



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE INGENIERIA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AMBIENTAL

“Efecto de la concentración del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*
“romero” sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum*”

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OBTENER EL GRADO DE
BACHILLER EN INGENIERIA AMBIENTAL

AUTOR:

Marco Leoncio Salazar Castillo

ASESOR:

Dr. Julio Roger Chico Ruíz

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Conservación y Manejo de la Biodiversidad

TRUJILLO – PERÚ
2018

RESUMEN

La presente investigación tuvo como propósito evaluar el efecto del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* in vitro; para la cual, se preparó y esterilizó el medio agar Sabouraud conteniendo concentraciones de dicho aceite esencial de 0 (control), 2,0; 5,0; 10,0 y 50,0 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Se sembró por puntura central un fragmento de micelio proveniente de un cultivo monospórico del hongo en estudio, se incubó a 25 °C por 10 días y se realizaron las lecturas del crecimiento midiendo el diámetro micelial en milímetros. Se encontró que el aceite esencial de hojas de *R. officinalis* “romero” a medida que se incrementa la concentración de 2,0; 5,0; 10,0 a 50,0 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ reduce significativamente el crecimiento micelial de *F. oxysporum*. desde 88,60; 77,67; 44,66 hasta 0,00% respectivamente en relación al control. Se concluye que el aceite esencial de hojas de *R. officinalis* “romero” afecta el crecimiento micelial de *F. oxysporum*.

Palabras clave: *Rosmarinus officinalis*, aceite esencial, *Fusarium sp*, crecimiento.

ABSTRACT

The purpose of the present investigation was to evaluate the effect of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* "rosemary" on the growth of *Fusarium oxysporum* in vitro; for which, the Sabouraud agar medium was prepared and sterilized, and it was containing concentrations of said essential oil of 0,0 (control), 2,0; 5,0; 10,0 and 50,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, respectively. A fragment of mycelium from a monosporic culture of the fungus under study was planted by central puncture, incubated at 25 ° C for 10 days and mycelial growth readings in millimeters in diameter were made. It was found that the essential oil of leaves of *R. officinalis* "rosemary" as the concentration of 2.0 increases; 5.0; 10.0 to 50.0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ significantly reduces the mycelial growth of *F. oxysporum* so from 88.60; 77.67; 44.66 to 0.00% respectively with respect to the control. It is concluded that the essential oil of leaves of *R. officinalis* "rosemary" affects the mycelial growth of *F. oxysporum*.

Key words: *Rosmarinus officinalis*, essential oil, *Fusarium sp*, growth

INDICE

Índice.....	ii
Resumen.....	iii
Abstract.....	iv
I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Realidad problemática.....	1
1.2 Trabajos previos.....	2
1.3 Teorías relacionadas al tema.....	5
1.4 Formulación del problema.....	9
1.5 Justificación del estudio.....	9
1.6 Hipótesis.....	10
1.7 Objetivos.....	10
II. MÉTODO	
2.1 Diseño de investigación.....	11
2.2 Variables, operacionalización.....	11
2.3 Población, muestra, selección de la unidad de análisis.....	13
2.4 Técnica e instrumento de recolección de datos, validez y confiabilidad.....	13
2.5 Métodos de análisis de datos.....	18
2.6 Aspectos éticos.....	18
III. RESULTADOS	19
IV. DISCUSIÓN	21
V. CONCLUSIONES	24
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
ANEXOS	29

I. INTRODUCCIÓN

1.1. Realidad problemática

En las últimas décadas se ha incrementado el interés de la aplicación de extractos vegetales o de aceites esenciales de los vegetales que lo sintetizan para controlar diferentes fitopatógenos, a fin de reducir el uso de plaguicidas químicos sintéticos en la agricultura. Se ha demostrado que los extractos de vegetales y los aceites esenciales obtenidos de plantas, presentan más de sesenta componentes y de los cuales varios de ellos con marcada actividad antifúngica.

Por otro lado, se vienen implementando paulatinamente los principios (12) que rigen la química verde, sobre la necesidad de realizar esfuerzos de manera integrada a fin de reducir la utilización de pesticidas y fertilizantes de síntesis química. Esto ha sido posible gracias a la inclusión progresiva de productos naturales bioactivos (extractos y aceites esenciales de plantas) usados en el desarrollo de los denominados “agroquímicos verdes”

En esta década, los gobiernos nacionales, regionales y locales, sector industrial, educativo y sociedad civil en general, ha sido una prioridad el cuidado del ambiente, respecto aprovechamiento racional los subproductos agroindustriales; para ello se está implementando procedimientos de reutilización de los materiales residuales que dicho sector puede generar, favoreciendo rendimientos económicos que están permitiendo contribuir a la reducción de los costes en la gestión de estos residuos (Navarrete, 2010). Por lo tanto, es importante la realización de estudios que potencien el desarrollo de procesos tecnológicos, económicos, eficaces y rentables; que incentiven la utilización de los desechos agroindustriales como fuente de materia prima adecuada para la obtención de productos de alto valor agregado, como son los aceites esenciales.

El uso irracional de los plaguicidas de origen químico sintético ha generado serios problemas ambientales, tales como: plagas resistentes, contaminantes en las cadenas tróficas y en el ambiente físico (aire, agua, suelo), la fauna benéfica ha sido destruida

o alterada, ha generado nuevas plagas y potencialmente más agresivas, entre otras. Por lo tanto, el uso no inteligente de los plaguicidas químicos sintéticos ha conllevado a la reducción de la interrelación trófica entre los diferentes organismos, a la pérdida de la biodiversidad, al desequilibrio ecológico y al incremento de la inestabilidad ambiental (López, *et al.* 2006).

1.2 Trabajos previos

Muchos autores, realizando pruebas *in vitro*, han reportado que diferentes extractos vegetales y los aceites esenciales presentan actividad antifúngica, tanto a nivel de invernadero como de campo; para ello, se han utilizado diferentes métodos de extracción para los extractos y para los aceites esenciales, mostrando cada uno de ellos cierta variación de respuesta en función de la especie vegetal, la parte utilizada, la concentración de los componentes, los cultivos de fitopatógenos y de la técnica de evaluación utilizada (Ramírez, 2013).

A nivel internacional

Guerrero (2012). En su tesis “Evaluación de aceites esenciales de *Lippia origanoides* en el control de hongos fitopatógenos (*Fusarium sp.*, y *Colletotrichum sp.*) en el cultivo de ají cayena *Capsicum annum*, trabajando en condiciones de laboratorio, seis concentraciones de aceite esencial de *Lippia origanoides*, 473,50; 236,75; 121,20; 60,60; 30,30 y 0,00 mg.L⁻¹ y tres concentraciones en condiciones de invernadero de 473,50; 236,75 y 0.00 mg.L⁻¹, inoculando 120 plantas con los dos hongos fitopatógenos. Encontró que la concentración del aceite esencial de *L. origanoides* correspondiente a 473,75 mg.L⁻¹ inhibió el crecimiento de *Fusarium sp.*, y *Colletotrichum sp.*, tanto en condiciones *in vitro* como en invernadero.

Barrera y García (2008). Las autoras investigaron el efecto antifúngico del aceite esencial de *Thymus vulgaris* y sus componentes sobre el crecimiento de *Fusarium sp.*, durante 8 ocho días de incubación. Encontraron que el mayor efecto antifúngico se presentó con el aceite esencial, inhibiendo totalmente al fitopatógeno en todas las concentraciones (200, 250 y 300 µg.mL⁻¹); en tanto que los aceites esenciales de

Syzygium aromaticum, *Cinnamomum zeylanicum*, y *Telexys ambrosioides*, presentaron inhibición del crecimiento micelial a la concentración de 100 a 300 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$; por otro lado, los aceites esenciales de *Allium sativum*, *Citrus aurantifolia*, *Ruta chalepensis*, *Mentha piperita* y *Eucalyptus globulus* no mostraron actividad antifúngica en todas las concentraciones ensayadas.

