grupos     | 7447,075             | 3  | 2482,358            | 1132,635 | ,000  |
| Dentro de grupos | 78,900               | 36 | 2,192               |          |       |
| Total            | 7525,975             | 39 |                     |          |       |

**Fuente:** Bases de datos obtenidos por la autora.

\* La diferencia de medias es significativa en el nivel 0,05.

**Tabla 3.** Analisis Post ANOVA de Tukey , Comparación de medias de los halos de inhibición entre el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, el clotrimazol y la sinergia de ambos, sobre *Trichophyton rubrum*

**HSD Tukey<sup>a</sup>**

|                  |    | Subconjunto para alfa = 0.05 |       |       |       |
|------------------|----|------------------------------|-------|-------|-------|
| Agente ATFúngico | N  | 1                            | 2     | 3     | 4     |
| DMSO             | 10 | 0,00                         |       |       |       |
| AERO             | 10 |                              | 23,40 |       |       |
| CTM              | 10 |                              |       | 32,30 |       |
| AERO+CTM         | 10 |                              |       |       | 34,40 |
| Sig.             |    | 1,000                        | 1,000 | 1,000 | 1,000 |

**Fuente:** Bases de datos obtenidos por la autora.

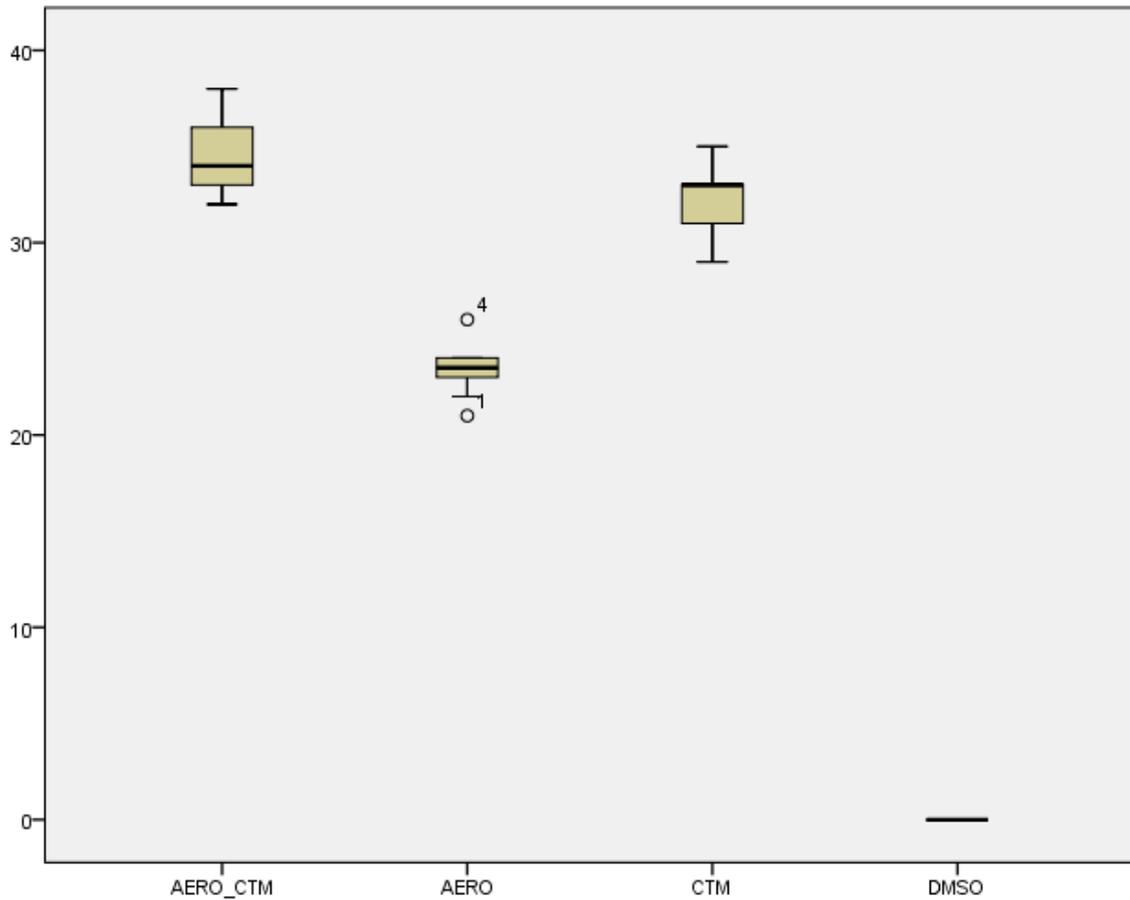
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.

