



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE
CHIMBORAZO**

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CARRERA DE ODONTOLOGÍA

Efecto anti fúngico “*in vitro*” de aceite esencial y extracto alcoholico
de *Rosmarinus officinalis* “Romero” sobre *Candida albicans* cepa
ATCC 10231

Trabajo de Investigación para obtener el título de Odontólogo

Autor: Br. Giovanni Fabricio Vásconez Vaca

Tutores: Dr. Luís Emilio Carranza Quispe. MSc

RIOBAMBA – ECUADOR

2016

Los miembros del tribunal de graduación del proyecto de investigación de título: Efecto anti fúngico “*in vitro*” de aceite esencial y extracto alcohólico de *Rosmarinus Officinalis* “Romero” sobre *Cándida albicans* cepa ATCC 10231, presentado por Giovanni Fabricio Vásquez Vaca, y dirigida por el Dr. Luís Emilio Carranza Quispe. MSc, una vez escuchada la defensa oral y revisado el informe final del proyecto de investigación con fines de graduación escrito en el cual se ha constatado el cumplimiento de las observaciones realizadas, remite la presente para uso y custodia en la biblioteca de la Facultad de Ciencias de la Salud de la UNACH. Para constancia de lo expuesto firman:

A las.....15h.10.....del mes de.....NOVIEMBRE..... del año 2016.

Dra. Sandra Cruz Quintana

.....
Presidente del Tribunal (nombre)

Cruz

.....
Firma

Dr. Emilio Carranza

.....
Miembro del Tribunal (nombre)

[Firma]

.....
Firma

Dr. Rafael Salcedo

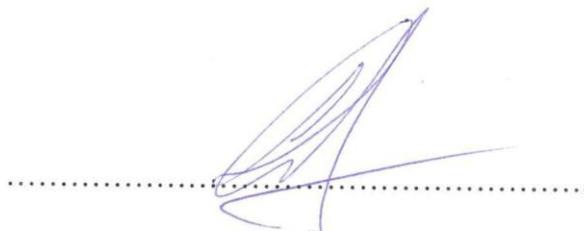
.....
Miembro del Tribunal (nombre)

[Firma]

.....
Firma

ACEPTACIÓN DEL TUTOR

Yo, Luís Emilio Carranza Quispe docente de la Carrera de Odontología en calidad de tutor del proyecto de tesis con el tema: Efecto anti fúngico “*in vitro*” de aceite esencial y extracto alcoholico de *Rosmarinus officinalis* “Romero” sobre *Candida albicans* cepa ATCC 10231, propuesto por la Sr. Giovanni Fabricio Vásquez Vaca, egresada de la carrera de Odontología de la Facultad de Ciencias de la Salud, luego de haber realizado las debidas correcciones, certifico que se encuentra apta para la defensa pública del proyecto. Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad facultando a la interesada hacer uso del presente para los trámites correspondientes.

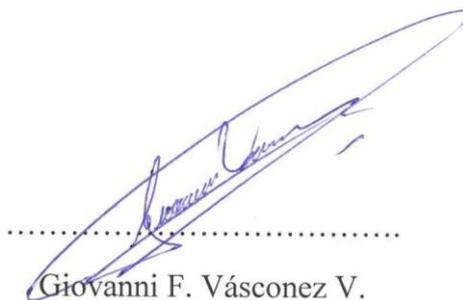


Dr. Luís Emilio Carranza Quispe MsC.

DOCENTE DE LA CARRERA DE ODONTOLOGÍA

DERECHO DE AUTORÍA

Quien suscribe, Giovanni Fabricio Vásquez Vaca con C.I. 1804083564, autor del trabajo de investigación titulado Efecto anti fúngico “*in vitro*” de aceite esencial y extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* “Romero” sobre *Candida albicans* cepa ATCC 10231. Declaro que soy responsable de todo el contenido de este trabajo investigativo, los derechos de autoría pertenecen a la Universidad Nacional de Chimborazo.



Giovanni F. Vásquez V.
1804083564
Autor

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi madre, **Ruth Vaca**, quien ha estado conmigo apoyándome en los momentos más difíciles y nunca permitió que me rindiera, a mis amigos por ser la familia que elegí, a mi tío, **Luis J. Vaca**, por el respaldo y fé en mí, a mi hermano, **Santiago Vásquez**, que es mi fuerza para superar obstáculos y mi más grande inspiración

Gracias hermano por
permitirme caminar por ti.

AGRADECIMIENTO

Agradezco al Ingeniero Felix Falconi por su ayuda y asesoramiento en el laboratorio de biología molecular – genética investigación.

A la Ingeniera Fernanda Rojas por su ayuda en el laboratorio de Agro Industrial en la extracción del extracto alcohólico y antibiograma.

CONTENIDO

RESUMEN.....	9
SUMMARY	10
1. INTRODUCCIÓN	11
Fenólicos y polifenoles	12
Flavonas, flavonoides y flavonol	12
Alcaloides	12
Taninos.....	12
Aceites esenciales.	13
La <i>Candida albicans</i>	13
Objetivo General	14
Objetivos Específicos	14
2. MATERIALES Y METODOS	14
2.1 Tipo de investigación	14
2.2 Tipo de muestreo	15
2.3 Recursos	15
2.4 Materiales y equipos para extraer el extracto alcohólico	15
2.5 Materiales y equipos para la preparación de medios de cultivo.....	15
2.6 Materiales para la activación del Hongo	16
2.7 Materiales para antibiograma	16
2.8 Procedimiento para determinación de flavonoides.....	17
2.9 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS.....	17
2.9.1 Obtención del extracto alcohólico del <i>Rosmarinus Officinalis</i>	17
2.9.2 Obtención de aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>	18
2.9.3 Obtención de muestra de <i>Candida albicans</i>	18
2.9.4 Cultivo y antibiograma	21
2.9.5 Medición de ph.....	21
3. RESULTADOS	22

4. DISCUSIÓN	25
5. CONCLUSIONES	26
6. RECOMENDACIONES	27
7. BIBLIOGRAFIA	28
8. ANEXOS	31

RESUMEN

El presente trabajo tiene por finalidad evaluar el efecto anti fúngico “*in vitro*” de aceite esencial y EARO (Extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis*) en concentraciones al 100%,75%,50% y 25% sobre *Cándida albicans* cepa ATCC 10231. Para dicho fin se sembró en agar Sabouraud utilizando el método de difusión en pocillos con las soluciones experimentales y se incubó durante 18 h a 37° C, pasado dicho tiempo se procedió a la lectura de los diámetros del halo de inhibición. Los resultados que se obtuvieron fueron halos de inhibición en promedio de 5,8 mm en 15% de EARO, 9,1 mm en 20% de EARO, 10,66 mm en 25% de EARO, 11,83 mm en 50% de EARO, 12,5 mm en 75% de EARO, 14,73 mm en 100% de EARO, el halo de inhibición generado por el aceite esencial fue de 9,2 mm. Comprobándose que el extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* “Romero”, presenta una efectividad anti fúngica sobre *Candida albicans* cepa ATCC 10231. Se determinó que el extracto alcohólico es más efectivo que el aceite esencial a nivel fúngico y que ambas sustancias son potencialmente útiles en la terapia contra la candidiasis.