Alzate, et al. (2009). Evaluaron la acción antifúngica de los aceites esenciales de diferentes vegetales y subproductos tales como *Eucalyptus sp* (Myrtaceae), *Citrus sinensis* (Rutaceae) y cáscara de naranja a diferentes concentraciones frente a *Trichoderma harzianum*, *Absidia sp* y *Fusarium oxysporum*; encontrando inhibición completa con el aceite esencial de eucalipto sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum* a 3000 ppm (3 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$); *Absidia sp* y *T. harzianum* mostraron mayor susceptibilidad a los componentes contenidos en los aceites esenciales y los crecimientos fueron inhibidos completamente a 1000 ppm (1 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$). Por otro lado el aceite esencial de cáscara de naranja presentó muy baja actividad fungicida sobre *Trichoderma harzianum* a 11000 ppm (1 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$).

Muy-Rangel, et al. (2018). Caracterizaron el aceite esencial de ajo por cromatografía de gases y de masas, además evaluaron su efecto sobre el crecimiento radial y biomasa in vitro de *Alternaria tenuissima*. Se encontró que el aceite esencial contenía principalmente dialil-disulfuro y dialil-sulfuro en un 23.64 y 20.33%, respectivamente y que la concentración de 1,000 ppm (1,0 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$) inhibió el crecimiento radial y producción de biomasa en 100 y 86.20%, respectivamente.

A nivel Nacional

Pérez, et al., (2017). Han caracterizado y evaluado la eficiencia del aceite esencial de hojas de *Lippia alba* sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. Para ello, trabajan con cuatro concentraciones del aceite esencial, a 0,5; 1,0; 3,0 y 10 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$, utilizando acetona como diluyente. Encontraron como componente mayoritario del aceite esencial al citral (40.03%) y a la concentración de 10000 ppm con mayor capacidad fungicida, de 97.8%, casi similar a la acción fungicida del Benomil (100%).

León (2017). Ha evaluado el efecto fungicida de los aceites esenciales de *Piper nigrum*, *Origanum vulgare* y *Rosmarinus officinalis* sobre *Aspergillus flavus*, *Penicillium sp.* y *Fusarium solani*; cuyas concentraciones fueron de 0,3; 0,5; 0,7 y 1.0% respectivamente, se incubó por 12 días a temperatura ambiente. Se encontró que, en todas las concentraciones ensayadas, el aceite esencial de *P. nigrum* y *R. officinalis* no presentaron inhibición sobre el crecimiento micelial de dichos hongos; en tanto que, el aceite esencial de *O. vulgare* los inhibió completamente en todas las concentraciones ensayadas.

A nivel regional

Cuzco y Chico-Ruíz (2015). Evaluaron la actividad antifúngica del aceite esencial de *O. vulgare* L. sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* durante 4 días de incubación a temperatura ambiente; encontrando que el mayor porcentaje de inhibición se consiguió con el tratamiento con aceite esencial de 1000 ppm ($1 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) correspondiente al 99.7%, concluyendo que el uso de dicho aceite esencial es una alternativa para el control para *R. solani*.

Rodríguez y Chico (2012). Determinaron la actividad antifúngica del extracto hidroalcohólico de *Datura stramonium* frente a *Fusarium oxysporum*, encontrando que, dicho extracto al 5, 10 y 15% mostró una actividad antifúngica correspondiente al 41,07; 48,20 y 61,65%.

Segura (2019). Ha evaluado el efecto del aceite esencial de *Ocimum basilicum* L. “albahaca” sobre el crecimiento de *Fusarium sp* in vitro, a las con concentraciones de 0,5; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 y $50 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente y además del control (0 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Encontró que el aceite esencial de albahaca desde la concentración de 2 $\mu\text{L}/\text{mL}$ inhibe completamente el crecimiento micelial de *Fusarium sp*.

1.3 Teorías relacionadas al tema

Los daños generados por las diversas plagas agrícolas y las malas prácticas desarrolladas para prevenir su aparición o mitigar sus efectos, han venido dándose de los inicios de la misma agricultura. Si bien es cierto, las plagas son un problema de difícil solución; la preocupación mayor son las diversas situaciones de hambruna que se presentan en el mundo, a las que se añaden las pérdidas que generan en los cultivos y productos almacenados. La FAO (2008), estimaba que un 40% del suministro mundial de alimentos se perdía debido a las plagas.

El fracaso de los plaguicidas químicos sintéticos debido al gran impacto generado en el ambiente, resulta un nuevo enfoque en la relación plaguicida y ambiente; este enfoque considera no solo los efectos del plaguicida sobre la especie plaga y otros organismos, sino que además incluye su preparación y formulación. Esta es la misión y visión del nuevo paradigma, la “química verde”, también denominada química sustentable, cuya preocupación mayor es la prevención de la contaminación.

Química verde en la agricultura.

En las últimas décadas las tendencias verdes impulsan nuevas tecnologías que buscan la eliminación o reducción del impacto ambiental generados por los procesos de transformación con el fin de implementar alternativas orientadas al desarrollo sostenible. Los aspectos relacionados con la visión de la química verde están disponibles en Green Chemistry Institute - <http://www.acs.org/greenchemistry>. La química verde está fundamentada en 12 principios (Warner et al., 2004) que presentan alta influencia en las nuevas tendencias de la agricultura.

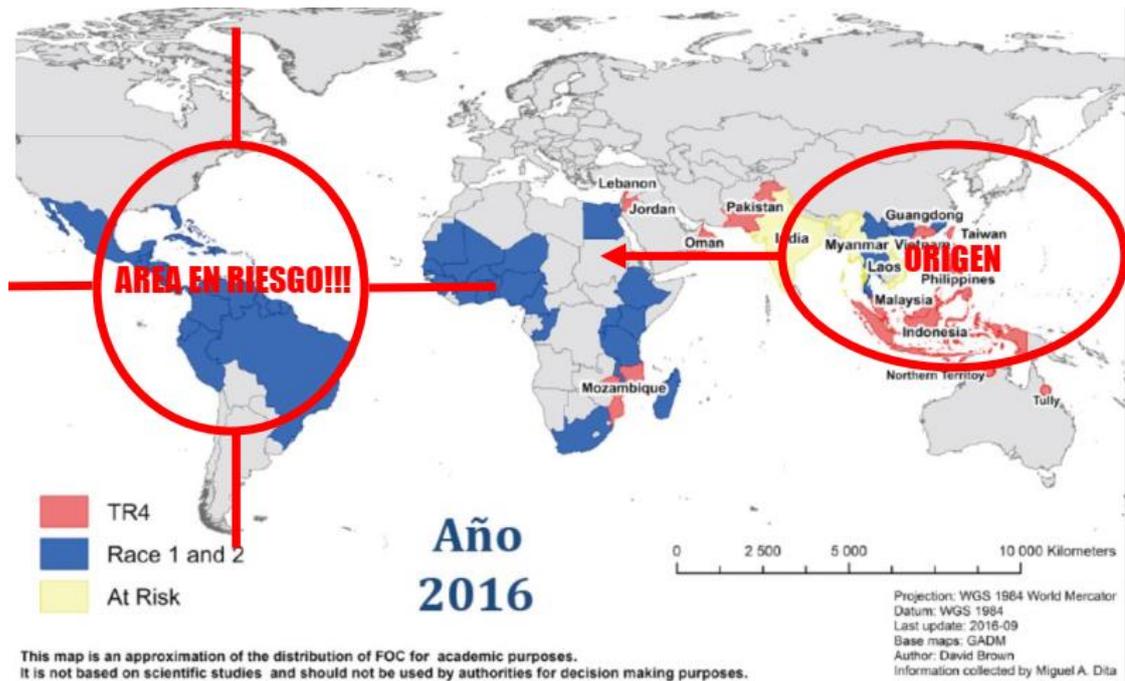
1. Mejor es prevenir la generación de residuos, que eliminarlos después de su generación.
2. Que la metodología de síntesis en el diseño, deben incorporar todos los materiales usados durante el proceso, y maximizar el producto final, reduciendo así la generación de subproductos
3. Diseñar metodologías de síntesis que generen productos con toxicidad nula o escasa, tanto para el humano como para el ambiente.