AERO: Aceite Esencial de *Rosmarinus officinalis*

CTM: Clotrimazol

DMSO: Dimetil Sulfóxido



**Gráfico 1.** Comparación del efecto sinérgico antifúngico del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* + clotrimazol, el aceite esencial de romero, clotrimazol y DMSO, sobre *Trichophyton rubrum*.

AERO: Aceite Esencial de *Rosmarinus officinalis*

CTM: Clotrimazol

DMSO: Dimetil Sulfoxido

#### IV. DISCUSIÓN

Se evaluó la sinergia antifúngica del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* con clotrimazol sobre *Trichophyton rubrum*, de los cuales se obtuvieron los siguientes resultados:

En la Tabla 1 se muestra los promedios del diámetro de los halos de inhibición alcanzados por los agentes utilizados. Indican la superioridad del efecto que presentó la sinergia del aceite esencial de romero con el clotrimazol ( $34,40 \pm 1,897$ mm), comparado con el clotrimazol ( $32,30 \pm 1,829$ mm); solo el aceite esencial ( $23,40 \pm 1,35$ mm), tuvo menos efecto antifúngico que el clotrimazol. Con ello se demuestra que el aceite de romero potencia el efecto del clotrimazol contra *Trichophyton rubrum*. por otro lado, a pesar que el efecto antifúngico del aceite esencial de *R. officinalis* fue menor que el efecto del clotrimazol, se considera que es eficaz como antifúngico contra *T. rubrum*, porque superó los 22mm que establece el CLSI para considerar a *T. rubrum* como sensible.

La Tabla 2 muestra el análisis de varianza (ANOVA) de los halos de inhibición obtenidos para los cuatro grupos. La significancia asintótica indica que la diferencia de medias es significativa ( $p=0,000$ ) en el efecto antifúngico (halos de inhibición) de los 4 compuestos utilizados como agentes antibacterianos (aceite esencial de romero+clotrimazol; clotrimazol; aceite esencial de romero y DMSO), de acuerdo a un nivel de confianza de 0,05. Esto se interpreta que existe diferencia en por lo menos 2 de los 4 promedios de los halos de inhibición observados, por lo que se realizó una prueba pos ANOVA.

En la Tabla 3 se observa la prueba pos hoc HSD Tukey, en la cual se muestra la formación de 4 subconjuntos, lo que indica que todos se diferencian uno del otro y el que tiene mayor eficacia es la combinación entre el aceite esencia de *Rosmarinus officinalis* con el clotrimazol. Se interpreta que los 4 grupos de compuestos a los cuales fue expuesto *Trichophyton rubrum*, tienen diferente eficacia cada uno.

En el Gráfico 1 se observa la dieferencias entre los efectos que tienen los 4 compuestos utilizados y la combinación del acente esencial de romero con clotrimazol es el mas eficaz con antifúngico contra *Trichophyton rubrum*. asimismo, se muestra la existencia de valores atípicos en los halos de inhibición del aceite esencial de romero, posiblemente por algún factor en el momento de la ejecución en el laboratorio.

Al respecto, Sudan et al (9) observaron que el efecto antifúngico del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sobre *Trichophyton rubrum* alcanzó 27mm; de form similar, Mekonnen et al (10) observaron halos de inhibición de 28,6mm, y Papajani et al (12), encontraron halos de inhibición de 38,21mm. Por el contrario, en un estudio realizado por Guerra et al (11), señala que el aceite de romero no tuvo efecto antifúngico contra *T. rubrum*.

Esa diferencia de resultados en el efecto antifúngico estaría influenciada por factores propios del vegetal y el procesamiento en campo y laboratorio; factores como los componentes del vegetal, modo de cultivo, tipo de tierra de cultivo, altitud, latitud, temperatura, vientos, humedad y estación del año (40,41), la forma de secado de las hojas, técnica de obtención del aceite, cantidad de esporas sembradas, etc. (42,43) Todos estos factores intrínsecos y extrínsecos afectan los resultados, por lo que no es convenientes estandarizar de forma universal el efecto antifúngico, sino que es propio de cada región o zona geográfica. (44)

Uno de los factores más importantes que se debe tomar en cuenta es la composición fitoquímica (quimitipo) de *Rosmarinus officinalis*, lo cual, depende de algunos factores ambientales propios de cada zona geográfica. Así, Satyal et al (45) investigaron los quimiotipos de *R. officinalis* de Victoria (Australia), Alabama (USA), Western Cape (South Africa), Kenya, Nepal y Yemen, encontrando 53, 66, 52, 36, 52 y 59 componentes fitoquímicos respectivamente. En estos aceites esenciales de romero analizados, predominaban (+) -  $\alpha$ -pineno (13.5% –37.7%), 1,8-cineol (16.1% –29.3%), (+) - verbenona (0.8% –16.9%), (-) - borneol (2.1% –6.9%), (-) - alcanfor (0.7% –7.0%) y limoneno racémico (1.6% –4.4%).

