

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE TALLOS DE *Rosmarinus officinalis.L* (ROMERO) EN CULTIVOS DE “*Staphylococcus aureus*” ESTUDIO INVITRO

Tesis para optar el Título Profesional de Químico
Farmacéutico y Bioquímico

TESISTAS:

Bach. DIANA CAROLINA RODENAS EGOAVIL
Bach. AIDELY RODRÍGUEZ VALQUI

ASESOR:

Dr. Q.F HECTOR VILCHEZ CACEDA

Fecha de sustentación:
22 de Mayo de 2018

LIMA – PERÚ
2018

TÍTULO:

EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE TALLOS DE ROMERO (*Rosmarinus officinalis.L*) EN CULTIVOS DE “*Staphylococcus aureus*” ESTUDIO INVITRO.

DEDICATORIA

Esta tesis lo dedicamos con mucho cariño y dedicación a Dios y a nuestras familias que gracias a su apoyo incondicional logramos culminar nuestra carrera profesional.

AGRADECIMIENTO

A Dios, a mis asesores y revisores Mg. Angélica Minaya y Mg. Edwin Alarcón por sus enseñanzas y confianza dada para el logro de mi presentación de la tesis.

A nuestras madres que nos alentaron en todo momento para seguir y terminar nuestras carreras sin rendirnos frente a las adversidades que se nos presentaron en nuestros caminos.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria

Agradecimiento

Índice General

Índice de Tablas

Índice de Figuras

Índice de Anexos

Resumen

Abstract

Introducción	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1 Descripción de la realidad problemática.....	3
1.2 Formulación del problema	4
1.2.1 Problema general.....	4
1.2.2 Problema específicos.....	4
1.3 Objetivos	5
1.3.1 Objetivo general.....	5
1.3.2 Objetivos específicos	5
1.4 Justificación e importancia del estudio	5
1.5 Limitaciones de la investigación	6
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	7
2.1 Antecedentes del estudio	7
2.1.1 Nacionales	7
2.1.2 Internacionales.....	9
2.2 Bases teóricas.....	11
2.2.1 Extracto etanólico	11
2.2.2 Tipos de extracción	12
2.2.3 Factores que intervienen en un procedimiento de extracción	14
2.2.4 Recolección y tratamiento de las drogas vegetales	16
2.2.5 Actividad antimicrobiana	19

2.2.6	<i>Staphylococcus aureus</i>	21
2.2.7	Patogenia microbiana	23
2.2.8	Tipos de infecciones cutáneas.....	24
2.2.9	Romero (<i>Rosmarinus officinalis.L</i>)	34
2.3	Formulación de la hipótesis.....	41
2.3.1	Hipótesis general	41
2.3.2	Hipótesis específicas	41
2.4	Variables	41
2.4.1	Tabla de operacionalización de variables	41
2.5	Marco conceptual	41
 CAPÍTULO III: MÉTODO		43
3.1	Tipo de estudio.....	43
3.2	Diseño a utilizar.....	43
3.3	Población.....	43
3.4	Muestras.....	44
3.5	Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	45
3.5.1	Técnica de recolección de datos	45
3.5.2	Instrumento de recolección de datos	45
3.5.3	Equipos y materiales	46
3.5.4	Obtención del extracto etanólico de tallos de <i>Rosmarinus officinalisL.</i> (Romero)	47
3.5.5	Marcha fitoquímica del extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis L.</i> (Romero)	47
3.5.6	Identificación y recolección del material botánico	50
3.5.7	Obtención de las muestras biológicas	50
3.5.8	Preparación de las concentraciones del extracto de Romero	51
3.5.9	Desarrollo del método	51
3.6	Técnica de procesamiento de datos	56
3.6.1	Procesamiento de datos	56
3.6.2	Materiales para la recolección y procesamiento de datos.....	56

CAPÍTULO IV: RESULTADOS	57
4.1 Resultados de la investigación	57
4.2 Discusión de resultados	67
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	65
5.1 Conclusiones	65
5.2 Recomendaciones	66
Referencias Bibliográficas	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 01	Protocolo de evaluación para placas petri	55
Tabla N°02	Screening Fitoquímico	57
Tabla N° 03	Prueba de solubilidad	58
Tabla N° 04	Distancia inhibitoria en mm de diámetro en las concentraciones control y concentraciones experimentales	58
Tabla N° 05	Estadística descriptiva para los halos obtenidos de cada extracto alcohólico aplicado	59
Tabla N° 06	Prueba de homogeneidad de varianzas	60
Tabla N° 07	ANOVA de un factor	60
Tabla N° 08	HSD de Tukey	61
Tabla N° 09	Prueba de subconjuntos de Tukey	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 01	Determinación del efecto antibacteriano del extracto etanólico de tallos de <i>Rosmarinus officinalis.L</i>	59
--------------	---	----

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Matriz de consistência	72
Anexo 2. Certificado botánico	73
Anexo 3. Certificado microbiológico	74
Anexo 4. Instrumento de recolección de datos microbiológico	75
Anexo 5. Ficha de validación microbiológico	76
Anexo 6. Instrumento de recolección Prueba de solubilidad.....	77
Anexo 7. Ficha de validación Prueba de solubilidad.....	78
Anexo 8. Instrumento de recolección Screening fitoquímico	79
Anexo 9. Ficha de validación Screening fitoquímico	80
Anexo 10. Testimonio fotográfico	81

RESUMEN

La presente investigación fue realizada con el objetivo de determinar el probable efecto farmacológico: Efecto antibacteriano del extracto etanólico de tallos de ***Rosmarinus officinalis.L*** (Romero) en cultivos de ***Staphylococcus aureus*** estudio in vitro. Para el desarrollo de la evaluación microbiológica se utilizó el método de difusión en disco en el cual se usó el extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis.L*** (Romero) a tres niveles de concentración en 3 placas petri que contienen las cepas de ***Staphylococcus aureus*** de acuerdo con el procedimiento del manual de técnicas de investigación de National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) y 2 placas de controles de amoxicilina base como control positivo y alcohol de 70° como control negativo. Se realizaron las observaciones y mediciones respectivas al final del estudio donde se avaluó el efecto inhibitorio de halos de inhibición comparados al control de amoxicilina base, la actividad antibacteriana generada por el extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis.L*** (Romero) al 25%, 50% y 75% comparados al control de amoxicilina base a 10ug fue menor de manera que se pudo medir la distancia en milímetros en el espacio de la placa petri hasta donde llega hacer el efecto antibacteriano en la placa sembrada. En conclusión, el extracto etanólico de los tallos de ***Rosmarinus officinalis. L*** (Romero) presenta efecto antibacteriano desde una concentración de 25% y que se llegó hasta las concentraciones de 50% y 75% sobre cepas de ***Staphylococcus aureus ATCC 6538***. También se determinó la presencia de compuestos químicos cuya acción es antibacteriana como las cumarinas (++) , alcaloides (+++), terpenos (+++) y compuestos fenólicos (+++).