4. Sintetizar productos químicos que sean muy eficaces en su función y que no presenten toxicidad o en todo caso sea mínima.
5. Los reactivos auxiliares, como disolventes, deben ser innecesarios e inocuos.
6. Considerar a las necesidades energéticas (condiciones de temperatura y presión) en razón a los impactos que generan tanto ambientales como económicos.
7. La materia prima de partida en los procesos debe ser renovable y no agotable.
8. Evitar la generación innecesaria de derivados.
9. Usar catalizadores selectivos.
10. Sintetizar productos químicos no persistentes en el ambiente, sino de degradación inerte.
11. Desarrollar métodos de analíticos que faciliten el monitoreo y control a tiempo real del proceso previo a la generación de componentes peligrosos.
12. Elegir materiales que, en los procesos químicos no exista riesgo de accidentes.

Plaga.

Pérez y Consuegra (2004). Definen plaga en la agricultura como, “cualquier organismo que genere una disminución en la calidad o el rendimiento de un cultivo o cosecha en una cantidad tal que sea económicamente inaceptable para el productor”.

A inicios del siglo XX, la marchitez producida por *Fusarium* ocasionó importantes pérdidas en las plantaciones en Panamá adquiriendo el nombre de “*mal de Panamá*”, sin embargo, (Dita *et al.*, 2017), han propuesto la sustitución por el nombre técnico de “Marchitez por *Fusarium* de las musáceas”.



Fuente: Villegas y Urías (2018).

Clasificación botánica, origen y descripción general de *R. officinalis* L.

La clasificación de la planta en estudio se muestra a continuación.

Reino : Vegetal
 División : Angiospermae
 Clase : Dicotyledonia
 Subclase : Sympetalese
 Orden : Tubiflorae
 Familia : Lamiaceae
 Género : Rosmarinus
 Especie : officinalis

Nombre científico: *Rosmarinus officinalis* L.

Nombre común : Romero

Purca (2013). Refiere que el romero, *R. officinalis*, es una de las plantas más utilizadas artesanalmente por la población, esto debido a sus múltiples propiedades medicinales que posee; es una planta tipo arbusto que presenta tallos de forma

prismáticos, sus hojas son finas, estrechas, agudas y pequeñas que contienen aceites esenciales con diversos principios activos (Ruiz, et al, 1975; López, 2008; Díaz, et al. 2011).



Figura.1. Planta de romero en floración.

Los aceites esenciales

Gil y Sáez (2005). Sostienen que los aceites esenciales son un conjunto de componentes volátiles debido a su bajo peso molecular, que son producto del metabolismo de los vegetales, su composición depende de su síntesis a partir de la serie derivados del ácido mevalónico, correspondiendo principalmente a monoterpenos y sesquiterpenos, que responden a la condensación de isoprenoides de fórmula $(C_5H_8)_n$, junto a otras moléculas oxigenadas, como alcoholes, ésteres, éteres, aldehídos y compuestos fenólicos, los cuales transmiten las propiedades que van a caracterizar a los aceites esenciales.

Lock (2016). En el libro Investigación Fitoquímica, describe que los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal, así en las coníferas (pino, abeto), mirtáceas (eucaliptus), rutáceas (*Citrus* spp), compuestas (manzanilla), sin embargo, están presentes principalmente en las familias de las

Lamiaceae (menta, lavanda, tomillo, espliego, romero) y las umbelíferas (anís, hinojo). Por otro lado, los aceites esenciales tienden a concentrarse, dependiendo de la especie vegetal, en diferentes órganos, como raíz, rizoma (jengibre), leño (alcanfor), hoja (eucalipto), fruto (anís), sumidades floridas (F. Labiatae). Así mismo, la composición del aceite esencia dependerá del lugar de origen, del hábitat en que se desarrolle, del momento de la recolección, el método de extracción que se utilice. Finalmente, éstos presentan propiedades terapéuticas, conservantes, saborizantes, también pueden ser tóxicos y con ciertas propiedades abortivas. Por lo que los aceites esenciales son de gran interés para la industria farmacéutica, alimentaria, agropecuaria y en la perfumería.

1.4 Formulación del problema

¿Cuál es efecto de la concentración del aceite esencial de hojas de *Rosmarinos officinalis* “romero” sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* in vitro?

1.5 Justificación del estudio

Los daños generados por las diferentes plagas agrícolas y las prácticas realizadas para prevenirlas o reducir sus efectos, son ya conocidos desde la antigüedad de la agricultura misma. Cabe indicar que las plagas siguen siendo un problema cuya solución es aún muy difícil.

La fusariosis causada por distintas especies de *Fusarium sp* es una enfermedad que daña la calidad de muchos frutos, como el plátano, la zona radicular de leguminosas y llega a causar importantes pérdidas en dichos cultivos, por ello, se hace necesario investigar la interacción de la planta con el patógeno tanto molecular como bioquímica, básicas y aplicadas, a fin de proveer nuevas alternativas para el control de fitopatógenos.

En efecto, los cultivos industriales y de exportación como el cacao, el plátano, el mango, arveja, entre otros, son en algún momento atacados por *Fusarium sp*, cuyo efecto del fitopatógeno en algunos lugares ha sido contrarrestado tratándolos mediante el control químico y medidas culturales, sin embargo, la utilización del

aceite esencial de las hojas de *R. officinalis*, resulta novedoso para reemplazar a los químicos debido a que no inducen a resistencia, no contaminan el ambiente y resultan menos costosos y incursionando dentro de la química verde.

1.6 Hipótesis

A medida que se incrementa la concentración del aceite esencial de hojas de *Rosmarinos officinalis* “romero”, disminuye el crecimiento micelial de *F. oxysporum* in vitro.

1.7 Objetivos

1.7.1 General

Evaluar el efecto de la concentración del aceite esencial hojas de *R. officinalis* “romero” sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum* in vitro.

1.7.2 Específicos.

- Evaluar la velocidad de crecimiento del micelio de *F. oxyporum* cuando se expone a diferentes concentraciones de aceite esencial de *R. officinalis* “romero”.
- Evaluar el porcentaje de inhibición del micelio de *F. oxysporum* cuando se expone a diferentes concentraciones de aceite esencial de *R. officinalis* “romero”.
- Analizar estadísticamente los datos obtenidos en los ensayos realizados.

II. METODO

2.1 Diseño de investigación.

La presente investigación es básica, explicativa y el diseño utilizado el clásico de estímulo creciente; tal como se expresa en la tabla siguiente.

Tabla 1. Diseño de investigación, respecto a los tratamientos del aceite esencial de *R. officinalis* “romero” expresados en concentración V/V ($\mu\text{L}/\text{mL}$) y el probable crecimiento micelial de *F. oxysporum*.