## V. CONCLUSIONES

El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* combinado con clotrimazol si tuvo efecto sinérgico antifúngico contra *Trichophyton rubrum*, en el estudio.

El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* tuvo efecto antifúngico pero menor que el clotrimazol.

El clotrimazol demostró ser eficaz como antifúngico sobre *Trichophyton rubrum*, en este estudio in vitro.

## **VI. RECOMENDACIONES**

Se recomienda realizar estudios de las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, sólo y en sinergia con otros antimicrobianos) frente a patógenos como bacterias grampositivas y gramnegativas, hongos y parásitos.

Se recomienda evaluar la composición química y actividad antimicrobiana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* procedente de las diferentes regiones del Perú.

Se recomienda tomar en cuenta los factores ambientales que estarían influyendo en la calidad del aceite esencial de romero, así como en las técnicas aplicadas en los procedimientos.

## REFERENCIAS

1. Welsh O, González GM. Dermatophytosis (Tinea) and Other Superficial Fungal Infections. En: Diagnosis and Treatment of fungal infections. Editor: Hospenthal DR. Texas, USA: Springer International Publishing; 2015. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/292682070\\_Dermatophytosis\\_Tinea\\_and\\_Other\\_Superficial\\_Fungal\\_Infections](https://www.researchgate.net/publication/292682070_Dermatophytosis_Tinea_and_Other_Superficial_Fungal_Infections)
2. White TC, Findley K, Dawson TL, Scheynius A, Boekhout T, Cuomo CA, Xu J, Saunders CW. Fungi on the Skin: Dermatophytes and *Malassezia*. Cold Spring Harb Perspect Med. 2014; 4: a019802. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4109575/pdf/cshperspectmed-HFP-a019802.pdf>
3. Mayorga J, Esquivel PL, Prado A, Barba JF. Características clínicas y epidemiológicas de pacientes con infección por *Microsporum canis*. Dermatol Rev Mex 2016; 60(1): 18-23. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/derrevmex/rmd-2016/rmd161d.pdf>
4. Cruz R, Carvajal L, Pérez S, Rodríguez V. Aislamiento de *Microsporum* spp. en dermatofitosis en pacientes de la región de Valparaíso – Chile. Rev. argent. dermatol. Mar 2017; 98(1): 1- 8. Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-300X2017000100005](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-300X2017000100005)
5. Estrada GI, Chacón JA. Frecuencia de dermatomicosis y factores asociados en población vulnerable. Manizales, Colombia. Rev. Salud Pública. 2016; 18 (6): 953-962. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/rsap/v18n6/0124-0064-rsap-18-06-00953.pdf>
6. Heidrich D, Rocha M, Ottonelli CD, Massotti C, Daboit TC, Vettoratto G et al. Dermatophytosis: a 16-year retrospective study in a metropolitan area in southern Brazil. J Infect Dev Ctries 2015; 9(8): 865-871. Disponible en: <https://jids.org/index.php/journal/article/view/26322879/1362>
7. Bejar B, Villanueva F, Guevara JM, González S, Vergaray G, Abanto E, Napán K, Velasque L, Vergaray S. Epidemiología de las dermatomicosis en 30 años de estudio en el Instituto de Medicina Tropical Daniel A Carrión, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú. An Fac med. 2014; 75(2): 167-72. Disponible en: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/anales/article/view/8380/7492>