Palabras clave: Efecto antibacteriano, extracto etanólico, ***Staphylococcus aureus, Rosmarinus officinalis.***

ABSTRACT

The present investigation was carried out in order to determine the probable pharmacological effect: Antibacterial effect of the ethanolic extract of stems of ***Rosmarinus officinalis.L*** (Romero) in cultures of ***Staphylococcus aureus*** in vitro study. For the development of the microbiological evaluation the disc diffusion method was used in which the ethanolic extract of ***Rosmarinus officinalis.L*** (Romero) was used at three levels of concentration in 3 petri dishes containing ***Staphylococcus aureus*** strains according to the procedure of the manual of techniques of investigation of National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) and 2 plates of controls of amoxicilina base like positive control and alcohol of 70° like negative control. The respective observations and measurements were made at the end of the study where the inhibitory effect of halos of inhibition was evaluated compared to the control of amoxicillin base, the antibacterial activity generated by the ethanolic extract of ***Rosmarinus officinalis.L*** (Romero) at 25%, 50% and 75% compared to the control of amoxicillin base at 10ug was lower so that the distance in millimeters in the space of the petri dish could be measured as far as it reaches the antibacterial effect on the plate planted. In conclusion the ethanolic extract of the stems of ***Rosmarinus officinalis.L*** (Romero) has an antibacterial effect from a concentration of 25% and reached concentrations of 50% and 75% on strains of ***Staphylococcus aureus*** ATCC 6538. The presence of metabolites whose action is antibacterial as alkaloids (+++) was also determined coumarines (++) , terpenes (+++) and phenolic compounds (+++).

Key words: Antibacterial effect, ethanolic extract, ***Staphylococcus aureus***, ***Rosmarinus officinalis***.

INTRODUCCIÓN

La presente investigación trata de establecer la efectividad de los tallos del Romero como agente antibacteriano, ya que en el Perú como en otras partes del mundo la especie ***Rosmarinus officinalis.L*** -Romero- es una planta medicinal utilizada por lo general como alternativa en la cura de diversas enfermedades, debido a sus propiedades nutritivas y medicinales, habría que resaltar que la utilización y conocimiento de la planta es bastante extendida y en el medio que crece es bien reconocido, además que crece de forma positiva en una variedad de climas. En los últimos años se ha estudiado los efectos que tiene en la salud, de los posibles compuestos bioactivos presentes en las plantas, de este modo es posible asegurar que existe más información sobre sus propiedades funcionales, medicinales y/o toxicológicas.

Como señala Purca la planta del romero, es utilizada empíricamente por la población en general, como tratamiento tradicional de diversas enfermedades, por sus propiedades expectorante, anti fúngica y antibacteriana, también son usadas para las vías respiratorias. Además, son antioxidante, antipiréticas, diuréticas y antiespasmódicas, su forma de uso es por inhalación e infusión, la cual influye en la mejoría del estado de la salud del paciente. “Se afirma que la actividad antimicrobiana del extracto etanólico del tallo de Romero se deba a la presencia de metabolitos secundarios, como compuestos fenólicos, cumarinas, entre otros”⁽⁵⁾

Asimismo, la bacteria utilizada en la presente investigación: ***Staphylococcus aureus*** “está involucrada en infecciones del tracto respiratorio superior y de la piel, las cuales persisten en la comunidad como una causa fundamental de morbimortalidad y cuya gravedad es mayor en la población infantil, radicando la importancia de este microorganismo en la resistencia a antimicrobianos de uso común en el tratamiento de las afecciones respiratorias y de la piel, Purca T. (2013)”⁵

Teniendo en cuenta que la mayoría de la población requiere de alternativas medicamentosas de costo reducido y alto beneficio para el tratamiento de infecciones bacterianas que la haría accesible a poblaciones de menores recursos

económicos. Por ello, este estudio se sustenta en la siguiente pregunta: ¿En qué medida la aplicación del extracto de tallos de ***Rosmarinus officinalis L.*** (Romero) afecta en la reducción bacteriana en cultivos de ***Staphylococcus aureus***?

El desarrollo de investigación comprende: *Capítulo I* planteamiento y formulación del problema, *Capítulo II* se presentan los antecedentes internacionales y nacionales y las bases teóricas que corresponden a las variables del estudio. En el *Capítulo III* se plantea la metodología, técnica e instrumentos de recolección de datos, procesamiento y los análisis estadísticos. En el *Capítulo IV* la discusión de resultados y finalmente el *Capítulo V* donde se propone las conclusiones y recomendaciones.

CAPÍTULO I

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Descripción de la Realidad Problemática

Paganini H.et al (2008)¹Las infecciones por ***Staphylococcus aureus*** en la actualidad es una de las causas mortales en muchos países, siendo un problema que se extiende en todas partes del mundo, así mismo la OMS ha mostrado su primera lista de «patógenos prioritarios» resistentes a los antibióticos el 27 de febrero del 2017, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana dentro de ellas a la cepa de ***Staphylococcus aureus***, mostrándose además que los antimicrobianos ya existentes han sido desplazados por la resistencia bacteriana debido a su mal uso, a esto se suma el desconocimiento del tratamiento no adecuado de los antibióticos por parte de la población que lo toma, lo cual ha conllevado que la cepas de ***Staphylococcus aureus*** sean resistentes a varios tratamientos con antimicrobianos al pasar de los años.

Washington C.(2007)² La población que sufre infecciones por ***Staphylococcus aureus*** presenta variedades de manifestaciones y enfermedades siendo las edades más vulnerables los niños y tercera edad por el cual morfológicamente estas bacterias son cocos gran positivos y crecen fácilmente en casi todos los medios bacteriológicos y entre las enfermedades que pueden desarrollar o causar daños en la piel, diarreas, vómitos, provocando distintos síntomas en el transcurso de su evolución, Situación que se agravara si no se toman alternativas de solución.

Bustos J. (2006)³ La opción para el tratamiento es incluir nuevos antimicrobianos que sean eficaces y puedan mostrar un efecto positivo frente a estas bacterias. En la mayoría de países alrededor del mundo se tratan las infecciones por ***Staphylococcus aureus*** con antimicrobianos como la penicilina en primera medida, sin embargo, a este tratamiento se ha reemplazado por nuevos medicamentos como las cefalosporinas, carbapenemos, debido a la resistencia bacteriana a las penicilinas. Este estudio determinó la erradicación y control de forma eficaz de las infecciones causadas por ***Staphylococcus aureus*** evitando los costos altos y reacciones adversas marcadas por ser de origen natural de modo que no se tiene al utilizar antibióticos que se usa en la actualidad. Esta planta Romero (***Rosmarinus officinalis. L***), es usada en la población de la amazonia peruana de forma tradicional en infusiones para tratar la flatulencia y diarreas.