Palabras clave: efecto antifúngico, aceites ecenciales, *Rosmarinus officinalis*, *Candida albicans*.

Abstract

This paper aims to evaluate the anti-fungal effects "in vitro" of the essential oil and alcoholic extract of *Rosmarinus Officinalis* "EARO" in concentrations of 100%, 75%, 50% and 25% on *Candida albicans* ATCC 10231 strain. For this purpose, we proceeded to implant in Sabouraud agar through the application of the diffusion method with experimental solutions into small boxes, incubated for 18 hours at 37 ° C, after that, we proceeded to collect the reading of the inhibition zone diameters. The results obtained were halos of inhibition on average of 5, 8mm in 15% of EARO, 9, 1 mm by 20% of EARO, 10,66 mm in 25% of EARO, 11, 83mm in 50% and EARO, 12. 5 mm in 75% of EARO, 14, 73mm in 100% of EARO, the zone of inhibition generated by essential oil was 9, 2mm. Proving to the alcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* "Rosemary", present effective anti-fungal on *Candida albicans* strain ATCC 10231. It was determined that the alcoholic extract is more effective than the essential oil to fungal level and that both substances are potentially useful in therapy against candidiasis.



Reviewed by: Barriga, Luis
Language Center Teacher

1. INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales data desde el principio de la humanidad hasta comienzos del siglo XIX, por ensayo y error, el hombre uso los elementos que la naturaleza le brindaba para sanar a sus animales y a sí mismo, estos conocimientos fueron pasados y perfeccionados de generación en generación hasta la actualidad tomando el nombre de medicina ancestral al conocimiento de dichos efectos curativos (1,2,3).

Se puede imaginar que en un principio los recolectores no escogían las plantas si no que estas eran indiferenciadas, poco a poco la recolección se fue haciendo selectiva logrando domesticar las más útiles, en la actualidad, se utilizan ampliamente en la industria alimenticia, en el uso cotidiano de hogares, en medicina y en la cosmética (4,5). En la última década se ha estudiado los compuestos bioactivos de las plantas por lo cual se puede afirmar sus propiedades medicinales.

A nivel mundial se han realizado estudios sobre plantas medicinales logrando comprobar sus efectos analgésicos, antiinflamatorios, antibacterianos, antihemorrágicos, anti fúngicos etc. (6,7). El estudio en laboratorios de las plantas ha permitido reconocer y aislar los principios activos responsables de su actividad farmacológica avalando razonablemente su utilización.

En la Estomatología, las plantas han tenido un papel relevante, como aditivos en diversos productos de higiene oral con efectos preventivos y con propiedades contra la halitosis, anti-inflamatorios y antibacterianos (8,9,10). Debido a la diversidad de estas plantas no se han estudiado o recién se están empezando a estudiar especialmente en nuestro país.

Rosmarinus officinalis (romero), Originaria del mediterráneo, es un arbusto leñoso, de aroma característico, de hoja persistente, rica en principios activos. Puede ser cultivada en suelos secos (11,12). Presente en varios países a nivel mundial.

El romero es conocido desde el antiguo Egipto, se dice que los faraones egipcios hacían poner sobre sus tumbas un ramillete de romero para perfumar su viaje al

país de los muertos. Su aceite esencial fue obtenido por primera vez hacia el año 1330 por Ramón Llull y desde entonces, se emplea en perfumería. En el siglo XVI la reina Isabel de Hungría lo utilizó para tratar el reumatismo que padecía convirtiéndose en «el agua de la reina de Hungría», en uno de los remedios más famosos de la corte de Luis XIV (13,14). Los boticarios empleaban el romero en gran número de preparados pero en la actualidad sólo el aceite esencial está incluido en las farmacopeas.

Los compuestos activos con efecto antibacterianos son los Terpenoides. Diterpenos (picrosalvina, carnosol, isorosmanol, rosmadial, rosmaridifenol, rosmariquinona), Triterpenos (ácidos oleanólico y ursólico, y sus 3- acetil-ésteres). Son aquellos que tienen elementos adicionales, usualmente oxígeno; se especula que involucra la ruptura de la membrana celular por los compuestos lipofílicos. (15,16).

Fenólicos y polifenoles (ácido rosmarínico, ácido clorogénico, ácido cafeico y ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico). Los sitios y números de grupo hidroxilo en el grupo fenol se cree que están relacionado con la toxicidad contra los microorganismos, efectivo contra virus, bacterias y hongos; se cree que produce una inhibición enzimática o una interacción no específica con las proteínas. (17)

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

Alcaloides. Constituyen un grupo heterogéneo de bases nitrogenadas, tiene efecto antimicrobiano, viral: se le atribuye a su capacidad de intercalarse con el DNA.⁴¹

Taninos son compuestos polifenólicos, desempeñan en las plantas acción defensiva frente a insectos, son antidiarréico, antimicrobiana, inhibidora enzimática, están relacionadas con la capacidad de inactivar adhesinas

microbianas, enzimas, proteínas transportadoras en la célula, formar complejos con la pared celular, etc. (17).

Aceites esenciales. Es un líquido volátil, insolubles en agua, con un ligero tinte entre amarillo y verdoso, de olor alcanforado y sabor amargo. Esta esencia está formada de numerosas sustancias diferentes: Pineno, canfeno, cineol, alcanfor de romero 12 %, limonero, eucaliptol 20-32 %, borneol 18 %, actúan como anti-inflamatorios, expectorantes, diuréticas, antiespasmódicas y tónicas sobre el estómago, intestino, bilis y el hígado; también combaten agentes patógenos como: bacterias, hongos, virus. (18).

Razón por la cual se han multiplicado las investigaciones sobre su uso y aplicaciones en varios ámbitos.

La *Candida albicans* es una variedad de hongo muy frecuente y que se vuelve patógeno por una serie de factores predisponentes y tiene comportamiento aerobio. Uno de cada dos pacientes portadores de prótesis dentales tienen *Cándida albicans*, por lo general es saprófito inofensivo, habita normalmente en la boca, en el tubo intestinal y la vagina de las mujeres (19).

La candidiasis se presenta en pacientes geriátricos, inmuno deprimidos o por factores locales como mala higiene, mal estado protésico, traumatismos físico químicos, se presenta como manchas blancas que pueden ser desprendidas quedando una superficie sangrante o rojiza, la candidiasis oral puede ser considerada como la enfermedad del paciente enfermo, ya que necesita de otros factores asociados para que esta se presente (20).

La Candidiasis no es una enfermedad mortal, aunque si puede resultar muy molesta para el paciente, el cual puede manifestar incomodidad y dolor para alimentarse, impidiendo la correcta ingesta de alimento, lo que podría ser fatal en pacientes que necesitan una ingesta hipercalórica como es el caso de pacientes con VIH(21).

Considerando la tendencia mundial y más aún la de nuestra población para encontrar alternativas farmacológicas que no tengan efectos secundarios y con menores costos. El Objetivo de este estudio es demostrar efectividad del extracto

alcohólico y aceites esenciales del romero sobre la *Candida albicans*, hongo que se encuentra presente en la cavidad oral y que al asumir patogenicidad provoca la candidiasis cuyas manifestaciones son las aftas.