8. Tarrillo HY. Tenencia de *Canis familiaris* y *Felis catus* como factores asociados a dermatofitosis en niños de 6 a 9 años. Hospital Jerusalén. La Esperanza. 2015. [Tesis de Título]. Trujillo, Perú: Universidad César Vallejo; 2016. Disponible en: [http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/595/tarrillo\\_fh.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/595/tarrillo_fh.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
9. Sudan P, Singh J. Antifungal potential of *Rosmarinus officinalis* against *Microsporium gypseum* and *Trichophyton rubrum*. Int. Res. J. Pharm. [Internet]. 2019, 10 (2): 205-207. Disponible en: [https://irjponline.com/admin/php/uploads/3246\\_pdf.pdf](https://irjponline.com/admin/php/uploads/3246_pdf.pdf)
10. Mekonnen A, Yitayew B, Tesema A, Taddese S. In Vitro Antimicrobial Activity of Essential Oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. Int J Microbiol [Internet]. Ene 2016 [Citado: 21 de febrero de 2019]; 2016(1): 1-8. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2016/9545693/>
11. Guerra L, Álvarez R, Salazar R, Torres A, Rivas VM, Waksman N, González G, Pérez LA. Antimicrobial and antioxidant activities and chemical characterization of essential oils of *Thymus vulgaris*, *Rosmarinus officinalis*, and *Origanum majorana* from northeastern México. Pak. J. Pharm. Sci. [Internet]. Ene 2015; 28(1)Suppl: 363-369. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/273637194\\_Antimicrobial\\_and\\_antioxidant\\_activities\\_and\\_chemical\\_characterization\\_of\\_essential\\_oils\\_of\\_Thymusvulgaris\\_Rosmarinus\\_officinalis\\_and\\_Origanum\\_majorana\\_from\\_northeastern\\_Mexico](https://www.researchgate.net/publication/273637194_Antimicrobial_and_antioxidant_activities_and_chemical_characterization_of_essential_oils_of_Thymusvulgaris_Rosmarinus_officinalis_and_Origanum_majorana_from_northeastern_Mexico).
12. Papajani V, Haloci E, Goci E, Shkreli R, Manfredini S. Evaluation of antifungal activity of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* essential oil before and after inclusion in  $\beta$ -cyclodextrine. Int J Pharm Pharm Sci [Internet]. 2015; 7(5): 270-273. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/281873988\\_Evaluation\\_of\\_antifungal\\_activity\\_of\\_origanum\\_vulgare\\_and\\_rosmarinus\\_officinalis\\_essential\\_oil\\_before\\_and\\_after\\_inclusion\\_in\\_b-cyclodextrine](https://www.researchgate.net/publication/281873988_Evaluation_of_antifungal_activity_of_origanum_vulgare_and_rosmarinus_officinalis_essential_oil_before_and_after_inclusion_in_b-cyclodextrine)
13. Sukandar EY, Fidrianny I, Susanto E, Safitri D. The study of antifungal activity from indigenous plants from Indonesia: An in vitro study. Asian J Pharm Clin Res [Internet]. 2017; 10(1): 196-201. Disponible en: <https://innovareacademics.in/journals/index.php/ajpcr/article/view/14838/11755>
14. Ibrahim SY, Abd El-Salam MM. Anti-dermatophyte efficacy and environmental safety of some essential oils commercial and in vitro extracted pure and combined

- against four keratinophilic pathogenic fungi. *Environ Health Prev Med* [Internet]. 2015 Jul; 20(4): 279-286. Disponible en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4491058/pdf/12199\\_2015\\_Article\\_462.pdf](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4491058/pdf/12199_2015_Article_462.pdf)
15. Mikaeili A, Modaresi M, Sozani S, Karimi I. The Antifungal Activities of Rosemary against *Trichophyton Tonsurans* and *Microsporum Canis*. *Int. J. Pharm. Res. Allied Sci.* [Internet]. 2016; 5(2): 472-483. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/312172510\\_The\\_Antifungal\\_Activities\\_of\\_Rosemary\\_against\\_Trichophyton\\_Tonsurans\\_and\\_Microsporum\\_Canis](https://www.researchgate.net/publication/312172510_The_Antifungal_Activities_of_Rosemary_against_Trichophyton_Tonsurans_and_Microsporum_Canis)
  16. Endo EH, Costa GM, Nakamura TU, Nakamura CV, Dias BP. Antidermatophytic activity of hydroalcoholic extracts from *Rosmarinus officinalis* and *Tetradenia riparia*. *J Mycol Med* [Internet]. 2015 Dec; 25(4): 274-279. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1156523315001961?via%3Dihub>
  17. Sardana K, Mahajan K, Mrig PA. *Fungal infections Diagnosis and Treatment*. 1ra ed. New Delhi, India: CBS Publishers& Distributors; 2017.
  18. Arenas R. *Micología Médica Ilustrada*. 5ta ed. México D.F.: McGraw Hill Education; 2014.
  19. Kidd S, Halliday C, Alexiou H, Ellis D. *Descriptions of Medical Fungi*. 3ra ed. Adelaida, Australia: Newstyle Printing; 2016.
  20. Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ. *Enfermedades Infecciosas Principios y Práctica de Mandell, Douglas y Bennett*. 8va ed. Barcelona, España: Elsevier Inc. y Saunders; 2016.
  21. Bonifaz JA. *Micología Médica Básica*. 4ta ed. México D.F.: McGRAW-HILL Interamericana Editores, S.A. de C.V.; 2012.
  22. Ryan KJ, Ray CG. *Sherris Medical Microbiology*. 6<sup>th</sup> ed. Ohio-USA: McGraw-Hill Education; 2014.
  23. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Microbiología Médica*. 8va ed. Philadelphia, USA: ELSEVIER; 2016.
  24. Hospenthal DR, Rinaldi MG. *Diagnosis and Treatment of Fungal Infections*. 2da ed. Maryland, USA: Springer; 2015.
  25. Tabassum N, Vidyasagar GM. Antifungal investigations on plant essential oils. A review. *Int J Pharm Pharm Sci* [Internet]. 2013; 5(Suppl 2): 19-28. Disponible en:

- [http://www.jonnsaromatherapy.com/pdf/Tabassum\\_Antifungal\\_Plant\\_Essential\\_Oils\\_2013.pdf](http://www.jonnsaromatherapy.com/pdf/Tabassum_Antifungal_Plant_Essential_Oils_2013.pdf)
26. Borges RS, Sánchez BL, Matias Ac, Keita H, Tavares JC. Rosmarinus officinalis Essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. J Ethnopharmacol [Internet]. Ene 2019; 229: 29-45. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/328023846\\_Rosmarinus\\_officinalis\\_Essential\\_oil\\_A\\_review\\_of\\_its\\_phytochemistry\\_anti-inflammatory\\_activity\\_and\\_mechanisms\\_of\\_action\\_involved](https://www.researchgate.net/publication/328023846_Rosmarinus_officinalis_Essential_oil_A_review_of_its_phytochemistry_anti-inflammatory_activity_and_mechanisms_of_action_involved)
  27. Takayama C, Meira F, Alves AC, Dunder RJ, Manzo LP, Rabelo EA et al. Chemical composition of Rosmarinus officinalis essential oil and antioxidant action against gastric damage induced by absolute ethanol in the rat. Asian Pac J Trop Biomed [Internet]. 2016; 6(8): 677–681. Disponible en: <http://oaji.net/articles/2016/3004-1468977611.pdf>
  28. Diraz E. The Effect of Seasonal Variation on Rosmarinus officinalis (L.) Essential Oil Composition. UTYHBD [Internet]. 2018; 4(1): 33-38. Disponible en: <http://dergipark.gov.tr/download/article-file/486243>
  29. Atanasov AG, Waltenberger B, Pferschy-Wenzig EM, Linder T, Wawrosch C, Uhrin P et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. Biotechnol Adv [Internet]. 2015 Dec; 33(8): 1582-1614. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4748402/pdf/emss-65118.pdf>
  30. Hernández R, Fernández C, Baptista M. Metodología de la investigación. 6ta ed. México D.F.: McGraw-Hill Education; 2014.
  31. Gregori BS. Estructura y actividad de los antifúngicos. Rev Cubana Farm [Internet]. 2005; 39(2): Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/far/v39n2/far12205.pdf>
  32. Mazu TK, Bricker BA, Flores H, Ablordeppey SY. The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. Mini Rev Med Chem [Internet]. 2016; 16(7): 555-578. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5215921/pdf/nihms838207.pdf>
  33. CLSI. Performance Standards for Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi. 1st ed. CLSI supplement M61. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.