Entre las causas que contribuyen a estas infecciones son las bajas defensas del organismo, también las malas condiciones de higiene y a esto se suma las heridas y enfermedades mal curadas.

1.2. Formulación del Problema

1.2.1 Problema general

¿Cómo afecta la aplicación del extracto etanólico de tallos de Romero (***Rosmarinus officinalis.L***) en la reducción bacteriana en cultivos de ***Staphylococcus aureus***?

1.2.2 Problemas específicos

1. ¿Qué tipos de metabolitos secundarios presenta en mayor cantidad el extracto etanólico de tallos de Romero (***Rosmarinus officinalis.L***)?
2. ¿Determinar que concentraciones se presenta el efecto antibacteriano del extracto de tallos de Romero (***Rosmarinus officinalis.L***), en cultivos de ***Staphylococcus aureus***?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

- Determinar como la aplicación del extracto etanólico de tallos de romero (*Rosmarinus officinalis.L*) afecta en la reducción bacteriana en cultivos de *Staphylococcus aureus*.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Determinar algunos metabolitos secundarios con mayor presencia en el extracto etanólico de tallos de Romero (*Rosmarinus officinalis.L*).
2. Determinar cómo las concentraciones del extracto de tallos de romero (*Rosmarinus officinalis.L*) afecta en el diámetro de halo de inhibición en cultivos de *Staphylococcus aureus*.

1.4 Justificación e Importancia del Estudio

Bustos J. (2009)³ El manejo terapéutico de las enfermedades infecciosas ha tenido muchas investigaciones de interés en el campo farmacéutico. A lo largo de los años se ha demostrado diferentes alternativas terapéuticas para tratar las infecciones como son los antimicrobianos de primera generación, macrólidos, cefalosporinas entre otras clasificaciones de antimicrobianos para mejorar la eficacia y efectividad farmacológica.

Por lo cual, es necesario estudiar la efectividad del romero (*Rosmarinus officinalis.L*) por su actividad antimicrobiana y por tener origen vegetal para mejorar el tratamiento antibacteriano frente a la resistencia bacteriana y efectos secundarios que presentan los antibióticos de naturaleza sintética.

En el presente trabajo se corroboró la técnica de extracción etanólico del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis.L*) sobre cultivos de

Staphylococcus aureus para determinar el efecto antibacteriano, por ello la metodología que se utilizó servirá de base para contribuir investigaciones futuras así mismo por sus principios activos naturales beneficiará al campo farmacéutico.

La investigación sobre el extracto etanólico (***Rosmarinus officinalis.L***) es importante para la industria farmacéutica por ser un producto alternativo así como, para los pacientes en la medida que tendrán más alternativas de tratamiento, en esta medida las industrias farmacéuticas tendrían una nueva línea de fármacos a base de principios activos naturales. Los estudios en el campo farmacéutico se ampliarían mejorando las terapias para enfermedades infecciosas haciendo la participación de los químicos farmacéuticos relevantes en el estudio y manejo de nuevas alternativas de tratamiento.

1.5 Limitaciones de la Investigación

La realización de la presente investigación evidenció limitaciones que circunscriban su calidad, dentro de estas encontramos las siguientes:

- a) El presupuesto se limita a un estudio de 5 placas petri de cepas de ***Staphylococcus aureus***, como muestra de estudio.
- b) Las investigadoras sólo tienen acceso al laboratorio en los horarios en los cuales la Universidad Nacional Mayor San Marcos lo permita previa coordinación con el profesional encargado.
- c) Las investigadoras se limitan a maniobrar equipos, materiales y a utilizar los reactivos sólo bajo la supervisión del personal encargado.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del Estudio

La revisión bibliográfica permitió identificar los siguientes antecedentes:

2.1.1 Nacionales

Sosa J. (2015)⁴, Trabajó una tesis de efecto antibacteriano in-vitro del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis*. L(Romero) y del agua ozonizada sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* de la Universidad Señor de Sipan, el investigador evaluó con dos concentraciones distintas de compuestos (25 mg/ml y 50 mg/ml del extracto de *R. officinalis* y 0,41 mg/ml y 0,82 mg/ml de agua ozonizada), el objetivo fue determinar el efecto antibacteriano, además del control positivo con clorhexidina al 0,12% y el control del solvente que fue etanol absoluto. Para evaluar el efecto antibacteriano, tanto del extracto alcohólico como del agua ozonizada se procedió a sembrar con hisopo estéril el inóculo estandarizado de *S. mutans* y de *E. faecalis* independientemente en placas con agar Mueller Hinton a las cuales se les colocó un disco de papel de filtro estéril en el centro de las mismas y se incorporó 25 µL de cada concentración del extracto alcohólico como del agua ozonizada. Las placas sembradas e inoculadas fueron incubadas a 36°C en condiciones de anaerobiosis durante 24 horas. La lectura de los resultados se hizo midiendo el diámetro, en milímetros, del halo de inhibición formado para cada bacteria con respecto a cada concentración de los compuestos evaluados. “Se encontró que a la concentración de 25 mg/ml del extracto alcohólico de *R. officinalis* se produjo un halo promedio 25 mm para *E. faecalis* y de 19 mm para *S. mutans*. Mientras que a la concentración de 50 mg/ml se obtuvo un halo de inhibición

promedio de 36 mm para *E. faecalis* y de 24 mm para *S. mutans*. El halo formado en el control de clorhexidina al 0,12 % fue de 16 mm y es semejante al obtenido con el solvente etanol absoluto. Con el agua ozonizada los halos fueron menores al control positivo”. Se presume que el efecto del extracto pudo deberse a los compuestos fenólicos presentes en la planta cuyos efectos bactericidas están bien descritos. “Se concluye que a las concentraciones de 25mg/ml y 50mg/ml del extracto alcohólico de *R. officinalis* existe efecto bactericida sobre *S. mutans* y *E. faecalis* en condiciones de laboratorio y este efecto se incrementa cuando se le agrega agua ozonizada”.