Objetivo General

Determinar el Efecto anti fúngico “*in vitro*” de aceite esencial y extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* “Romero” sobre *Cándida albicans* cepa ATCC 10231.

Objetivos Específicos

- Obtener concentraciones del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* al 100%,75%,50% y25% y determinar su sensibilidad.
- Identificar cual es la mínima concentración efectiva del extracto alcohólico.
- Determinar que sucede con la cantidad de flavonoides durante las diluciones.
- Comparar la efectividad entre el extracto alcohólico y el aceite esencial.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Tipo de investigación

Experimental. Porque se va a valorar el efecto de un hongo, donde el Investigador manipula las condiciones de la investigación.

Comparativo. Porque permite contrastar los resultados del experimento.

In vitro. Porque la técnica para realizar el experimento se realiza en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo.

2.2 Tipo de muestreo

Candida albicans cepa ATCC 10231

2.3 Recursos

Recursos Ambientales:

- Apoyo en la preparación del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* por el Laboratorio de Ingeniería Agro Industrial de la UNACH

Recursos Humanos:

- Químico farmacéutico
- Ingeniero bioquímico.
- Odontólogos.
- Digitador.

2.4 Materiales y equipos para extraer el extracto alcohólico

Hojas, flores y talluelos de (romero)

Balanza

Botellas ámbar

Refrigeradora

Vaso de precipitado

Alcohol de 70°

Papel filtro

2.5 Materiales y equipos para la preparación de medios de cultivo

Medios de cultivo enriquecidos Agar TSA

Balanza

Agua destilada
Probetas
Matraz de Erlenmeyer
Placas Petri
Pipetas
Esterilizador de calor seco (horno)
Autoclave
Mecheros
Estufa (incubadora)
Microscopio
Refrigeradora
Tubos de prueba
Guantes
Hisopo

2.6 Materiales para la activación del Hongo

Placas Petri estériles
Agar caso
Caldo de cultivo
Candida albicans (cepa ATCC 10231)
Asa

2.7 Materiales para antibiograma

6 cajas Petri
8 tubos de ensayo
Hisopos
Puntas y pipeta

Agar Sabouraud

Caldo de cultivo

2 Matraces

2.8 Procedimiento para determinación de flavonoides

5 tubos de ensayo

0.5 gramos de carbón activado

Centrifugadora

NaNO₂ al 5%

AlCl₃ al 10%

NaOH1N

Espectrofotómetro

2.9 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

2.9.1 Obtención del extracto alcohólico del *Rosmarinus Officinalis*

La planta en estudio, *Rosmarinus officinalis* “romero” fue recolectada en un jardín silvestre a las afueras de Huachi Chico en la provincia de Tungurahua, cantón Ambato – Ecuador. Acto seguido es trasladado a las instalaciones de Agro industrial en la Universidad Nacional de Chimborazo, la obtención del extracto estuvo a cargo de la Ingeniera Fernanda Rojas.

Posteriormente las hojas y flores fueron separadas del tallo, luego fueron pesadas en una balanza común, se pesaron 2 libras, se procedió a secar en la deshidratadora de alimentos durante 12 horas, se continuó con la fase de pulverización de las hojas con un molino de mano, luego se colocaron en un frasco de vidrio de color ámbar y se le agregó 1 L de alcohol de 70°, dejándose macerar por 1 semana, agitándolo todos los días. El producto fue filtrado 3 veces, primero con papel filtro Whatmann N° 41, utilizando una bomba de vacío para agitar el filtrado, obteniéndose extracto purificado libre de gérmenes. Luego el

filtrado fue colocado en un recipiente de vidrio de boca ancha y se llevó a una máquina térmica de agua, que a baño María calentó 60 °C durante 4 días hasta que el alcohol se evapore por completo, quedando solo el extracto puro, se obtuvo un producto de extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* con un peso neto 44 ml. Luego fue colocado en un frasco de vidrio, de color ámbar para su conservación y fue llevado al laboratorio de biología molecular – genética investigación de la facultad de ciencias de la salud de la UNACH.

A partir del extracto de *Rosmarinus officinalis* se prepararon concentraciones de 25, 50 y 75 % las que fueron guardadas en frascos color ámbar estéril y conservado en refrigeración hasta el momento que dichas concentraciones sean usadas contra la *Candida albicans*.

2.9.2 Obtención de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*

Se tomaron 4 libras de romero sin deshidratar y se lo llevo al destilador el cual condensa el aceite esencial en un período de 4 horas obteniendo 2ml este aceite se filtró del líquido residual y se lo envasó en un frasco ámbar y se refrigeró hasta el momento de su utilización.

2.9.3 Obtención de muestra de *Candida albicans*

Primero se preparó agar caso y se colocó en 3 en cajas Petri, posterior a esto se inoculó con el hongo *Candida albicans* cepa ATCC 10231 que se encontraba en refrigeración en un tubo eppendorf, mediante un asa se inoculó las cajas Petri las cuales fueron incubadas a 37°C por 18 horas, logrando de esta manera que el hongo crezca y se pueda separar una unidad formadora de colonias con una asa, la misma que se coloca en un matraz que contiene caldo de cultivo en 100 ml de agua destilada, luego el matraz inoculado se lleva a la incubadora por 18 horas a 37° C, el caldo de cultivo pasado este tiempo se encuentra turbio, previamente se preparó más caldo de cultivo y se colocó 4,5ml en 8 tubos de ensayo, se tomó 0,5 ml de caldo de cultivo inoculado y se lo añadió al tubo 1 logrando tener 5ml esto correspondería a 1/10, se tomó 0,5ml del tubo 1 y se lo colocó en el tubo 2 esto corresponde a 1/100, del tubo 2 se toma 0,5 ml y se lo colocó en el tubo 3 esto corresponde a 1/1000, del tubo 3 se toma 0,5 ml y se lo colocó en el tubo 4 esto corresponde a 1/10000, del tubo 4 se toma 0,5 ml y se lo colocó en el tubo 5 esto

corresponde a $1/100000$, del tubo 5 se toma $0,5\text{ ml}$ y se lo colocó en el tubo 6 esto corresponde a $1/1000000$, del tubo 6 se toma $0,5\text{ ml}$ y se lo colocó en el tubo 7 esto corresponde a $1/10000000$, del tubo 7 se toma $0,5\text{ ml}$ y se lo colocó en el tubo 8 esto corresponde a $1/100000000$, los 3 últimos tubos son tomados y con un hisopo cada tubo inocula una caja Petri y cada caja es rotulada y llevada a incubación por 18 horas. Como explica la imagen 1.