34. Gómez S. Metodología de la Investigación. 1ra ed. México: Red Tercer Milenio; 2012.
35. Casado I. Optimización de la extracción de aceites esenciales por destilación en corriente de vapor. [Tesis]. Madrid, España: Universidad Politécnica de Madrid; 2018. Disponible en: [http://oa.upm.es/49669/1/TFG\\_IRENE\\_CASADO\\_VILLAVERDE.pdf](http://oa.upm.es/49669/1/TFG_IRENE_CASADO_VILLAVERDE.pdf)
36. Britania Lab. Sabouraud Glucosado Agar. Argentina: Laboratorios Britania S.A.; 2015. Disponible en: [http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl\\_5a2971216486e.pdf](http://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5a2971216486e.pdf)
37. Magaldi S, Mata S, Hartung C, Pérez C, Colella MT, Olaizola C, Ontiveros Y. Well diffusion for antifungal susceptibility testing. Int J Infect Dis [Internet]. Ene 2004; 8(1): 39-45. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/82302655.pdf>
38. García A. Elementos de Bioestadística. 3ra ed. Extremadura, España: Servicios de Publicaciones de la Universidad de Extremadura; 2011.
39. Organización Mundial de la Salud – OMS. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3ra. Edición. Ginebra: Ediciones de la OMS; 2005 [Citado: 20 de julio de 2018]. Disponible en: [http://www.who.int/topics/medical\\_waste/manual\\_bioseguridad\\_laboratorio.pdf](http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf)
40. Sarmoum R, Haid S, Biche M, Djazouli Z, Zebib B, Merah O. Effect of Salinity and Water Stress on the Essential Oil Components of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). Agronomy [Internet]. 2019; 9(5): e214. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2073-4395/9/5/214>
41. Lakušić D, Ristić M, Slavkovska V, Lakušić B. Seasonal variations in the composition of the essential oils of rosemary (*Rosmarinus officinalis*, Lamiaceae). Nat Prod Commun [Internet]. 2013 Jan; 8(1): 131-134. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/267032781\\_Seasonal\\_variations\\_in\\_the\\_composition\\_of\\_the\\_essential\\_oils\\_of\\_rosemary\\_Rosmarinus\\_officinalis\\_Lamiaceae](https://www.researchgate.net/publication/267032781_Seasonal_variations_in_the_composition_of_the_essential_oils_of_rosemary_Rosmarinus_officinalis_Lamiaceae)
42. Zheljazkov VD, Astatkie T, Zhalnov I, Georgieva TD. Method for attaining rosemary essential oil with differential composition from dried or fresh material. J Oleo Sci [Internet]. 2015; 64(5): 485-496. Disponible en: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/64/5/64\\_ess14258/pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jos/64/5/64_ess14258/pdf)
43. Szumny A, Figiel A, Gutiérrez-Ortíz A, Carbonell-Barrachina A. Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method. J Food Eng [Internet]. 2010; 97(2): 253-260. Disponible en:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877409005172?via%3Dihub>

44. Jaradat N, Adwan L, K'aibni S, Zaid AN, Shtaya M, Shraim N, Assali M. Variability of Chemical Compositions and Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Ruta chalepensis* Leaf Essential Oils from Three Palestinian Regions. *BioMed Research International* [Internet]. 2017; 2017(1): e2672689. Disponible en: <http://downloads.hindawi.com/journals/bmri/2017/2672689.pdf>
45. Satyal P, Jones TH, Lopez EM, McFeeters RL, Ali NA, Mansi I, Al-Kaf AG, Setzer WN. Chemotypic Characterization and Biological Activity of *Rosmarinus officinalis*. *Foods* [Internet]. 2017 Mar; 6(3) pii: E20. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5368539/pdf/foods-06-00020.pdf>

## ANEXOS

### ANEXO 1 TAMAÑO DE LA MUESTRA

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2\sigma^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

Dónde:

- $Z_{\alpha/2} = 1,96$  Para un nivel de confianza del 95%
- $Z_{\beta} = 0,84$  para una potencia de prueba del 80%
- $\bar{X}_1 = 22$  (33)
- $\bar{X}_2 = 28,6$  (10)
- $\sigma^2 = 1,2$

La muestra fue de 10 repeticiones por cada grupo de estudio (40 Observaciones).

## ANEXO 2

### Identificación taxonómica de *Rosmarinus officinalis* por el Herbario de la Universidad Antenor Orrego de Trujillo.



## **Obtención del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* por el método de arrastre con vapor de agua**

Las plantas frescas de *Rosmarinus officinalis* “romero”, se obtuvieron en el mercado La Hermelinda de Trujillo, procedentes de la localidad de Huamachuco, La Libertad-Perú, en una cantidad de 8 Kg aproximadamente y se llevaron al laboratorio “San José” de Trujillo, donde se seleccionaron las hojas con buenas condiciones, las cuales se lavaron con agua destilada clorada y se dejaron orear. Luego se colocaron sobre bandejas de cartulina y se llevaron al horno a 40°C por 3-4 días donde se deshidrataron. Después, se estrujaron manualmente el vegetal seco hasta que se obtuvieron partículas menores a 1 cm. Se reservaron almacenándolas herméticamente en envases negros.

El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* se obtuvo por el método de arrastre con vapor de agua. Para este método se utilizó un sistema en el cual, se calienta agua destilada contenida en un balón de vidrio hasta la evaporación. El vapor de agua se condujo a través de un ducto hasta otro balón de vidrio que contuvo la muestra vegetal seca. Este vapor de agua llenó el balón y el vapor salió a través de otro ducto hacia un condensador recto, arrastrando los componentes fitoquímicos, entre ellos los aceites esenciales. El líquido se recibió en un embudo decantador tipo pera. Este líquido se disoció en dos fases, quedando el aceite esencial en la superficie por diferencia de densidades. Este proceso se realizó en 3 horas aproximadamente. El Aceite Esencial (AE) obtenido se consideró al 100%, el cual se colocó en un frasco de vidrio ámbar y se reservó a temperatura de refrigeración hasta su utilización.