Purca P. (2013)⁵, Hizo un estudio de efectividad antibacteriana "in vitro" del extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis*** (Romero) sobre flora salival, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, donde el objetivo de este estudio fue “determinar la efectividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de ***Rosmarinus officinales*** (Romero)” a concentraciones de: 25mg/ml, 50 mg/ml y 75 mg/ml contra microorganismos frecuentes en la flora salival y compararlos con el control positivo la clorhexidina 0,12 % y control negativo el agua destilada. Se seleccionaron 22 pacientes que acudieron a atenderse en la clínica de la Facultad de Odontología de la UNMSM. Se procedió a tomar la muestra de saliva no estimulada, luego se llevó las muestras al laboratorio de microbiología para su procesamiento. Se sembró en el medio Agar Tripticasa soya, se utilizó el método de difusión en pocillos con las soluciones experimentales y se incubó durante 24h y 48h a37° C, para luego proceder a la lectura de los diámetros del halo de inhibición. Los resultados que se obtuvieron fueron halos de inhibición en promedio de 12,47 mm para 25 mg/ml, 17 mm para 50 mg/ml, 20,56 para 75 mg/ml, 15,56 para la clorhexidina0, 12%, 5 mm para el agua destilada. Concluyendo que el extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis*** (romero), presenta una efectividad antibacteriana sobre flora salival.

San Román S. (2013)⁶, estudió la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *R. officinalis* in vitro sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica, cuyo objetivo fue tomar

como control positivo a la clorhexidina 0,12 %. Donde se seleccionaron 24 pacientes con diagnóstico clínico y radiográfico de periodontitis crónica, que acudieron a atenderse en la clínica de la Facultad de Odontología de la UNMSM. Se procedió a tomar la muestra con conos de papel número 30 se colocó dentro del saco periodontal durante 30 segundos, luego se llevaron las muestras al laboratorio de microbiología para su procesamiento. Se utilizó el método de difusión en pocillos con las soluciones experimentales y se incubó en condiciones de anaerobiosis, por 48 h a 37 °C, para luego proceder a la lectura de los diámetros del halo de inhibición. De los resultados se concluye que existe igual actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *R. officinalis* a una concentración de 75mg/ml con la clorhexidina 0,12 % sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica.

2.1.2. Internacionales

Solano X (2016), desarrolló una investigación cuyo objetivo fue demostrar si existe inhibición de crecimiento bacteriano in vitro de *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extractos: acuoso y oleoso de ***Rosmarinus officinalis*** (Romero), aplicando la técnica microbiológica de difusión en disco. El estudio responde a un diseño experimental, utilizando controles: positivo Clorhexidina al 0.12% y negativo agua destilada, se realizaron 15 repeticiones para cada extracto en concentraciones de 1,5 y 3% para el extracto acuoso y 50% para el extracto oleoso. Para la evaluación antimicrobiana de los extractos se utilizó una cepa estandarizada del *S. mutans* ATCC 25175 y se empleó la técnica de difusión en medio sólido, en la cual se impregnaron 20µL de cada sustancia en discos de papel filtro y se incubaron a 37°C por 48 horas. De acuerdo a los resultados, “El extracto oleoso elaborado produjo una media de 11,93mm de halos de inhibición, mientras que los extractos acuosos no produjeron halos de inhibición. Se concluye que existe inhibición de crecimiento bacteriano in vitro de *Streptococcus mutans*, al utilizar extracto oleoso de romero, aplicando la técnica microbiológica de difusión en disco; mientras que al utilizar extracto acuoso de romero no se observa inhibición de este microorganismo.

También se observó el extracto acuoso de romero elaborado, presenta un color café oscuro, con un olor característico a romero, intenso y una apariencia líquida transparente. El extracto oleoso se observó de color amarillo verdoso, con un olor característico a romero e intenso y una apariencia líquida viscosa, propia de un aceite.”⁷

Mosquera T. (2014), hizo una investigación con el objetivo de comparar la eficiencia antibacteriana entre parabenos frente al aceite esencial de romero, para lo cual desarrolló cinco fórmulas de champús en las que varía únicamente el ingrediente de acción conservante: una fórmula de conservante comercial, corresponde a una mezcla de parabenos al 0.7% concentración aceptada por regulaciones internacionales como COLIPA, tres utilizando el aceite esencial del romero al 1.5% y 2.5%, y la quinta sin ninguno de los ingredientes antibacterianos. Aplicó el método de eficiencia preservante ISO 11930:2012 de la regulación europea 1223/2009. “Concluyendo que los resultados fueron que el aceite esencial del romero incorporado a una concentración cosmética desde una concentración de 1% genera una eficacia similar a la que presenta un conservante comercial constituido por una mezcla de parabenos incorporado a una formulación en una concentración de 0.7%. El aceite esencial puede ser considerado un sistema conservante aceptable. Con los resultados se confirma la hipótesis planteada en el estudio.”⁸

Ramos A. (2013)⁹, realizó este trabajo, con el objetivo de observar y determinar el efecto antimicrobiano de aceites esenciales e hidrosoles a partir de dos especies vegetales: *Rosmarinus officinalis* y *Taraxacum officinale* contra *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, proporcionadas por el cepario de bacterias de la facultad de Ciencias de Pontificia Universidad Javeriana.

El aceite esencial obtenido del romero, se extrajo a partir de hojas de la planta mediante el uso de un aparato de Clevenger, y el hidrosol como subproducto de la destilación; para diente de león se realizó el mismo procedimiento por hidrodestilación, encontrando únicamente hidrosol. Se realizó la evaluación de densidad como parámetro.

Complementaria a estas evaluaciones, se realizó la técnica de extracción por microgota, y a través de un cromatógrafo de gases acoplado a masas, se determinaron los compuestos presentes en el hidrosol que se encuentran en el solvente. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana tanto del aceite esencial como de los hidrosoles, se realizó por difusión de disco en agar, se realizó la lectura por halos de inhibición. La actividad antimicrobiana no se evidenció con las concentraciones evaluadas. Finalmente se “concluye que no hay aceite esencial en las hojas de diente de león. La técnica de microgota es una gran opción para la identificación de compuestos naturales, y su composición química; encontrando que en 30 comparación entre los dos solventes el diclorometano, tiene una mayor capacidad de extracción a las condiciones dadas en el ensayo y por los componentes que se encuentran en dicho extracto. Respecto a la actividad antimicrobiana, mediante las concentraciones de ensayo a las que se sometieron los microorganismos, no hay una respuesta de inhibición.”⁽⁹⁾

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. Extracto etanólico

2.2.2.1. Concepto

El extracto etanólico “tiene un olor característico, que se obtiene a partir de materia prima de origen vegetal previamente desecada, se puede realizar por maceración o percolación poniendo en contacto con etanol que podría ser de 70 grados o 90 grados. Los extractos son preparados concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia, derivados generalmente de material vegetal desecado, se obtienen al evaporar parcial o totalmente el disolvente en los líquidos extractivos de origen vegetal. Carrión A. (2010)”.¹⁰