Nº	Testigo / Tratamiento	Concentración ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Crecimiento micelial (%)
[1]	Testigo	0,0	100
[2]	Tratamiento (T1)	2,0	(100 – A)
[3]	Tratamiento (T2)	5,0	(100 – B)
[4]	Tratamiento (T3)	10,0	(100 – C)
[5]	Tratamiento (T4)	50,0	(100 – D)

Donde: $T=100 \geq A \geq B \geq C \geq D$; siendo A, B, C y D las lecturas del crecimiento de *F. oxysporum*, medido el diámetro micelial en milímetros

Cada placa contuvo diferentes concentraciones del aceite esencial de *R. officinalis* “romero” en relación al medio de cultivo utilizado, en relación V/V, (Tabla 1).

2.2 Variables, operacionalización

Variable Independiente: Concentración del aceite esencial de *R. officinalis* “romero”

Variable dependiente: Crecimiento micelial de *F. oxysporum*.

TABLA DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

Variables	Definición conceptual	Definición Operacional	Indicadores	Escala de Medición
<p>Independiente: Aceite esencial de hojas de <i>R. officinalis</i> “romero” en diferentes concentraciones.</p>	<p>Se refiere a un conjunto de moléculas de bajo peso molecular, de naturaleza no polar sintetizadas por las plantas y obtenidas por hidrodestilación de arrastre de vapor.</p>	<p>Proceso de extracción del aceite esencial de hojas de <i>R. officinalis</i> y cálculo de las concentraciones de ensayo.</p>	<p>Distintas concentraciones del aceite esencial de hojas de <i>R. officinalis</i> “romero”</p>	<p>uL.mL⁻¹</p>
<p>Dependiente: Crecimiento micelial de <i>F. oxysporum</i> en el medio agar Sabouraud.</p>	<p>De micelio aéreo abundante y algodonoso, a veces afelpado, blanquecino, rosa violáceo y púrpura, generalmente en el centro del micelio. De macroconidios traslúcidos, hialinos, curvos y semicurvos, con extremos puntiagudos, con septos de tres a cinco.</p>	<p>Siembra y aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i>.</p>	<p>Tamaño de micelio en la placa de siembra. Velocidad de crecimiento</p>	<p>mm. %</p>

2.3 Población, muestra, selección de la unidad de análisis

Población: Corresponde a todas plantaciones de *R. officinalis*.

Muestra: Corresponde a 5 kg de hojas de *R. officinalis* colectadas en Pedregal, Distrito de Simbal, Provincia de Trujillo-Perú.

Unidad de análisis: corresponde al aceite esencial extraído de *R. officinalis* por destilación por arrastre de vapor de agua.

2.4 Técnica e instrumento de recolección de datos, validez y confiabilidad

2.4.1 Lugar de Ejecución:

El presente trabajo de investigación fue desarrollado en el laboratorio de Tecnología Enzimática y Productos Naturales, Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal de la Universidad Nacional de Trujillo.

2.4.2 Colección de material biológico:

El material biológico, para este trabajo fueron hojas de *R. officinalis* “romero” las que se colectaron de cultivos agrícolas ubicados en Pedregal, distrito de Simbal, localizado a 8°00'30.4" latitud Sur y a 78°49'39.0" Oeste, Provincia de Trujillo; éstas fueron colocadas en cajas de cartón para su traslado al laboratorio de Tecnología Enzimática y Productos Naturales.



Figura 1. Foto satelital de tierras de cultivo de romero en Pedregal, Distrito de Simbal, Provincia de Trujillo, Libertad-Perú.

Fuente: Google maps.

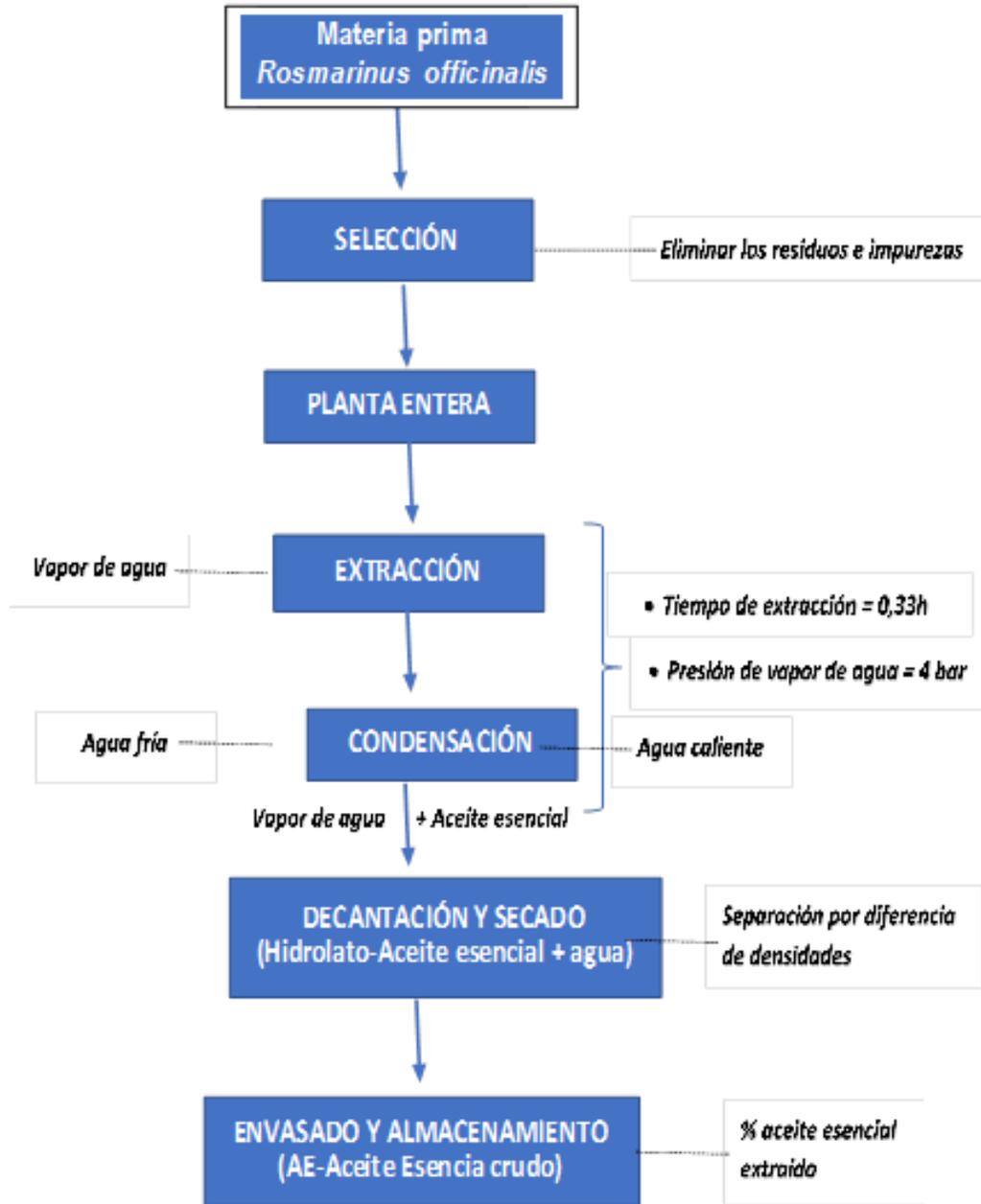
2.4.3 Selección de Material Biológico:

El material biológico colectado fue debidamente clasificado, seleccionándose las que estuvieron aparentemente sanas y completas. Una muestra de las plantas de *R. officinalis* L. fue llevada al *Herbarium Truxilense* (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo para su identificación taxonómica según el sistema filogenético de la especie (Anexo 2).