### **Cultivo de *Trichophyton rubrum* y preparación del inóculo**

Se reactivó las cepas de *Trichophyton rubrum*, sembrándolos en agar Sabouraud, y se incubó a temperatura ambiente por 15 días, en lugar húmedo y oscuro. Pasado ese tiempo, en condiciones asépticas, se extrajeron las colonias de *Trichophyton rubrum* y se colocaron en un matraz de 250mL estéril, luego, se agregó 100 mL de solución salina NaCl 0,9% estéril. Inmediatamente, se tapó herméticamente el matraz y se agitó de manera enérgica e intensa, con lo cual se liberaron las esporas. Luego, se filtró a través de una gasa estéril.

A partir del filtrado se preparó el inóculo; para ello, realizó un recuento de esporas en cámara de Neubauer, y se fue ajustando el filtrado con solución salina de NaCl 0,9%, hasta que se obtuvo una concentración de 200 esporas/ml aproximadamente.

Para la prueba de susceptibilidad, se utilizó agar Sabouraud como medio de cultivo. Se preparó suficiente medio para 10 placas Petri. Este medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se sirvió en placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que solidificó completamente. Se conservó en refrigeración hasta su uso.

## **Evaluación del efecto sinérgico antifúngica por el método de difusión en pozo**

Se evaluó la prueba de susceptibilidad utilizando el método de difusión con pozo en agar, según los pasos siguientes:

- Se sembró *Trichophyton rubrum*, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándolo sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.
- Se hicieron 4 pozos en el medio de cultivo de cada placa recién sembrada, mediante punzonado con un sacabocado estéril de seis milímetros de diámetro.
- Al primer pozo, se agregó 25µl de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* y 25µl de clotrimazol.
- Al segundo pozo, se agregó 50µl de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*.
- Al tercer pozo, se agregará 50µl de Clotrimazol (control positivo).
- Al cuarto pozo, se agregará 50µl de DMSO (control negativo).

Se dejaron en reposo por 15 min y, después, las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 30°C por 48-72 horas.

La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento fúngico. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M61 del CLSI.

### ANEXO 3

#### Ficha de recolección de datos

| N°<br>Repet. | Diámetro de la Zona de Inhibición (mm) |      |     |      |
|--------------|--|------|-----|------|
|              | AERO+CTM                               | AERO | CTM | DMSO |
| 1            | 34                                     | 21   | 35  | 0    |
| 2            | 36                                     | 24   | 31  | 0    |
| 3            | 38                                     | 23   | 33  | 0    |
| 4            | 34                                     | 26   | 33  | 0    |
| 5            | 32                                     | 22   | 30  | 0    |
| 6            | 36                                     | 23   | 29  | 0    |
| 7            | 34                                     | 24   | 34  | 0    |
| 8            | 33                                     | 24   | 33  | 0    |
| 9            | 35                                     | 24   | 32  | 0    |
| 10           | 32                                     | 23   | 33  | 0    |

AERO: Aceite Esencial de *Rosmarinus officinalis*

CTM: Clotrimazol

DMSO: Dimetil Sulfoxido

## Pruebas post hoc

### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Zona\_Inhibición

#### HSD Tukey

| (I) Agente | (J) Agente | Diferencia de medias (I-J) | Error estándar | Sig. | 95% de intervalo de confianza |                 |
|------------|------------|----------------------------|----------------|------|-------------------------------|-----------------|
|            |            |                            |                |      | Límite inferior               | Límite superior |
| ATFúngico  | AERO       | 11,000*                    | ,662           | ,000 | 9,22                          | 12,78           |
|            | CTM        | 2,100*                     | ,662           | ,016 | ,32                           | 3,88            |
|            | DMSO       | 34,400*                    | ,662           | ,000 | 32,62                         | 36,18           |
| AERO       | AERO+CTM   | -11,000*                   | ,662           | ,000 | -12,78                        | -9,22           |
|            | CTM        | -8,900*                    | ,662           | ,000 | -10,68                        | -7,12           |
|            | DMSO       | 23,400*                    | ,662           | ,000 | 21,62                         | 25,18           |
| CTM        | AERO+CTM   | -2,100*                    | ,662           | ,016 | -3,88                         | -,32            |
|            | AERO       | 8,900*                     | ,662           | ,000 | 7,12                          | 10,68           |
|            | DMSO       | 32,300*                    | ,662           | ,000 | 30,52                         | 34,08           |
| DMSO       | AERO+CTM   | -34,400*                   | ,662           | ,000 | -36,18                        | -32,62          |
|            | AERO       | -23,400*                   | ,662           | ,000 | -25,18                        | -21,62          |
|            | CTM        | -32,300*                   | ,662           | ,000 | -34,08                        | -30,52          |

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.