2.2.2 Tipos de extracción

1. Maceración:

Este es un procedimiento que responde a una extracción que se realiza a temperatura ambiente, donde se remoja la materia prima previamente desecada en un solvente de etanol, se coloca en un frasco de color ámbar de vidrio tapado y se deja en reposo de 2 a 15 días agitando diariamente, luego se filtra el líquido, se exprime el residuo, se recupera el solvente en un evaporador rotatorio y se obtiene el extracto. La maceración sirve para extracción de drogas rígidas (tallos, raíces, etc.), y se reducen costos de solventes.”¹⁰

2. Percolación:

Proceso conocido también como lixiviación, siendo uno de los procesos más difundidos (generalmente alcohólica o mezcla hidroalcohólica), se puede realizar con disolventes orgánicos en frío para preservar los compuestos termolábiles que pudiera contener el material. “La percolación consiste en colocar el material fragmentado en un embudo o recipiente cónico y hacer pasar un disolvente adecuado a través del mismo. No es apropiado para resinas o materiales que se hinchen dado que el disolvente no percolará. Se requiere agregar solvente constantemente. La percolación tiene ventaja debido a que es una extracción completa de principios activos y es posible conocer la concentración exacta de principios activos, así mismo no se produce saturación y se requiere menos tiempo para la extracción comparada con la maceración. Carrión A”.⁽¹⁰⁾

a. Decocción:

Castillo J. (2018)¹¹ “Llamada también cocimiento, este procedimiento consiste en llevar a la mezcla de droga más mensturo a la temperatura de ebullición del agua, manteniendo esta temperatura durante un período variable que suele oscilar de 15 a 30 minutos”.

b. Infusión:

Añazco K. (2010)¹² “Proceso en cual se somete a la droga previamente humedecida al contacto con el solvente a una temperatura igual a la de ebullición del agua por cinco minutos, se deja enfriar hasta temperatura ambiente y se prepara al 5%”.

c. Digestión:

- “Es una maceración realizada a una temperatura suave que oscila alrededor de los 50 o 60°C; al aumentar medianamente la temperatura se consigue un mayor rendimiento de la extracción, puesto que disminuye la viscosidad del solvente lo que hace que éste pueda ingresar más rápidamente al interior de las células y así extraer los principios activos”.¹²
- También los extractos según su consistencia y concentración de principio activo se clasifican en: extractos fluidos, secos, blandos y los crioextractos.¹²

3. Extractos Fluidos: Los denominados fluidos “son extractos de drogas que, con la concentración prescrita de etanol, están preparados de forma que una parte de droga corresponde a una parte o dos partes del extracto fluido; teniendo en cuenta que 85 partes de droga seca corresponden a 100 partes de planta fresca. Por lo general los extractos fluidos se obtienen por percolación.”¹³

4. Extractos Secos: Este tipo de extractos “son aquellos que tienen una consistencia seca y son fácilmente pulverizables, se obtienen por evaporación del disolvente y desecación del residuo. Los extractos secos no deben presentar un contenido de humedad mayor del 5%. Presentan una concentración muy superior de principio activo que la droga original, son preparados bastante estables (aunque en ocasiones resultan higroscópicos) y de fácil manipulación; como líquido extractor se utiliza alcohol de diversa concentración y agua”.¹³ Actualmente es posible obtener extractos secos nebulizados que son más estables que los tradicionales, por ser menos higroscópicos.”¹³

- a. Extractos Blandos:** Son aquellos que “poseen una concentración de principio activo superior a la de la droga original y tienen consistencia semisólida. El disolvente suele ser agua o mezclas hidroalcohólicas. Los extractos blandos son poco estables y resultan difíciles de manipular; por lo que no se utilizan.”¹³
- b. Crioextractos:** “Se obtiene por molturación de la droga vegetal correctamente desecada, sometida a condiciones de congelación (-196°C), mediante inyección de nitrógeno líquido, de forma que los principios activos no se ven alterados por la acción del calor desprendido en un proceso de molturación y que dependiendo de la droga vegetal, puede llegar a ser hasta 70°C. (Castillo, 2007). Los crioextractos resultan muy caros, pero son muy útiles para la obtención de proteínas y enzimas de ciertas especies.”¹³

2.2.3 Factores que intervienen en un procedimiento de extracción

En la extracción se tiene en cuenta los siguientes factores:

- Naturaleza de la droga: Características propias del material, como dureza (semillas), si la droga es fresca o seca, comportamiento de la misma frente al menstuo (hinchamiento).
- Características del menstuo: Deberá ser lo más selectivo posible para los p. a. que se desean extraer a fin de lograr su total disolución, y que la proporción de principios inactivos que arrastre sea la menor posible.
- Es preferible utilizar menstuos con propiedades antimicrobianas, dado que las soluciones extractivas, por provenir de drogas animales o vegetales, son fácilmente atacadas por microorganismos.
- Según el tipo de producto final que se desee, la selección del menstuo se encontrará condicionada en mayor o menor medida. Ej. para el caso de tinturas o extractos líquidos, el mismo deberá ser inocuo, no tóxico, sin acción farmacológica propia; mientras que para el caso de los extractos secos la gama de disolventes para elegir es más amplia.
- Otro factor importante en la elección es el económico.

- Los solventes más utilizados son el agua, el alcohol y las mezclas hidroalcohólicas:

a. Agua

La ventaja del agua es que es un solvente natural y se utiliza para la extracción de sustancias hidrófilas, siendo además es económica, sin embargo, no es muy selectiva, también fácilmente alterable por la acción de microorganismos.

Disuelve:

- Glicósidos
- Sales de alcaloides
- Gomas
- Mucílagos
- Sales minerales
- Saponinas
- Carbohidratos
- Pectinas
- Proteínas, etc.

No disuelve:

- Alcaloides
- Grasas
- Resinas
- Aceites esenciales, etc.¹³

b. Alcohol

Este solvente tiene la ventaja de ser más selectivo, poseer cierta acción antimicrobiana e inactivar enzimas. “Es el solvente de elección para muchas de las soluciones extractivas, generalmente en mezclas hidroalcohólicas.

Disuelve:

- Glicósidos
- Alcaloides
- Aceites esenciales

- Bálsamos
- Resinas, etc.

No disuelve:

- Proteínas
- Gomas
- Pectinas
- Azúcares, etc.¹³

2.2.4 Recolección y tratamiento de las drogas vegetales

Añazco K. (2010)¹² Es ampliamente conocida la utilización empírica de las plantas como agentes de salud. Este saber tradicional se ha ido perfeccionando a lo largo del tiempo, tamizado por el rigor científico de ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos que buscan los principios activos para explicar en forma racional el uso terapéutico de una planta y que permite además la vigencia de su empleo. La obtención de las drogas vegetales se realiza a partir de las plantas medicinales, las cuales se pueden clasificar en silvestres y cultivadas.