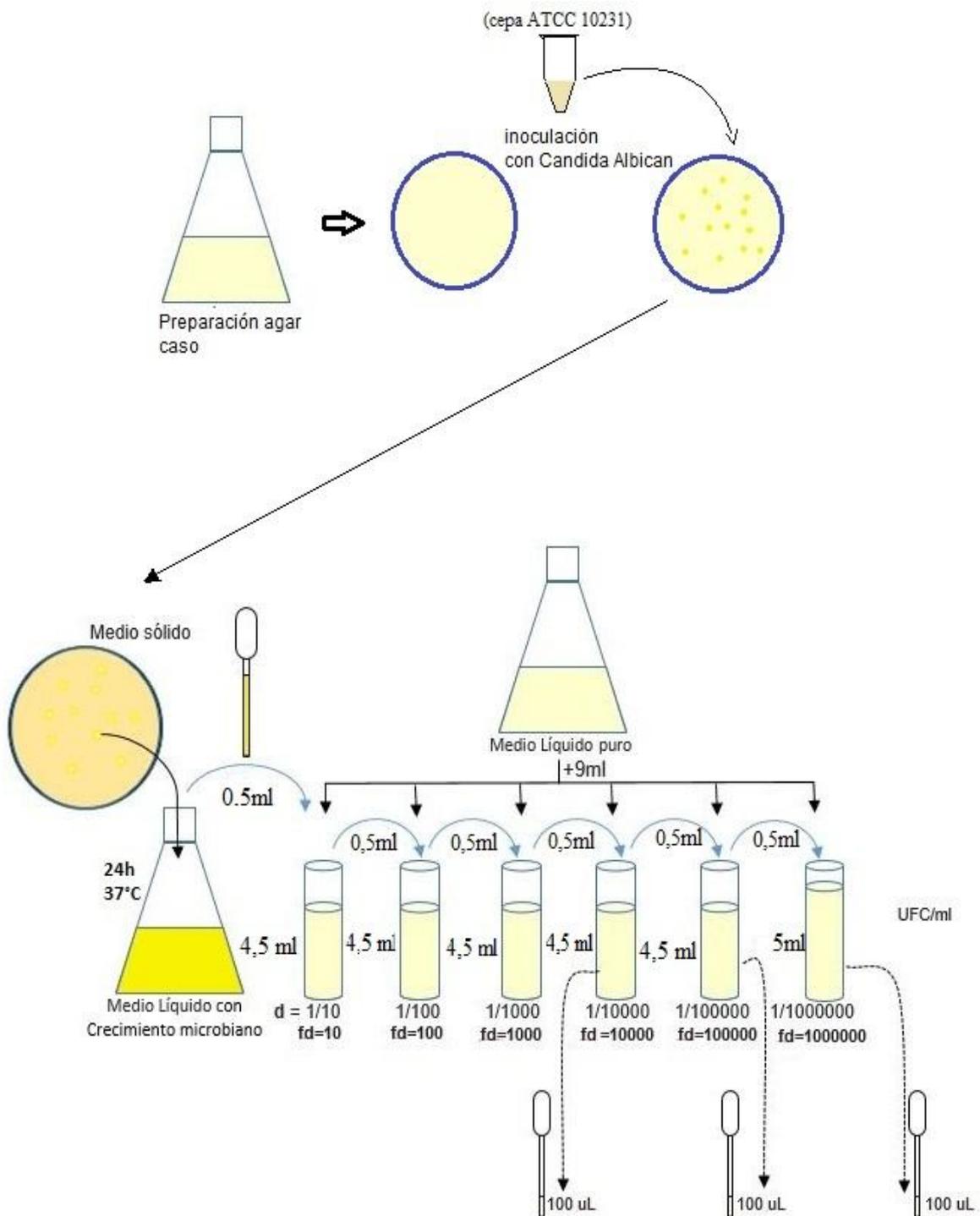


Imagen 1. (Obtención de muestra de *Candida albicans*)

Una vez pasado el periodo de incubación se identifica cuál de las 3 cajas ha formado una cantidad contable de unidades formadoras de colonias, en el microscopio pudimos identificar que la caja 7 con una concentración de 1×10^7 , presento 380 ufc esto es, $3800 \text{ml} \times 1 \times 10^7 = 3,8 \times 10^{10}$ concentración ufc que teníamos en 100 ml como la cantidad total es 50 ml la cantidad se duplica, obteniendo $7,6 \times 10^{10}$ UFC.

La cantidad estándar de UFC/ml que se requiere para que el experimento sea estandarizado es de $2,5 \times 10^8$ UFC/ml, por lo tanto se realizó un despeje de fórmulas para poder diluir la cantidad necesaria para llegar a esta cantidad.

$$C1 = 7,6 \times 10^{10} \text{ UFC/ml}$$

$$C2 = 2,5 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$$

$$V2 = 5.000 \text{ ul}$$

$$V1 = ?$$

$$V1 = \frac{5000 \text{UL} \times C2 = 2,5 \times 10^8 \text{UFC/ML}}{7,6 \times 10^{10} \text{UFC/ml}}$$

$$V1 = 16,4 \text{ ul}$$

Se colocó el caldo de cultivo del matraz inoculado en 8 tubos de ensayo para poder centrifugarlos luego de dicho proceso se podía observar las ufc en el fondo del tubo a manera de sustrato blanco, el líquido fue retirado de los tubos y colectado en 4 tubos y se volvió a centrifugar logrando de esta forma retirar la totalidad del líquido y coleccionar el sustrato de ufc en 4984ul de caldo de cultivo a

lo cual se añadió 16ul de glicerol, finalmente se preparó 50 tubos eppendorf y fueron colocados 1ml por cada tubo , rotulados y refrigerados a -20° hasta que sea requerido el antibiograma.

2.9.4 Cultivo y antibiograma

Para este paso se esterilizó todos los materiales necesarios en autoclave y se usó una cámara de flujo laminar para asegurar que los procesos no se contaminen. Usando agar Sabouraud plaquiamos las 6 cajas Petri, se sacó de refrigeración el extracto alcohólico de romero al 100%, 75%, 50% y 25% las cuales fueron colocadas en discos blank con una absorción estándar por disco, también se preparó discos blank con la dilución del aceite esencial de romero en DMSO (Dimetilsulfóxido). Se colocó en las cajas Petri (inoculadas previamente con 0.1ml) los 6 discos los cuales correspondían a 1 disco al 100% 1 al 75%,1 al 50% 1 al 25%, 1 disco de aceite esencial y 1 disco de Fluconazole con 25 ug, posterior a esto se las traslado a la incubadora por 18 horas a 37°C, pasado este tiempo se pudo observar crecimiento en todas las cajas y de igual forma se mostraban halos de inhibición.