ACTA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS

Código : F06-PP-PR-02.02  
Versión : 09  
Fecha : 05-12-2019  
Página : 1 de 1

Yo MARÍA ROCÍO DEL PILAR LLAQUE SÁNCHEZ, docente de la Facultad de Ciencias Médicas y Escuela Profesional de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, revisor (a) de la tesis titulada:

"..... *Efecto Sinérgico antifúngico in vitro del aceite esencial de Rosmarinus officinalis y Clostridium sobre Trichophyton rubrum*....."

del (de la) estudiante ..... *Ravelto Alayo Susel*....., constato que la investigación tiene un índice de similitud de ..*23*.. % verificable en el reporte de originalidad del programa Turnitin.

El/la suscrito (a) analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad César Vallejo.

Lugar y fecha Trujillo 05 de diciembre del 2019

Firma

Dra. MARÍA ROCÍO DEL PILAR LLAQUE SÁNCHEZ

DNI: 17907759

|         |                            |        |                    |        |                                 |
|---------|----------------------------|--------|--------------------|--------|---------------------------------|
| Elaboró | Dirección de Investigación | Revisó | Responsable de SDC | Aprobó | Vice Rectorado de investigación |
|---------|----------------------------|--------|--------------------|--------|---------------------------------|

## FINAL

### INFORME DE ORIGINALIDAD

**23%**

INDICE DE SIMILITUD

**18%**

FUENTES DE INTERNET

**2%**

PUBLICACIONES

**21%**

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

### FUENTES PRIMARIAS

|          |   |               |
|----------|---|---------------|
| <b>1</b> | <b>repositorio.ucv.edu.pe</b><br>Fuente de Internet                                 | <b>8%</b>     |
| <b>2</b> | <b>Submitted to Universidad Cesar Vallejo</b><br>Trabajo del estudiante             | <b>6%</b>     |
| <b>3</b> | <b>pt.scribd.com</b><br>Fuente de Internet  | <b>3%</b>     |
| <b>4</b> | <b>Submitted to CONACYT</b><br>Trabajo del estudiante                               | <b>1%</b>     |
| <b>5</b> | <b>Submitted to Universidad Senor de Sipan</b><br>Trabajo del estudiante            | <b>1%</b>     |
| <b>6</b> | <b>Submitted to Universidad Ricardo Palma</b><br>Trabajo del estudiante             | <b>&lt;1%</b> |
| <b>7</b> | <b>Submitted to Universidad Catolica de Santo Domingo</b><br>Trabajo del estudiante | <b>&lt;1%</b> |
| <b>8</b> | <b>Submitted to South Bank University</b><br>Trabajo del estudiante                 | <b>&lt;1%</b> |



**AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE TESIS  
EN REPOSITORIO INSTITUCIONAL UCV**

Código : F08-PP-PR-02.02  
Versión : 09  
Fecha : 05-12-2019  
Página : 1 de 1

Yo Pavello Alayo Susel, identificado con DNI N° 75109237,  
egresado de la Escuela Profesional de Medicina de la Universidad César Vallejo,  
autorizo ( X ), No autorizo ( ) la divulgación y comunicación pública de mi trabajo  
de investigación titulado  
" Efecto sinérgico antifúngico in vitro del aceite esencial  
de Rosmarinus officinalis y de trietanol sobre  
Trichophyton rubrum " ;  
en el Repositorio Institucional de la UCV (<http://repositorio.ucv.edu.pe/>), según lo  
estipulado en el Decreto Legislativo 822, Ley sobre Derecho de Autor, Art. 23 y Art.  
33

Fundamentación en caso de no autorización:

.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....  
.....

  
FIRMA

DNI: 75109237

FECHA: 05 de Diciembre del 2019

|         |                            |        |                     |        |                              |
|---------|----------------------------|--------|---------------------|--------|------------------------------|
| Elaboró | Dirección de Investigación | Revisó | Responsable del SGC | Aprobó | Vice Rectorado Investigación |
|---------|----------------------------|--------|---------------------|--------|------------------------------|