2.2.4.1 Selección: Como señala Añazco K. (2010)¹².La selección de las plantas se realiza según el contenido del principio activo en las diferentes drogas, así también, que permita su fácil recolección y manipulación. Se pueden describir “dos tipos de selección:

- Aquella que nos permite seleccionar las mejores plantas de cada cosecha.
- Selección que consiste en modificar genéticamente a una planta en particular, para obtener plantas con características deseadas.”¹²

2.2.4.2 Recolección: El proceso de la recolección de las especies vegetales depende de las características propias de cada especie, y la recolección se realiza de forma manual o

mecanizada. “Existen ciertos factores que pueden afectar la concentración de sus principios activos tales como:

- La edad de la especie vegetal: no solo influye en la cantidad total de principio activo, sino también en la proporción de los componentes de la mezcla activa.
- La época del año: el clima y la época del año influye en la cantidad de principio activo.
- Hora del día: se ha evidenciado que existe una variación del día a la noche, en los metabolitos vegetales secundarios”.¹²

2.2.4.3 Conservación: Tal como menciona Añazco K. (2010)¹² Al ser arrancados de su medio natural, “los vegetales ven alterado su equilibrio metabólico por lo que se presentan reacciones y fenómenos de degradación. Las causas de alteración pueden ser internas y externas:

a. Causas internas

- Reacciones enzimáticas.
- Autooxidaciones.
- Reacciones entre diferentes componentes de la droga.

b. Causas externas

- Calor
- Humedad
- Radiaciones
- Microorganismos
- Insectos, etc.”

2.2.4.4 Procedimientos para eliminar el agua: Ortuño M (2006)¹⁴ El secado de las plantas es muy importante ya que inmediatamente después de ser recolectadas no pueden ser sometidas de forma inmediata a maceración o destilación, lo que el secado nos permite evitar el deterioro del material vegetal y la pérdida de aceites y propiedades farmacológicas. Se tiene las siguientes formas de secado:

1. Desección: Muñoz F (1996)¹⁵ La desecación puede realizarse de manera lenta cuando es necesario estimular la acción enzimática, o puede ser rápida cuando se quiere evitar la misma. El proceso de desecación lo podemos dividir en:

1.1 Desección natural: es un proceso lento, económico. Se pueden emplear cobertizos, bandejas, telas metálicas galvanizadas, papeles extendidos sobre un armazón de madera, etc.

1.2 Desección artificial: permite un control de la temperatura, de la humedad y del tiempo que tarda el proceso. Es generalmente el más adecuado, de corta duración, útil en donde la humedad es muy elevada. Para la desecación artificial se puede utilizar: túneles de secado, torres de secado, estufa al vacío, etc. “La desecación artificial contribuye a que las flores y hojas conserven su color y las drogas aromáticas su aroma, pero la temperatura empleada en cada caso ha de ajustarse en función de los componentes y la naturaleza física de la droga. Como regla general, las hojas, sumidades y flores deben secarse entre 20 y 40 ° C y las cortezas y raíces de 30 a 65 ° C” (Evans, 1991) “Con la desecación artificial se debe tener siempre presente determinar el punto exacto de desecación; debido a que si las drogas delicadas se desecan en exceso se tornan quebradizas, tendiendo a romperse durante el transporte.”¹⁵

1.3 Secado bajo vacío: Este secado se lleva a cabo a bajas temperaturas que oscila entre 20 a 25 °C, este secado es un proceso de laboratorio.¹⁵

1.4 Secado por rayos infrarrojos: Este tipo de secado es utilizado para legumbres y frutos deshidratados lo que no es aconsejable para plantas medicinales ya que se alterarían sus principios activos¹⁵.

Pérdida de peso en el secado:

De acuerdo a lo señalado por Muñoz F (1996), El recolector o investigador debe tener pleno conocimiento de las plantas, ya que en su estado fresco tienen un peso diferente considerable, que

varía durante el proceso de desecación y que el rendimiento de las recolecciones varía con las especies, los órganos y la época de recolección. Así tenemos:

- 1 kg de raíces se obtienen, en general, de 250 a 350g de droga sea.
- 1 kg de cortezas frescas se obtienen, en general, de 300 a 400g de droga seca.
- 1 kg de hojas frescas, se obtiene en general, de 150 a 250g de droga seca.
- 1 kg de flores frescas se obtienen de 100 a 200g de droga seca.”¹⁵

2.2.5 Actividad antimicrobiana

1. Concepto

Bajo la denominación de Villar (2010), un agente “antimicrobiano inhibe o mata la replicación de microorganismos; si lo produce otro microorganismo entonces hablamos de antibiótico. Las sulfonamidas y quinolonas por tanto no son antibióticos. Aquellos compuestos inorgánicos que matan la mayoría de micro-organismos (excluyendo las esporas) y que pueden usarse en piel se les conocen como antisépticos. Los desinfectantes son antimicrobianos muy fuertes (agentes corrosivos o cáusticos) que no se pueden usar sobre tejidos vivos y se emplean para tratar superficies y utensilios de cirugía.

- Antimicrobiano = inhibe o mata bacterias
 - Antibiótico = lo produce un microorganismo e inhibe o mata bacterias.
 - Antiséptico = antimicrobiano inorgánico que si pueden usarse en piel
- Desinfectante = antimicrobiano de uso en objetos inanimados”.¹⁶

2. Principios de terapia antimicrobiana

- Mantener concentraciones plasmáticas por “encima” de MIC durante varios días después de la remisión de síntomas. De lo contrario,

existe gran riesgo de que se creen resistencias. Cambiar terapia si no hay mejoría en 72 horas.

- La limpieza de heridas y abscesos es crítica para facilitar la acción de los antimicrobianos
- Usar agentes bactericidas si existe neutropenia
- Si no disponemos de un antibiograma, emplear el antimicrobiano de elección basado en el tipo de bacteria que normalmente causa infección en dicho órgano/tejido afectado y especie animal (ver tablas adjuntas al final*) 5) Si se han de combinar antimicrobianos, que actúen por distintos mecanismos y tengan sinergia.