2.4.4 Obtención del aceite esencial de *R. officinalis* “romero”

La obtención del aceite esencial de *R. officinalis* realizó en un equipo de destilación por arrastre de vapor de agua (Jiang, et al., 2011), en el laboratorio de Farmacognosia, Departamento Académico de Farmacotecnia – Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo. Para ello se verificó que en la cámara generadora de vapores contenga agua en cantidad suficiente para la extracción respectiva, se cargó la cámara de extracción de aceites esenciales con la planta completa de romero, previamente seleccionada, equivalente a aproximadamente a un peso de 5 Kg, se colocó la tapa de dicho equipo, se cerró herméticamente y se conectó a la energía eléctrica hasta ebullición; se hidrodestilaron los aceites esenciales por 20 min y se colocó en una pera de separación. Se repitió este procedimiento hasta extraer los aceites esenciales de un peso total de plantas de 10 kg. Se mezclaron los hidrolatos separados en cada proceso de extracción, se eliminó el exceso de agua y finalmente se deshidrato con sulfato de sodio anhidro, obteniendo un volumen total de 8 mL de dicho aceite esencial crudo, el cual fue colocado en un frasco de color ámbar previa rotulado y se conservó en refrigeración a 4°C hasta el momento de su uso.

Diagrama de flujo de la extracción del aceite esencial de *R. officinalis* “romero” por el método de destilación por arrastre de vapor de agua.



2.4.5 Preparación de las concentraciones del aceite esencial de hojas de *R. officinalis* “romero”

Se prepararon diferentes concentraciones (V/V) del aceite esencial de *R. officinalis* con una solución de tween 80 al 0,1% en viales de 2 mL. En la tabla 2 se observan las concentraciones del aceite esencial de *R. officinalis* “romero” preparadas para esta investigación

Tabla 2. Concentraciones de aceite esencial de hojas de *R. officinalis* “romero” para evaluar el crecimiento micelial de *F. oxysporum* in vitro.

Tratamiento	Concentración A.E. ($\mu\text{L.mL}^{-1}$)
Control	0,0
T1	2,0
T2	5,0
T3	10,0
T4	20,0

2.4.6 Obtención de *Fusarium oxysporum*.

El cultivo de *F. oxysporum*, fue donado por el laboratorio de tecnología Enzimática y Productos Naturales, Departamento de Química Biológica y Fisiología Animal; el cual fue aislado de un trabajo previo a partir plantas de arveja con pudrición radicular de cultivos de Pedregal- distrito de Simbal; cuyo aislamiento se desarrolló siguiendo la metodología de Castaño-Zapata (1998), se sembraron segmentos de tejido afectados en placas Petri conteniendo agar PDA (papa- dextrosa-agar) + antibiótico y luego se incubaron a $25,0\pm 1,0^{\circ}\text{C}$, hasta observar el crecimiento micelial y esporulación característico de *F. oxysporum* y se identificó el género mediante claves

taxonómicas especializadas de hongos (Barnett y Hunter, 1998; Castaño-Zapata y Salazar, 1998; Leslie y Summerell, 2006).

Para evaluar el efecto de las concentraciones del aceite esencial de la planta en estudio; el fitopatógeno fue sembrado por estría, incubado en las mismas condiciones anteriormente indicadas y cuando se observaron pequeños micelios desarrollados, se tomó un fragmento y se sembró nuevamente en el mismo medio y se incubó en las mismas condiciones antes descritas. Este fue denominado cultivo monospórico, el cual fue utilizado en la ejecución del trabajo de investigación.

2.4.7 Efecto de la concentración del aceite esencial de hojas de *R. officinalis* “romero” sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum*.

El efecto de la concentración del aceite esencial de hojas *R. officinalis* “romero” sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum* se determinó por siembra por puntura central del fitopatógeno en estudio en placas con medio de cultivo agar Sabouraud conteniendo las concentraciones de 2,0; 5,0; 10,0 y 50,0 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente, y como testigo control de crecimiento micelial se utilizó la misma solución de tween 80 al 0,1%. Se incubaron durante 10 días, el crecimiento micelial fue registrado y medido en milímetros (mm), a temperatura promedio de $25,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$.

Se determinó el porcentaje de crecimiento micelial respecto al testigo absoluto sin tratamiento, utilizando la relación (Castaño-Zapata y Salazar, 1998):

$$\text{PC} = \frac{\text{DMCT}}{\text{DMCA}} \times 100$$

Dónde:

PC = Porcentaje de crecimiento

DMCT= Diámetro de la colonia creciendo con tratamiento.

DMCA = Diámetro de la colonia creciendo sin tratamiento.

Velocidad de crecimiento con mediciones diarias y se hace una curva

Porcentaje de inhibición: control-tratamiento / tratamiento X 100

2.4.8 Validez y confiabilidad de los resultados

Para garantizar la validez, confiabilidad y reproducibilidad de los resultados se realizaron 3 repeticiones y cada uno de los tratamientos y control por triplicado.

2.5. Métodos de análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico simple. Se aplicó un análisis de varianza (ANAVA) para determinar si existen o no diferencias significativas entre las concentraciones aplicadas en esta investigación, utilizando el programa estadístico Statgraphics Centurion versión de prueba 15.

2.6. Aspectos éticos

Este proyecto “Efecto del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum*”, muestra total convicción para contribuir a la solución de un problema ambiental, que es el uso de plaguicidas agrícolas, cada uno de los procedimientos utilizados en la ejecución del presente Trabajo de investigación están enmarcados dentro del aspecto ético, del respeto y de la valoración del ambiente.

III. RESULTADOS

En la Figura 2, se muestra el efecto de la concentración del aceite esencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis* sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* en condiciones de laboratorio a los 10 días de incubación, donde se puede observar que a medida que se incrementa la concentración de dicho aceite esencial, disminuye el crecimiento micelial del fitopatógeno en estudio; es decir en el control (0,0 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) crece 69,42 mm (100%), luego a 2,0; 5,0; 10,0 y 50,0 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$ crece 61,50 (88,60%), 53,92 (77,67%), 31,00 (44,66%) y 0,0 (0,00%) mm respectivamente.