2.9.5 Medición de ph

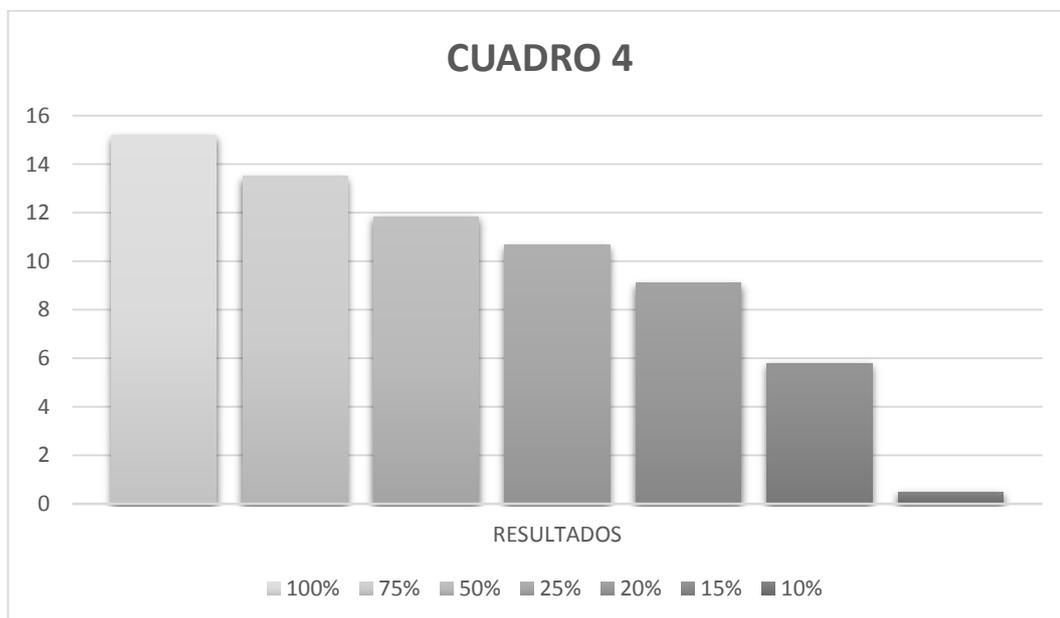
El ph fue medido con un pHMetro Marca HACH modelo sensION3 haciendo 3 repeticiones por muestra.

3. RESULTADOS

HALOS DE INHIBICIÓN tabla 1		
CAJA 1	15,2mm	100%
	13,5mm	75%
	11,5mm	50%
	12 mm	25%
	10 mm	Aceite esencial
	0,5 mm	Fluconazole
CAJA 2	14.5mm	100%
	12 mm	75%
	12 mm	50%
	10 mm	25%
	9,3 mm	Aceite esencial
	0,5 mm	Fluconazole
CAJA 3	14.5mm	100%
	12,5mm	75%
	12 mm	50%
	10 mm	25%
	9 mm	Aceite esencial
	0,5 mm	Fluconazole

HALOS DE INHIBICIÓN tabla 2		
CAJA 4	9,2mm	20%
	6 mm	15%
	0,5 mm	10%
CAJA 5	9 mm	20%
	5,5 mm	15%
	0,5 mm	10%
CAJA 6	9,1 mm	20%
	5,8 mm	15%

	0,5 mm	10%
--	--------	-----



Medición de PH Tabla 3	
Concentración	PH
100%	5,36
75%	5,20
50%	5,33
25%	5,27

El efecto antibacteriano se consideró en función al diámetro de los halos de inhibición del crecimiento del microorganismo: nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm; sensibilidad límite (+) de 9 a 14 mm; sensibilidad media (++) de 15 a 19 mm y sumamente sensible (+++) si fue igual o superior a 20 mm

Como podemos observar en el cuadro 4 de halos de inhibición, se muestra claramente como los valores más altos pertenecen a las concentraciones de EARO al 100%, 75% y 50% mientras que en las demás diluciones se muestra una notable disminución del diámetro del halo de inhibición.

Nuestros resultados demostraron que esta variedad de hongos, son susceptibles a la acción del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis*, con halos de inhibición del EARO de 25% se obtuvo halos de inhibición de 10,66 mm de

diámetro como promedio, mientras que a una concentración del EARO de 50% se obtuvo halos de inhibición de 11,83 mm de diámetro, a la concentración del EARO de 75% se obtuvo halos de inhibición de 12,5 mm de diámetro, a la concentración del EARO de 100% se obtuvo halos de inhibición de 14,73 mm de diámetro, estadísticamente se encontró diferencias significativas entre los diámetros de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones de los extractos.

Por otra parte los halos de inhibición del aceite esencial del Romero resulto ser de 9,2 mm similares a la concentración de EARO al 20%, mientras que la prueba control de fluconazol resulto ser de 0,5 mm alrededor del disco, ya que este medicamento requiere mayor tiempo de exposición y concentración para ser eficaz no basta con una sola exposición.

4. DISCUSIÓN

En las últimas décadas, los fitofármacos han asumido un papel importante como medio terapéutico alternativo en la odontología a través de sus propiedades antimicrobianas contra microorganismos que producen patologías orales, especialmente contra los que producen la caries dental y enfermedades periodontales. (18).

Según Abreu, m. y col. (2012). Se evaluaron “*in vitro*” los efectos anti fúngico del extracto de *Rosmarinus officinalis* (romero) contra levaduras y se comparó con clorhexidina al 0.12 % que utilizaron como control positivo. Observó que la inhibición alrededor de los discos de extracto de romero fue 11.5 mm el que más se aproxima al de la clorhexidina que fue de 14,6 mm. Estos halos de inhibición coinciden con los de nuestro estudio ya que en el caso del EARO el halo más grande fue de 15,2mm, por lo que estamos de acuerdo con este autor en cuanto a resultados obtenidos.

LV Guerrer, KC Cunha(2012) Nos dice que varios fármacos, incluyendo compuestos de azol, terbinafina y ciclopirox olamina son particularmente útiles en el tratamiento anti fúngico. Sin embargo en nuestro estudio el Fluconazol que fue nuestro medio control no genero halos de inhibición.

Lurdete, m (2014). *Rosmarinus officinalis* tiene efecto sobre el factor de virulencia de hongos primarios (es decir, el tubo germinal) Este trabajo coincide con nuestros resultados ya que el efecto fúngico del EARO no solo destruye la membrana sino que también impide que la *Candida albicans* se vuelva patógena.

Varios autores coinciden con el hecho de que los compuestos del *Rosmarinus officinalis* logran favorables resultados en la inhibición tanto de hongos como de bacterias sin tener los efectos secundarios que los fármacos poseen.

MTG,Almeida(2012) nos indica que en un estudio de personas sometidas a anti fúngicos durante un año generaron efectos secundarios mientras que el otro grupo expuesto a compuestos de extractos de plantas tuvieron mejores resultados. Este estudio también coincide y avala la inocuidad de nuestro extracto, razón por la cual estamos de acuerdo con este autor sobre el hecho de que se deben realizar más estudios en plantas

5. CONCLUSIONES

- Se determinó el Efecto anti fúngico “*in vitro*” de aceite esencial y extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* “Romero” sobre *Candida albicans* cepa ATCC 10231
- Se obtuvieron concentraciones del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* al 100%, 75%, 50% y 25% y se determinó que al 100% tiene sensibilidad media, al 75%, 50% y 25% sensibilidad límite, al 15% es nula
- El aceite esencial *Rosmarinus officinalis* “Romero” tiene una sensibilidad límite
- La cantidad de flavonoides varía de acuerdo a las diluciones, mientras que el pH se mantiene en un promedio de 5,29