3. Diferencias GRAM (+) y GRAM (-)

Villar V. establece que las “diferencias básicas entre bacterias Gram (+) y Gram (-): Por regla general y con varias excepciones importantes, las bacterias Gram negativas son más patógenas que las (+) por su estructura de membrana.”¹⁶

a. Las Gram (-): Estas “tienen lipopolisacaridos en su membrana externa que actúan como endotoxinas cuyo efecto es inespecífico activando los procesos de inflamación que en su grado extremo se manifiesta como el shock endotoxémico (también llamado séptico)”.¹⁶

b. Las Gram (+): Estas bacterias más bien “suelen producir exotoxinas, que son proteínas con un efecto mucho más específico. Por ejemplo, el Clostridium tetani produce una exotoxina que actúa a nivel del SNC provocando la parálisis de las motoneuronas. Puesto que la toxicidad de ambos grupos de bacterias es ejercida por sus toxinas, a continuación, se muestra una tabla que indica las principales diferencias entre ambas toxinas”.¹⁶

4. Según su efecto los antimicrobianos se clasifican en:

A. Bacteriostático, Villar V (2010)¹⁶ fungistático “detiene” la proliferación, pero no matan (inhibidores de la síntesis de proteínas). Limitan que se expanda la infección mientras que el sistema inmune se encarga de inmovilizar y eliminar el patógeno.

B. Bactericida, Villar V (2010)¹⁶ fungicida “matan” los microorganismos, aunque a veces solo actúan sobre los que se multiplican (β -lactámicos).

5. Concentraciones mínimas inhibitorias (MIC)

Villar V (2010)¹⁶La potencia viene dada por la concentración mínima inhibitoria (MIC-“mínimum inhibitor y concentration”) o la concentración mínima bactericida.

I. Concentración mínima inhibitoria (CMI):

Villar V (2010)¹⁶Es la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento de 10⁵ bacterias en 1 mL de medio de cultivo, tras 18-24 horas de incubación.

II. Concentración mínima bactericida (CMB):

Villar V (2010)¹⁶Es la menor concentración capaz de destruir o matar 10⁵ bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18- 24 horas de incubación.

2.2.6 *Staphylococcus aureus*

Sánchez L. (2006)¹⁷ “El *S. aureus* es un microorganismo coagulasa positivo, fermenta el manitol, desarrolla colonias color oro y es catalasa positivo. Es un miembro constante de la flora microbiana en el 10 al 20% de la población”. Las bacterias de *S. aureus* se acumulan en cavidades como fosas nasales (35%), perineo e inglés (20%), axilas (5 a 10%), ombligo y manos (13%). Se halló en personas con dermatitis atópicas que tiene estas bacterias en los espacios subungueales distales de las uñas, con una frecuencia 5 y 10 veces mayor que en los individuos normales. “Niños y adultos con dermatitis atópica tienen entre el 78 y 100% de las lesiones eccematosas colonizadas por *S. aureus*. Las infecciones suelen ocurrir a causa de las secreciones y por el arrastre de los mismos por los dedos y a través de los vestidos”. Este género de bacteria es muy agresivo, originando muchos componentes celulares y productos extracelulares que contribuyen a su patogenicidad. Siendo así los componentes celulares que conforman la estructura de la bacteriana consisten en:

- Sánchez L. (2006)¹⁷ Peptidoglicanos. Poseen importantes actividades biológicas: inducción de IL-1, atracción de polimorfonucleares, activación del complemento e inducción de anticuerpos opsonicos.

- Ácido teicoico. Juega un papel importante en la adherencia de la bacteria.
- Proteína A. Es parte de la porción externa de la capa de peptidoglicano siendo capaz de unir la fracción Fc de las IgG evitando la fagocitosis.
- Cápsula. “Algunas cepas la poseen, tendría un rol antifagocítico. Los componentes extracelulares (factores de virulencia no estructurales) se refieren a enzimas y toxinas producidas por la bacteria”.

A. Enzimas:

1. **Catalasa:** Sánchez L. (2006)¹⁷ Previene la acción de los radicales tóxicos al degradar el peróxido de hidrógeno provocado durante la fagocitosis.
2. **Coagulasa:** Sánchez L. (2006)¹⁷ “Convierte el fibrinógeno en fibrina al unirse a la protrombina, favoreciendo la formación de coágulos, durante la infección, al interior de este coágulo quedan atrapadas células fagocíticas, detritus celular y bacterias, originando abscesos”.
3. **Otras:** Hialuronidasa, lipasa y ADNasa.

B. Toxinas:

1. Leucocidinas: Sanchez L. (2006)¹⁷ Provoca degranulación y destrucción de los granulocitos.
2. Exfoliatina: Sanchez L. (2006)¹⁷ Toxina que causa la descamación de la piel y forma ampollas intra epidérmicas en la piel.
3. Sánchez L. (2006)¹⁷ Toxina 1 del síndrome de shock tóxico (TSST-1): “Está codificada a nivel cromosomal y pertenece a la familia de los súper antígenos”. Ejecutan su efecto formando un puente o unión inespecífica entre las moléculas MHC II de las células presentadores de antígeno y los receptores de las células T. Esto provoca la activación gran cantidad de linfocito T, liberándose una cantidad excesiva de citoquinas.

Gil M. (2000), refiere que la “especie de bacteria ***Staphylococcus aureuses*** un agente etiológico de numerosas enfermedades, incluyendo infecciones de piel y tejidos blandos, bacteremia, endocarditis, infección del SNC y del tracto genitourinario, etc. Por su ubicuidad y en función de los

procedimientos médicos y uso de antimicrobianos, se otorga especial énfasis al aislamiento y estudio epidemiológico de *S. aureus*, considerando su rol primordial en las infecciones nosocomiales”.¹⁸

2.2.7 Patogenia microbiana

Soriano E (2006)¹⁹ La capacidad que tiene un microorganismo para producir una enfermedad depende del grado de patogenicidad y ésta, a su vez, depende de la facilidad y medio con que consigue hallar un huésped sensible, obtener acceso a un tejido diana adecuado y sobresalieron los mecanismos de defensa del huésped. “La capacidad de un microorganismo para producir efectos nocivos en un huésped se denomina virulencia. La patogenia de los microbios depende de múltiples factores, que pueden resultar modificados por influencias genéticas y medioambientales”. En las bacterias idóneas para producir infección de las heridas, ciertas características estructurales, de producción de enzimas y de productos metabólicos aportan tanto a la virulencia como a la patogenia. Las cápsulas (p. ej., *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*) protegen a las bacterias frente a la destrucción mediada por los fagocitos o por la activación del complemento. “La presencia de finos apéndices superficiales (pili) que se proyectan en muchas bacterias (p. ej., *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*) favorece su adherencia a las células del huésped y éste es, en muchos casos, el primer paso del proceso de la infección”. Los polisacáridos que conforman algunas paredes bacterianas (p. ej., *Staphylococcus* y *Streptococcus*) provocan su fácil adhesión a los componentes de la matriz extracelular del tejido objetivo, como son la fibronectina y el colágeno.

Hay mayor posibilidad en las heridas, la infección extracelular es más frecuente que la intracelular ya que muchos patógenos dependen de la producción de enzimas extracelulares para invadir los tejidos profundos del huésped.