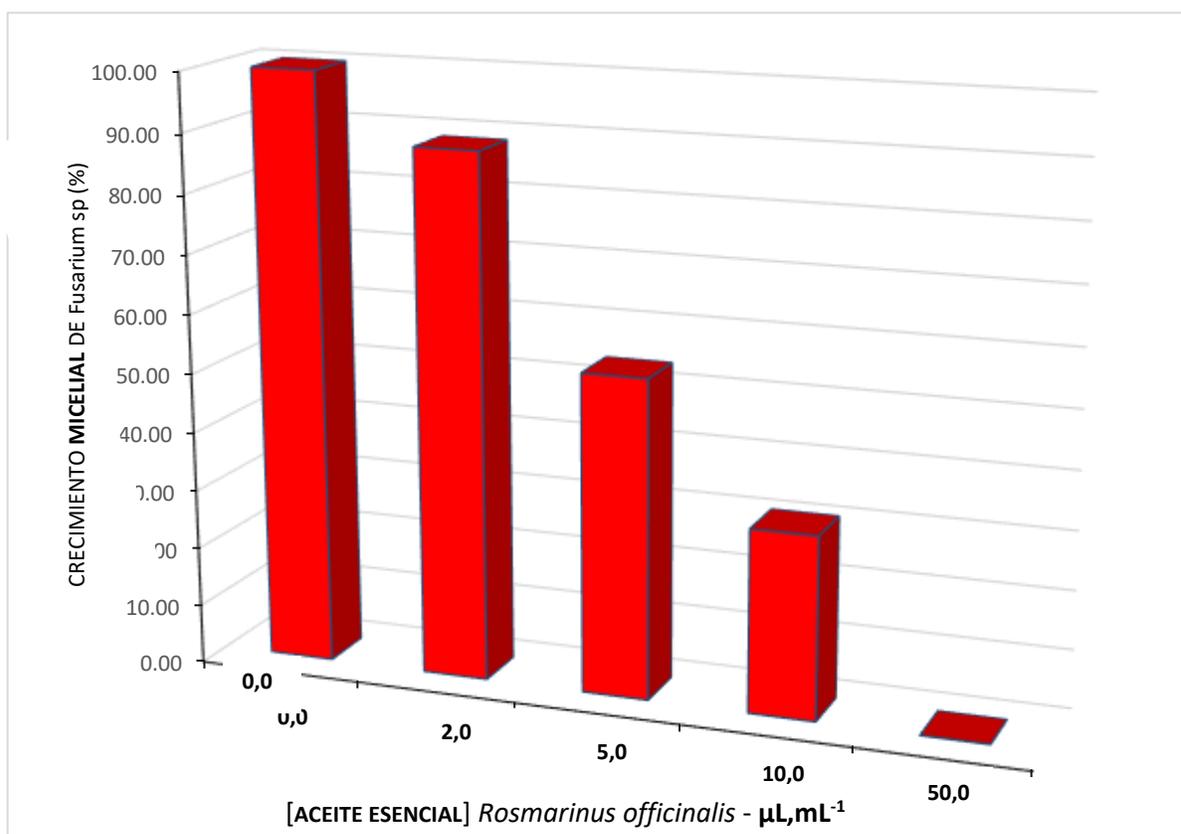


Figura 2. Efecto de la concentración del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* durante 10 días de incubación en condiciones de laboratorio.

En la Tabla 3 se consignan los resultados del análisis de varianza para la variable de respuesta crecimiento micelial (mm) de *F. oxysporum*, observándose que se detectan diferencias altamente significativas entre los promedios de las concentraciones del aceite esencial de hojas de *R. officinalis*.

Tabla 3. Análisis de varianza (ANOVA) para la variable respuesta crecimiento micelial de *F. oxysporum* por frente a las concentraciones del aceite esencial de *R. officinalis* “romero” en condiciones de laboratorio a los 10 días de incubación.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	9456.38	4	2364.09	2532.96	0.0000
Intra grupos	9.33333	10	0.933333		
Total (Corr.)	9465.71	14			

La prueba de promedios múltiple de Tukey (Tabla 4), compara el crecimiento micelial de *Fusarium* sp bajo diferentes concentraciones de aceite esencial de *R. officinalis* “romero”. Se observa que no hay crecimiento micelial (0,0mm) de *Fusarium* sp., en la concentración de 50,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ y que difiere significativamente de los valores registrados en las concentraciones de 10,0; 5,0; 2,0 y 0,0 (control) $\mu\text{L.mL}^{-1}$, cuyos promedios de crecimiento micelial fueron en su orden de 31,00; 53,92; 61,50 y 69,42 mm respectivamente.

Tabla 4. Pruebas de Múltiple Rangos (Tukey) para el crecimiento micelial (mm) de *F. oxysporum* para las diferentes concentraciones del aceite esencial de hojas de *R. officinalis* “romero” en condiciones de laboratorio a los 10 días de incubación.

Método: 95.0 porcentaje Tukey HSD

<i>Nivel</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
50 $\mu\text{l/mL}$	3	0.0000	X
10 $\mu\text{l/mL}$	3	31.0000	X
5 $\mu\text{l/mL}$	3	53.9167	X
2 $\mu\text{l/mL}$	3	61.5000	X
Control	3	69.4167	X

IV. DISCUSIÓN

La extracción del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” en la presente investigación fue baja, ya que se utilizó 5 kg y se obtuvo un volumen de 8 mL lo que significa una recuperación de aceites esenciales aproximadamente del 0.16% obtenido por destilación por arrastre de vapor. Es importante indicar, que si bien es cierto no fue el objetivo del trabajo evaluar el rendimiento de extracción del aceite esencial de romero, sin embargo, se puede indicar que, en el presente estudio, éste fue de aproximadamente 0,16%, por debajo de los obtenidos de plantas en otros suelos, por Valverde y Leonardo (2011), cuyo rendimiento oscila entre 0,6114% de tejido en estado fresco y 0.9817% de tejido seco a medio ambiente.

Por otro lado, en la presente investigación, no se investigó la composición del aceite esencial de romero en un cultivo de esta zona (Pedregal-Simbal-Trujillo), sin embargo, con los resultados revisados en la bibliografía, Djeddi, et al. (2007), encontró que dicho aceite esencial contiene canfor, 1,8-cineol, β -cariofileno, borneol, β -pineno, canfeno, entre otros y porcentajes son de 14,6; 12,2; 10,9; 10,6; 8,5 y 7,2% respectivamente; con respecto a cuales son y cuanto existe cada uno de los componentes del aceite esencial de romero, se observa diferencia entre ellas se debería principalmente a factores genéticos, ambientales y nutricionales de las plantas.

En el presente trabajo de investigación sobre el efecto de la concentración del aceite esencial de hojas de *R. officinalis* sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* se ha encontrado que al incrementar la concentración del aceite esencial, el crecimiento micelial del fitopatógeno en estudio disminuye hasta hacerse nulo (Fig. 2); demostrando su efecto fungicida a la concentración de $50\mu\text{L.mL}^{-1}$.

El análisis de varianza realizado muestra que existen diferencia estadísticamente significativa al 5% entre las medias de los tratamientos para todos los ensayos realizados sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum* sometido al efecto del aceite esencial de *R. officinalis* “romero” respecto al control.

En la Figura 2 y Tablas 3 y 4, se observa que, el mayor crecimiento de *F. oxysporum*. fue, por su puesto, en el control, donde no contiene el aceite esencial de romero, solo contenía la solución de tween 80 al 0,1%, utilizada para preparar las concentraciones de dicho aceite esencial, mostrando un crecimiento máximo 69,42mm, el que equivale al 100% de crecimiento micelial radial. En relación a las diferentes concentraciones del aceite esencial de *R. officinalis* “romero” utilizado para evaluar su efecto sobre el crecimiento de *F. oxysporum*, se muestra que a la concentración de 2,0; 5,0 y 10,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ (2000, 5000 y 10000 ppm) el crecimiento del fitopatógeno en estudio se redujo de 61,50; 53,92 a 44,66 mm, que corresponde al 88,60; 77,67 y 44,66% respecto al control y en el tratamiento con la concentración de 50,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ no se observó crecimiento alguno.

Por otro lado, los resultados encontrados en el presente trabajo, a la concentración de 50,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ de inhibición completa (100%) del crecimiento micelial de *F. oxysporum* es mayor a los reportados por Alzate, et al. (2009), en la evaluación de la actividad fungicida del aceite esencial extraído de cáscara de naranja sobre *F. oxysporum* y *Absidia sp* que está alrededor de 1,0 $\mu\text{L.L}^{-1}$ y también mayor al aceite esencial de eucalipto, que completamente ha inhibido el crecimiento de *F. oxysporum* a la concentración de 3000 ppm (3,0 $\mu\text{L.L}^{-1}$).

Teniendo en cuenta la gran cantidad de componentes presentes en el aceite esencial de romero (Djeddi, et al., 2007), es probable que su actividad antifúngica no tenga un mecanismo específico. Por ello, el efecto inhibitor de este aceite esencial generalmente probablemente se deba a algún componente en especial o la mezcla de los componentes que lo conforman. Además, estos componentes presentan carácter lipofílico e hidrofóbico que son importantes debido a la polaridad que estos poseen.