6. RECOMENDACIONES

- Debido a la necesidad mundial de investigar para el hallar de nuevos medicamentos y técnicas, el Odontólogo no debe ser excluido por tanto este estudio recomienda la implementación de laboratorios propios que incentiven el desarrollo de nuevas investigaciones a nivel odontológico.
- Promover la investigación mediante un recorrido por los diferentes laboratorios de tal manera que los estudiantes conozcan que existen las facilidades para desarrollar proyectos
- Capacitar al Odontólogo en procesos básicos de obtención de bacterias y antibiogramas

7. BIBLIOGRAFIA

1. Fonnegra R. Plantas Medicinales Aprobadas en Colombia. 2nd ed. Cardenas E, editor. Antioquia: Universidad de Antioquia; 1999;3:4-9
2. Küste HJ. Wikipedia. [Online].; 2016 [cited 2016 julio 2. Available from: https://es.wikipedia.org/wiki/Rosmarinus_officinalis
3. Peña TPP. Efectividad antibacteriana "in vitro" del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival. UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS. 2013;(97)
4. Font Quer P. Plantas medicinales: EL Dioscorides.3ra ed Barcelona-España:Laboratorio. 2010:98-100
5. Al-Sereiti M, Abu-Amer P. Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis*Linn.) and its therapeutic potentials. Indian Journal of Experimental Biololgy,2010; 37(2): 124-30
6. Guerrero C, Rodriguez H, Brito J. Essential oils of *Rosmarinus officinalis* L.effect of harvesting dates growing media and fertilizers. Greece. 2007; 24(2):65-70.
7. Peyman S, Reza F. Rapid essential oil screening of *Rosmarinus officinalis* L.by hydrodistillation-head space solvent microextraction. Journal of Flavour and Fragance, 2007; 10(5): 1002-1007
8. Silva M, Vieira J Sheila J, Vieira M, Guedes M. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis linn.* (alecrim) sobre microorganismos criogénicos. Arquivos em Odontología 2008 abr/jun; 44 (2).
9. Alves M. Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* de un dentífrico basado en extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis linn.* (romero) sobre cepas de *s. mutans s. aureus* y *l. casei*. Tesis de maestría en Odontología Recife-pe, Universidad Federal de Pernambuco; 2008.

10. Lock De Ugaz O. Investigación Fito química, métodos en el estudio de productos naturales. 2da ed. Lima – Perú: Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. 2011: 25
11. Andean Products. El futuro de los productos andinos en la región alta y los valles centrales de los Andes. Informe Roadmapping. Perú; 2006.
12. Abreu M, Brindeiro D, Dantas I, Wanderley Y, Wilney W. Efeito antimicrobiano de tinturas de productos naturais sobre bacterias da cárie Dentária. Rev. Bras Promoç Saúde 2012 abr/jun; 25(2): 197-201.
13. Teixeira L. Avaliação do uso do Extrato de Alecrim de Jardim (*Rosmarinus officinalis* Linn) no controle do Biofilme Dental. Tesis de licenciatura en Odontología. Curitiba: Universidad Federal de Paraná; 2012
14. Dalirsani Z, Aghazadeh M, Adibpour M, Amirchaghmaghi M, Pakfetrat A, Mehdipou R. In vitro comparison of the antimicrobial activity of ten herbal extracts against streptococcus mutans with chlorhexidine. Journal of applied sciences. 2011; 11 (5): 878-882
15. Estrada S. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis*) y tomillo (*thymus vulgaris*). Tesis de licenciatura en Bioquímico Farmacéutico. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2010
16. Castro R, Lima E. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sasafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o género *Cándida*. Rev. Bras. Pl. Med. 2011; 13 (2): 203-208.
17. Battagin J. Cinética enzimática e efeito de extratos naturais na atividade da enzima glicosiltransferase de *streptococcus mutans*. programa de

pósgraduação *stricto sensu* em ciências da saúde da Universidade São Francisco Bragança Paulista; 2010

18. Volcao I, Marques J, Ribeiro G. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* sobre patógenos alimentares. XX congresso de iniciação científica 2011 (consultado el 12 de septiembre del 2011). disponible en: http://www.ufpel.edu.br/cic/2011/.../cb_00269.pdf
19. Castaño H, Ciro G, Zapata J, Jiménez S. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* sobre algunas bacterias de interés Alimentario. *Vitae*. 2010; 17 (2): 149-154.
20. Monroy A, Garcia I, Totosaus A. Evaluación de la actividad antioxidante y antimicrobiana de extractos etanólicos de romero y chile ancho y su aplicación en un batido carnico. *NACAMEH*. 2009; 3 (1): 21- 32.
21. Costa A, Pereira C, Freire F, Junqueira J, Jorge A. Antifungal activity of glycolics extracts of *Rosmarinus officinalis* Linn. And *Syzygium cumini* Linn. On clinical strains of *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida tropicalis*. *Rev Odontol UNESP*. 2011; 38(2): 111-116.
22. Gauch Lurdete Maria Rocha, Silveira-Gomes Fabíola, Esteves Renata Antunes, Pedrosa Simone Soares, Gurgel Ely Simone Cajueiro, Arruda Alberto Cardoso et al . Effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil on germ tube formation by *Candida albicans* isolated from denture wearers. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* [Internet]. 2014 June [cited 2016 Nov 12]; 47(3): 389-391. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822014000300389&lng=en. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0137-2013>.

8. ANEXOS

MATERIAL ES Y MUESTRA



Fig 1. Rosmarinus



Fig2. Destilador



*Fig 3. Extracto
alcohól* *Fig 4. EARO AMBAR*

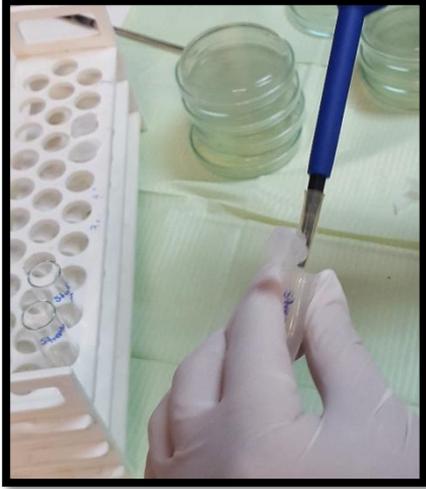


Fig 5. Candida Albicans



Fig 6. Cajas Petri inoculadas



Fig 7. Preparación de caldo nutritivo

PROCEDIMIENTO

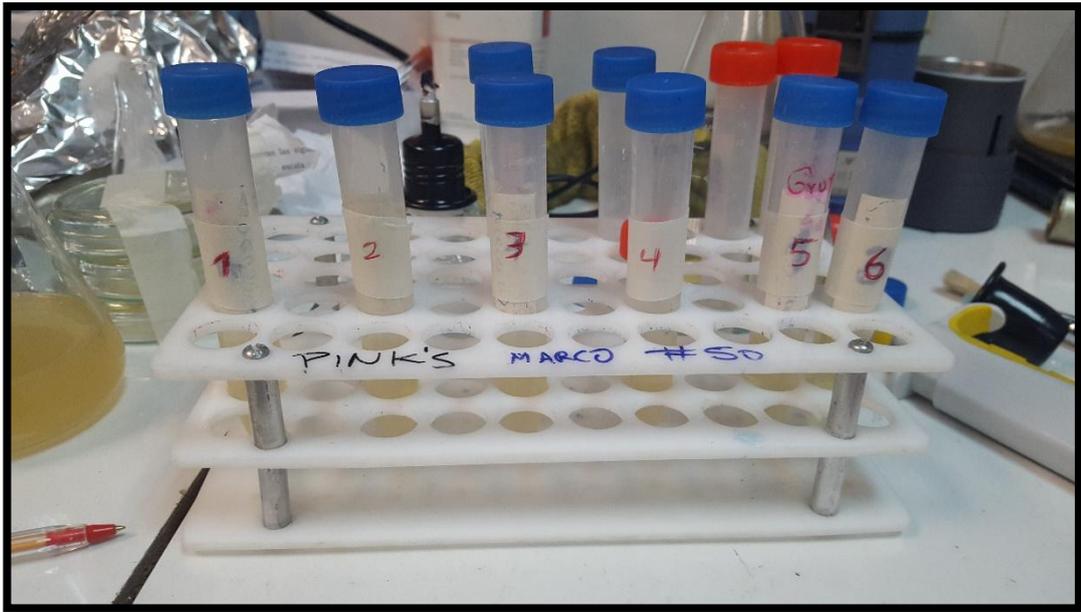


Fig 8. Tubos de ensayo rotulados



Fig 9. Centifucación

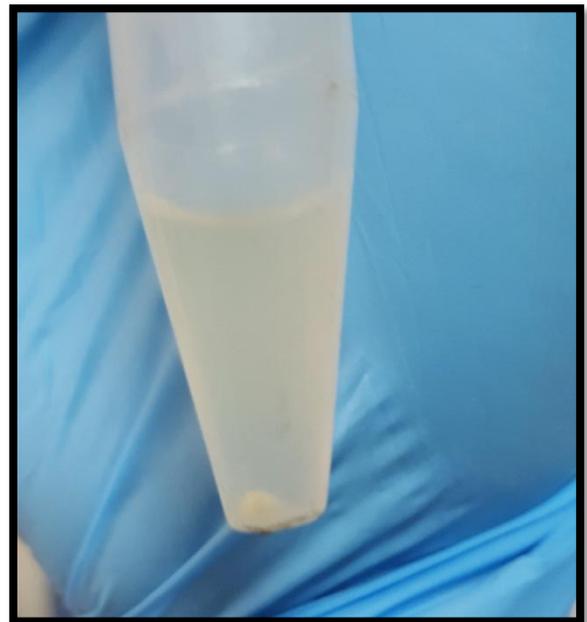


Fig 10. UFC suspendidas



Fig 11. TUBO



Fig 12. 50 TUBOS CON 1ml CANDIDA ALBICANS

ANTIBIOGRAMA

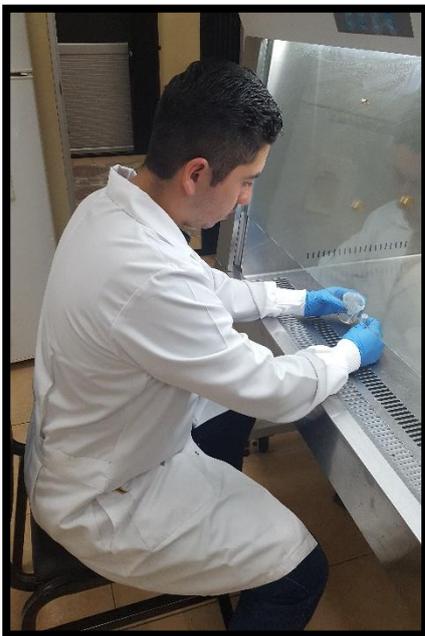


Fig 13. MUESTRA