(Freisesleben y Jager, 2014). Confirma que los componentes encontrados en el aceite esencial romero pertenecen a la serie de los monoterpenos, que pueden afectar diferentes sitios de la célula y los mecanismos probables de actividad antifúngica sería la inhibición de la formación de la pared celular fúngica, que al inhibirse la síntesis de los β -glucanos, se interrumpiría la integridad de la pared celular. También indica que, otro mecanismo probable es la interrupción de la membrana celular que, al inhibirse la biosíntesis del ergosterol, la integridad de la membrana celular se interrumpiría y ésta se volvería permeable. Otro mecanismo sería la disfunción de las mitocondrias fúngicas, que al inhibirse el transporte de electrones mitocondriales se reducirá el potencial de la membrana mitocondrial, lo cual lleva a una reducción en la producción de ATP y posteriormente a la muerte celular. Estos investigadores indican que también sería posible un mecanismo de inhibición de la división celular que puede ocurrir a

través de la inhibición de la polimerización de los microtúbulos, y por consecuencia, inhibe la formación del huso mitótico. Finalmente, se tiene a la probable inhibición de la síntesis de ARN /ADN o síntesis de proteínas que, al ingresar los componentes a la célula, a través de un transporte activo en ATPasas e interfiere con el ARN, esto puede provocar una síntesis defectuosa en el ARN e inhibir la transcripción del ADN.

Las plantas a las que no se les ha observado plaga alguna, sería importante extraer sus aceites esenciales, estudiar y evaluar su actividad antifúngica a fin de proponer un modelo de control que compatibilice con los principios de la química verde; en este sentido el *R. officinalis* “romero” es una de esas plantas a las que no presenta plaga y sus aceites esenciales son eficaces para controlar *F. oxysporum* y hasta ahora parecen ser inocuos para el hombre y afectan el ambiente.

V. CONCLUSIONES

En relación a las condiciones de trabajo, los resultados obtenidos y el análisis estadístico realizado a fin de evaluar el efecto de las concentraciones del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, se concluye que:

- El incremento de las concentraciones del aceite esencial de hojas de *R. officinalis* “romero” de 2,0 a 10 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ disminuye el crecimiento micelial de *F. oxysporum* del 88,60 al 44,66%.
- La concentración del aceite esencial de hojas de *R. officinalis* “romero” de 50,0 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ inhibe completamente (100%) el crecimiento micelial de *F. oxysporum*.
- La capacidad de recuperación del aceite esencial de hojas de *R. officinalis* “romero” fue del 0,16%

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALZATE N., LÓPEZ I., MARÍN I., MURILLO A. Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, Myrtaceae) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, Rutaceae) sobre algunos hongos filamentosos. Revista Tumbaga, | 4 | 59-71. 2009.

BARNETT H.L., HUNTER B.B. Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth Edition. Minnesota, USA: Burgess Publishing Company. 218p. 1998.

BARRERA Laura y GARCÍA Laura. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). Revista UDO Agrícola. 8 (1): 33 - 41. 2008

CASTAÑO-ZAPATA J. Prácticas de laboratorio de fitopatología. Práctica (20). 2da. Ed. Departamentos de Fitotecnia y de Protección Vegetal. Escuela Agrícola Panamericana. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad de Caldas. Colombia. 103p. 1998.

CASTAÑO-ZAPATA J. y SALAZAR H. Illustrated guide for identification of plant pathogens. Universidad de Caldas. Manizales, Colombia. 108 p. 1998.

CUZCO, Cynthia y CHICO-RUIZ, Julio. Efecto antifúngico del aceite esencial de *Origanum vulgare* sobre el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani*. SAGASTEGUIANA. 3 (1): 79 - 86. 2015.

DÍAZ P., CABRERA M., ALEM D., LARRAÑAGA P., FERREIRA F. y DALLA M. Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. Chilean J Agric Res. 71: 231 - 239. 2011.

DITA, M.A., HADDAD F. y AMORIM E. Marchitez por *Fusarium* de los bananos en Brasil: estado actual y avances en las investigaciones de EMBRAPA dirigidas al manejo sostenible de la enfermedad: VIII Seminario científico internacional. Instituto de investigaciones de sanidad vegetal. La Habana-Cuba. Libro de resúmenes por sesiones. (Foc 05), 20-21p. 2017.

DJEDDI D., BOUCHENAH N., SETTARN I. and SKALTSA H.D. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Algeria Chemistry of Natural Compounds, 43 (4): 487 – 490. 2007

FAO. El cambio climático, las plagas y las enfermedades transfronterizas. 2008 [Online]. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/i0142s/i0142S06.pdf>.

FREISESLEBEN S.H. y JAGER A.K. Correlation between plant secondary metabolites and their antifungal mechanism - a review. Med. Arom. Plants. 3: 1 – 6. 2014.

GIL E. y SAEZ, A. Evaluación a escala de planta piloto del proceso industrial para la obtención de aceite esencial de cardamomo, bajo la filosofía cero emisiones. Cuaderno de Investigación, 30, 42. 2005.

GREEN CHEMISTRY INSTITUTE. Disponible en <http://www.acs.org/greenchemistry>.

GUERRERO Angélica. Evaluación de aceites esenciales de *Lippia origanoides* en el control de hongos fitopatógenos (*Fusarium* sp., y *Colletotrichum*) en el cultivo de ají cayena *Capsicum annuum*. Trabajo de tesis para obtener el título de Magíster en Ciencias Biológicas con énfasis en Recursos Fitogenéticos Neotropicales. UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA. 2012.

JIANG Y., WU N., FU Y., WANG W., LUO, M., ZHAO, C., et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. Environmental Toxicology and Pharmacology, 32, 63–68. 2011.

LEÓN Cynthia. Determinación de la acción antifúngica de los aceites esenciales de pimienta negra (*Piper nigrum*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y orégano (*Origanum vulgare*) sobre hongos postcosecha en ají paprika (*Capsicum annuum* L.). Tesis para obtener el Título Profesional de Licenciada en Biología. UNIVERSIDAD RICARDO PALMA. 2017

LESLIE J.F. y SUMMERELL B.A. The Fusarium laboratory manual. Lackwell Publishing, Ames, IA, U.S.A. 387p. 2006.

LOCK, Olga. Investigación Fitoquímica. "Métodos en el Estudio de Productos Naturales". 3ed. Fondo Edit. Pontificia Universidad Católica del Perú. Lima Perú. 2016.

LÓPEZ M. El romero, planta aromática con efectos antioxidantes. OFFARM. 27: 60 - 63. 2008.

LÓPEZ B. S.; VÁZQUEZ B. y RODRÍGUEZ H. Inhibición del Crecimiento Micelial de *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. Lycopersici (Sacc.) Snyder y Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn y *Verticillium dahliae* Kleb. Mediante extractos vegetales acuosos. Rev. Mex. Fitopatol. 2006. 23 (2): 183 - 190.

MUY-RANGEL María, OSUNA-VALLE Jesús, GARCÍA-ESTRADA Raymundo, SAN MARTÍN-HERNÁNDEZ Cesar, QUINTANA-OBREGÓN Eber. Actividad antifúngica in vitro del aceite esencial de ajo (*Allium sativum* L.) contra *Alternaria tenuissima*. Revista Mexicana de Fitopatología. Mexican Journal of Phytopathology, 36, (1): 199p. 2018.

PÉREZ N. y CONSUEGRA N. Manejo ecológico de plagas. La Habana, Cuba: Centro de Estudios de Desarrollo Agrario y Rural CEDAR, 2004, p. 296

NAVARRETE, C. Extracción y caracterización del aceite esencial de mandarina obtenido de residuos agroindustriales. Dyna, 77 (162): 85-92. 2010.

PÉREZ Alexander, CHAMORRO Leonardo y VITOLA Deimer. Caracterización química y evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial foliar de *Lippia alba* contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Revista peruana de biología, 24 (2): 211 – 216. 2017

PURCA T. Efectividad antibacteriana «in vitro» del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre la flora salival. Tesis de Cirujano Dentista. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 97 p. 2013.