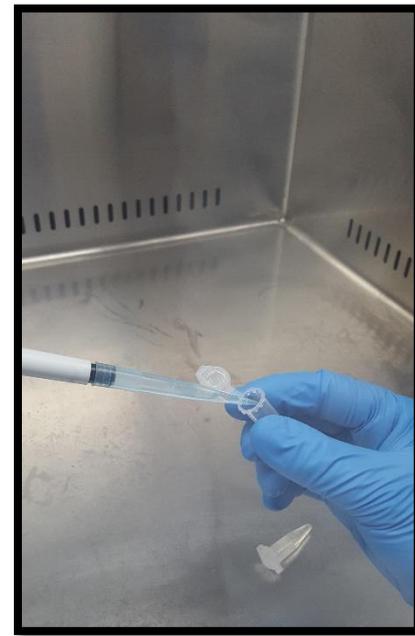


Fig 14. 0,1ml de CANDIDA

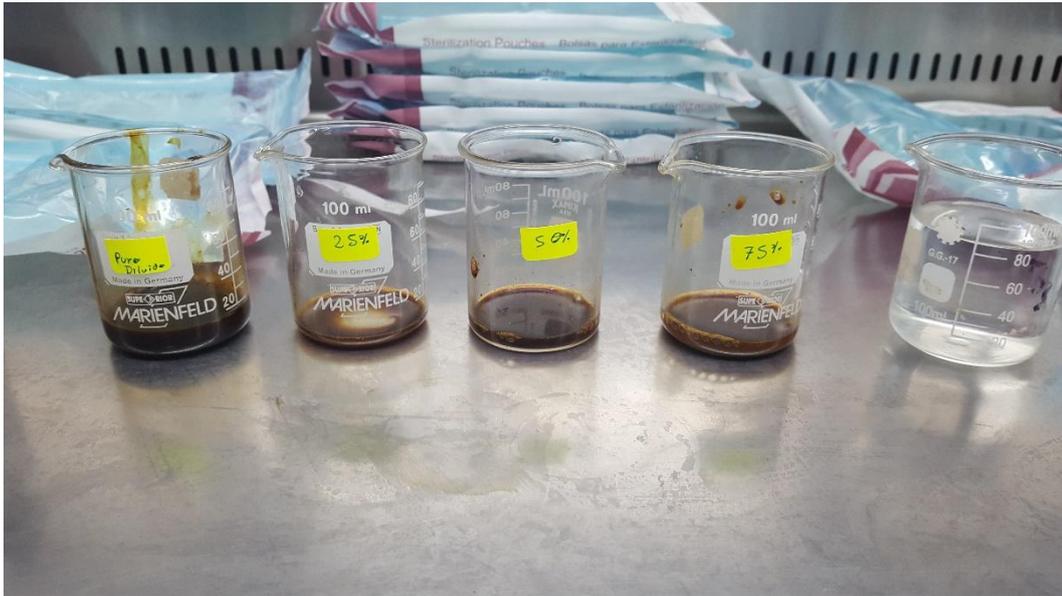


Fig 15. Extracto alcohólico de romero en 100%,75%,50%,25%

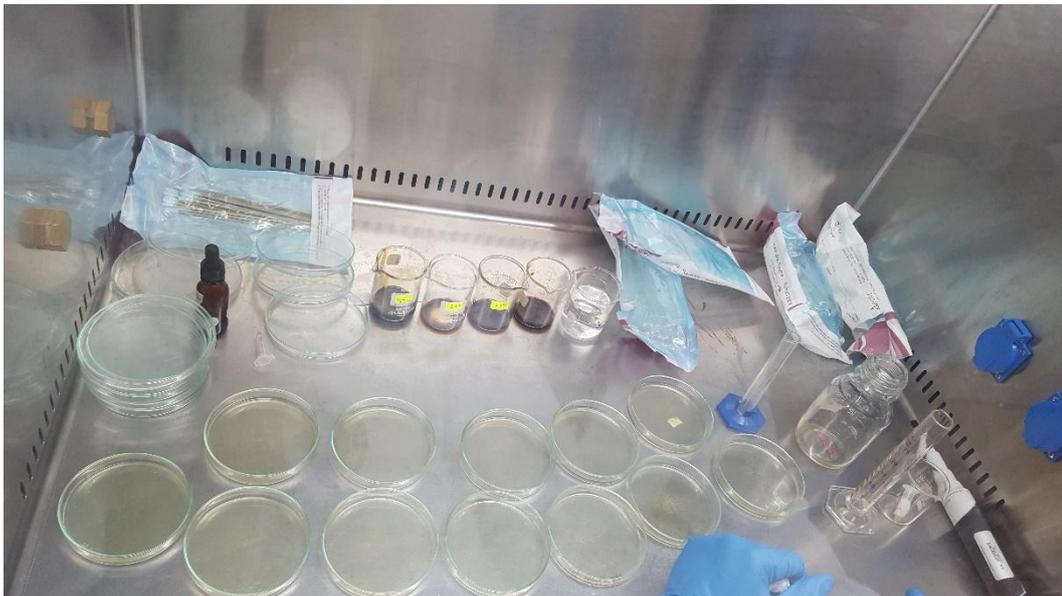


Fig 15. Extracto alcohólico de romero en 100%,75%,50%,25% y cajas Petri inoculadas

RESULTADOS

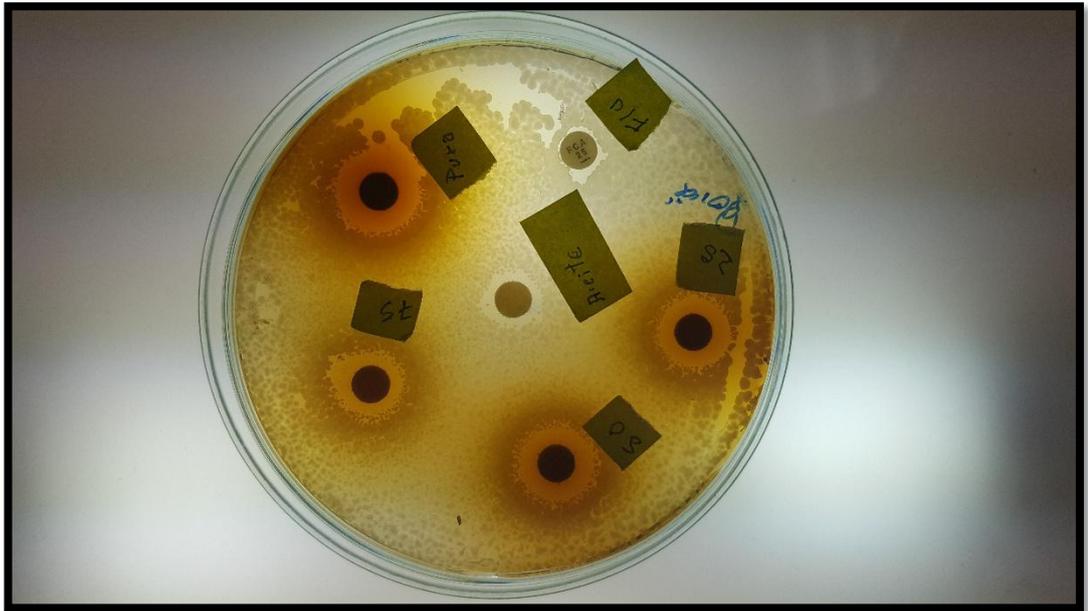


Fig 16. caja Petri HALOS DE INHIBICIÓN

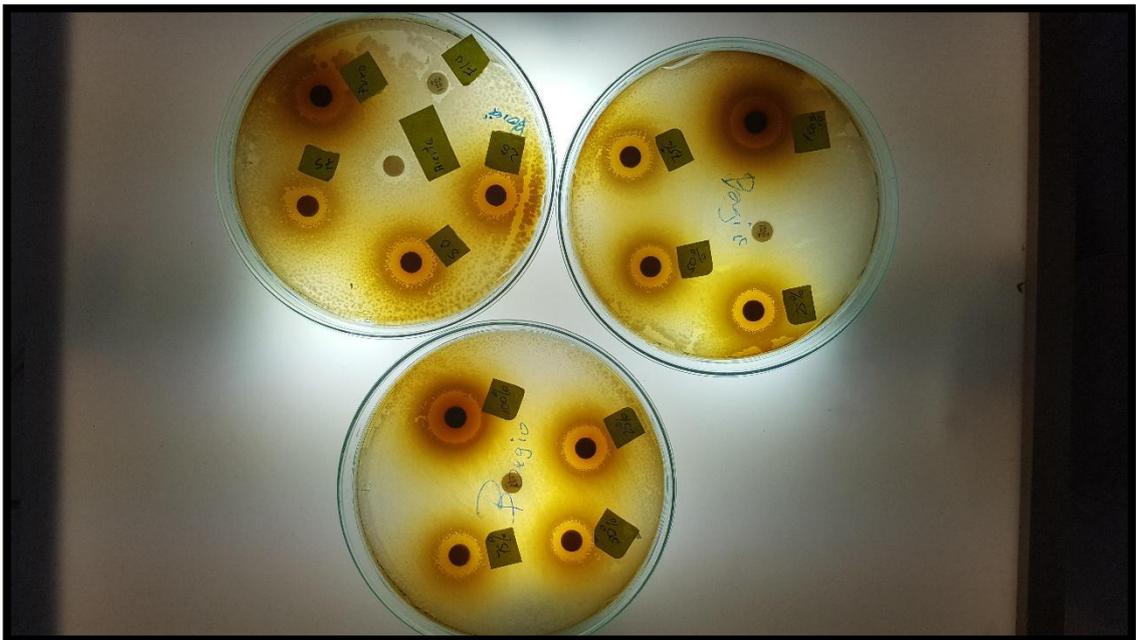


Fig 16. Cajas Petri HALOS DE INHIBICIÓN

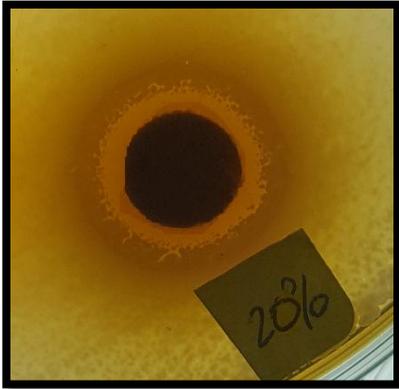


Fig 17. Halos de inhibición con discos al 20 %



Fig 18. Halos de inhibición con discos al 15 %