RAMÍREZ, S. Efectividad de extractos vegetales en el manejo de la moniliasis (*Moniliophthora roreri*) del cacao (*Theobroma cacao* L.) en México. Tesis de Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo. Universidad Nacional. Costa Rica. 162 p. 2013

RODRÍGUEZ Manuel. y CHICO Julio. Efecto antifúngico in vitro del extracto etanólico de chamico, *Datura stramonium*, sobre *Fusarium oxysporum asparagi* y *Stemphylium vesicarium* aislados del cultivo de esparrago, *Asparagus officinalis*, de Moche, Trujillo (Perú). REBIOL, 32, (1): 57 - 67. 2012.

RUIZ M., NIETO D. y LARIOS R. Tratado elemental de botánica. 13^a ed. México: Ed ECLAL. 655 p. 1975.

SEGURA Billy. Efecto de la concentración del aceite esencial de *Ocimum basilicum* sobre el crecimiento de *Fusarium sp*, in vitro. Tesis para obtener el Título Profesional de Biólogo. Universidad nacional de Trujillo. 2019.

VALVERDE Yuseli y LEONARDO José. Extracción y caracterización del aceite esencial del romero (*Rosmarinus officinalis*) por el método de arrastre de vapor obtenida en estado fresco y secado convencional. Tesis para obtener el Título profesional de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Nacional del Centro del Perú, Tarma. 2011.

VILLEGAS Nancy y URÍAS Carlos. Análisis de Riesgo de Plagas *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 Tropical (FocR4T), como plaga cuarentenaria para la región del OIRSA. 2018.

WARNER, J. C., CANNON, A. S., & DYE, K. M. Green Chemistry. Environmental Impact Assessment Review, 24, 775-799. 2004.

ANEXOS

ANEXO 1. Componentes del aceite esencial de *R. officinalis* “romero”

TABLE 1. Composition of *R. officinalis* Essential Oil

Compound	KI*	Percentage, %	Compound	KI*	Percentage, %
α -Pinene	913	5.4	β -Caryophyllene	1395	10.9
Camphene	930	7.2	Aromadendrene	1406	0.3
β -Pinene	965	8.5	α -Humulene	1419	3.0
1-Octen-3-ol	994	0.6	α -Amorphene	1436	1.3
1,8-Cineole	1008	12.2	β -Selinene	1442	0.2
γ -Terpinene	1041	1.4	α -Zingiberene	1449	0.5
Camphor	1126	14.6	α -Muurolene	1454	0.4
Borneol	1155	10.6	γ -Cadinene	1465	1.1
Terpinolene	1164	0.7	δ -Cadinene	1474	2.0
Linalool	1175	2.2	Caryophyllene oxide	1493	3.1
α -Terpineol	1175	5.2	<i>cis</i> - α -Bisabolene	1540	Tr.
<i>cis</i> -Piperitol	1184	0.1	Caryophylla-4(12),8(13)-dien-5 β -ol	1581	0.1
Citronellol	1220	0.1	α -Bisabolol	1646	Tr.
Bornyl acetate	1257	5.3	Total		99.3
Carvacrol	1277	0.2	Grouped components		
α -Cubebene	1312	0.3	Terpenoids		
α -Copaene	1340	1.3	Monoterpene hydrocarbons		23.4
β -Bourbonene	1348	0.1	Oxygenated monoterpenes		45.0
α -Cubebene	1355	0.1	Sesquiterpene hydrocarbons		21.8
α -Cadinene	1365	0.2	Oxygenated sesquiterpenes		3.2
β -Funebrene	1373	0.1			

*KI: Kovats index.

Order of elution from a DB 5 column, including their Kovats indices calculated against C₉-C₂₄ *n*-alkanes on the DB 5 column and their percent contribution.

Tr.: trace.

Fuente: Djeddi, et al., 2007. Pag. 488

Anexo 2 . Ensamblaje del equipo de acero inoxidable de extracción de aceites esenciales de *R. officinalis L.*, Método de destilación por arrastre con vapor de agua. Laboratorio de Farmacotécnica – Facultad de Farmacia y Bioquímica – UNT



Cámara de carga del material vegetal

Condensador, receptor del hidrolato (agua+aceite esencial)

Cierre hermético del equipo de extracción de aceites esenciales por arrastre de vapor de agua



Equipo de extracción de AE por arrastre de vapor de agua



Condensador-Recepción del hidrolato

Cámara de carga del material vegetal y extracción de aceites esenciales.

Cable de conexión eléctrica

Cámara generadora de vapores de agua.



Aceite esencial crudo de romero

Fuente: propia del autor

ANEXO 3. Efecto de la concentración del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” sobre el crecimiento micelial de *Fusarium sp* hasta los 10 días de incubación.

ACEITE DE ROMERO															
<i>Fusarium sp</i>															
Día	Control			2 µl/mL			5µl/mL			10µl/mL			50µl/mL		
3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	13	13	14	9	7	8	2	2	2	-	-	-	-	-	-
	13	14	14	9	7	8	2	2	2	-	-	-	-	-	-
	13	14	13	8	8	9	2	2	2	-	-	-	-	-	-
	14	13	14	9	8	8	2	2	2	-	-	-	-	-	-

ACEITE DE ROMERO															
<i>Fusarium sp</i>															
Día	Control			2 µl/mL			5µl/mL			10µl/mL			50µl/mL		
5	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	28	28	28	20	21	20	15	14	14	2	2	2	-	-	-
	27	28	28	21	21	21	14	13	14	2	2	2	-	-	-
	28	28	29	21	21	21	15	14	15	2	2	2	-	-	-
	29	28	28	21	21	20	15	14	14	2	2	2	-	-	-

ACEITE DE ROMERO															
<i>Fusarium sp</i>															
Día	Control			2 µl/mL			5µl/mL			10µl/mL			50µl/mL		
7	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
	41	42	42	35	33	33	27	24	25	11	12	10	-	-	-
	42	42	42	34	34	33	27	24	25	10	12	10	-	-	-
	43	42	42	34	33	33	27	25	25	10	11	10	-	-	-
	42	42	43	34	33	34	27	24	25	10	12	10	-	-	-

Lecturas en mm.

ACEITE DE ROMERO															
<i>Fusarium sp</i>															
Día	Control			2 µl/mL			5µl/mL			10µl/mL			50µl/mL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
8	48	49	49	42	42	40	33	31	30	15	16	15	-	-	-
	48	49	48	42	40	39	34	31	31	15	16	15	-	-	-
	49	49	49	42	40	39	34	30	31	15	15	15	-	-	-
	48	49	49	42	40	39	33	31	31	16	16	16	-	-	-

ACEITE DE ROMERO															
<i>Fusarium sp</i>															
Día	Control			2 µl/mL			5µl/mL			10µl/mL			50µl/mL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
9	59	60	60	51	50	49	46	44	43	23	22	21	-	-	-
	58	60	60	52	50	50	45	44	44	22	23	20	-	-	-
	59	60	60	51	50	50	45	44	44	23	22	21	-	-	-
	59	60	60	51	51	49	46	44	43	22	22	21	-	-	-

ACEITE DE ROMERO															
<i>Fusarium sp</i>															
Día	Control			2 µl/mL			5µl/mL			10µl/mL			50µl/mL		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
10	68	70	71	63	62	60	55	55	53	33	31	30	-	-	-
	69	69	70	62	62	61	55	54	52	32	31	30	-	-	-
	68	70	70	62	62	60	55	54	53	32	30	30	-	-	-
	68	70	70	62	62	60	54	54	53	32	31	30	-	-	-

Lecturas en mm