“La lesión del huésped también puede estar causada por la producción de toxinas microbianas”, Producirán exotoxinas las bacterias que son viables, mientras que los componentes fundamentales de la pared celular están formados por las endotoxinas que se liberan con la muerte y por efecto la

destrucción de la célula microbiana. Los efectos dependen de las concentraciones de las toxinas que a su vez son sistémicos o también locales, siendo la más tóxica las exotoxinas a comparación que las endotoxinas y dañando células diana específicas.

Soriano E (2006)¹⁹ Los microorganismos son capaces de detectar y responder al entorno con rapidez. “De igual modo, pueden combatir los intentos planteados por las defensas del huésped durante la infección a través de la regulación de la expresión de genes que codifican los determinantes de la virulencia”. La densidad de la población de estos microorganismos depende de algunos mecanismos de adaptación por el cual cuando esta población es poca, los genes que se encargan de codificar la virulencia no se expresan, cuando el número es mayor en este caso si lo hacen, por consiguiente, mayor virulencia del germen. Conociéndose como autoinducción a este fenómeno.

La dinámica de estas interacciones “no se conoce aún por ahora muy bien. Una complicación adicional es la posibilidad de que las comunidades polimicrobianas residentes en las heridas formen biofilms. Esto se ha demostrado en modelos de heridas animales. Como las biofilms se habían asociado ya a la persistencia de las heridas humanas, su presencia en las lesiones crónicas podría asociarse a una mala cicatrización”.¹⁹

2.2.8 Tipos de infecciones cutáneas

A. Impétigo:

Saavedra J. (2008)²⁰ Es una infección de la capa superficial de la piel (epidermis), y es la infección cutánea más frecuente en los niños. Su incidencia demanda más entre la edad de 2-5 años. Este tipo de infección se relaciona a la escasa higiene y hacinamiento, y se contagia con gran facilidad, por lo que el lavado de manos y otras medidas de prevención son muy importantes para evitar el contagio y brotes.

B. Síndrome de la piel escaldada estafilocócica:

Ruvertoni M. (1995)²¹“Forma sistémica de impétigo ampolloso provocado por la dispersión sistémica de las toxinas exfoliativas A y B de *S. aureus*”.

El índice de mortalidad del cuadro en niños es bajo (< 5%), por lo que en adultos es hasta un 60%. La mayoría de los casos se producen en niños menores de 5 años por no bajo desarrollo de anticuerpos protectores que nos defienden frente a las toxinas estafilocócicas y tener un aclaramiento renal menos efectivo. La bacteria se localiza en mucosas como conjuntival, nasal y oral produciendo toxinas que pasan al torrente sanguíneo, originando descamación cutánea a distancia de la lesión inicial. Incluye un amplio espectro de lesiones ampollasas dérmicas, de extensión variable, desde lesiones en la misma área de la lesión hasta afectación de toda la superficie de la piel.

Las zonas más frecuentemente afectadas son cara, axilas e inglés, en el periodo neonatal afectado con mayor frecuencia en el periné y región periumbilical. Comienza con conjuntivitis y edema facial, con descamación periorificial, posteriormente apareciendo fiebre y lesiones ampollasas, dejando una gran zona de piel desnuda, dolorosa al romperse (signo de Nikolski positivo), con la piel descamada posteriormente. El diagnóstico es clínico, aunque puede aislarse la bacteria *S. aureus* del cultivo nasal, también faríngeo o conjuntival pero no en lesiones. En caso de que haya dudas diagnósticas se puede realizar un examen de biopsia de la superficie cutánea.

Dentro de la determinada enfermedad diagnosticada cabe destacar “impétigo bulloso, varicela, herpes zoster, enfermedades ampollasas autoinmunes, necrosis epidérmica tóxica, síndrome de Stevens-Johnson, quemaduras, y escarlatina”. El tratamiento debe llevarse a cabo con un antibiótico anti-estafilocócico. En caso de mala evolución o sospecha de resistencia del stahylococcus se debe considerar vancomicina. Es importante el control hidroelectrolítico y del dolor. Existen complicaciones como son la deshidratación, hipotermia e infecciones cutáneas secundarias.

C. Folliculitis:

Esta es un tipo de infección superficial “del folículo pilosebáceo, que se encuentra ubicadas principalmente en el cuero cabelludo, nalgas o extremidades, producido generalmente por *S. aureus*. Al inicio es una

pápula eritematosa que va desarrollarse hasta una pústula centrada por un pelo. Algunos factores que predisponen son la falta o poca higiene, humedad, oclusión o uso prolongado de antibióticos como en el caso del acné. En ocasiones puede estar producido por Candida, Malassezia o P. aeruginosa. El tratamiento es similar al impétigo. Puede haber resolución espontánea tras resolverse los factores que predisponen”.²⁰

D. Hidrosadenitis:

Ha decir de Saavedra J. (2008) La Hidrosadenitis es una “inflamación crónica y supurativa de las glándulas apocrinas, que se localiza por lo general en la región de axila y región ano-genital. Suele producirse siempre con mayor frecuencia en la adolescencia o juventud, y evolucionar de forma crónica, con recaídas y remisiones parciales durante varios años. Empieza con nódulos solitarios o múltiples, suelen ser dolorosos y eritematosos, son abscesos profundos de las zonas afectas”.²⁰

“Parece que existe una base dependiente de la secreción de andrógenos, lo que podría favorecer la oclusión de la glándula apocrina, y la sobreinfección bacteriana posterior, especialmente por S. aureus, estreptococos, E. coli o anaerobios”. Esta forma de presentarse la enfermedad puede confundirse con muchas otras patologías, especialmente en estadios iniciales, como forúnculos, actinomicosis, enfermedad por arañazo de gato, granuloma inguinal o linfogranuloma venéreo. En la zona anogenital podría confundirse con la enfermedad de Crohn.

El tratamiento es en medida debe ser muy estricta, con antibióticos sistémicos, corticoides intralesionales y/o sistémicos para evitar fibrosis y cicatrices y medidas de higiene. Por lo que su patogenia parece similar a la del acné, el tratamiento con retinoides sistémicos podría ser de utilidad. Se han realizado tratamientos con inhibidores de TNF. En últimos casos podría ser necesario un tratamiento quirúrgico para el óptimo control de las lesiones o curación.²⁰

E. Paroniquia:

Esta denominación corresponde a una infección de la “zona del pliegue cutáneo ungueal secundario a una lesión por succión, mordeduras de la uñas o pliegues cutáneos, o poca higiene. Las zonas de los pliegues laterales se encuentran calientes, eritematosos, y dolorosos, donde se ve la aparición de sustancia supurativa. En la mayoría de los casos existe una flora mixta orofaríngea. Si la zona de afectación es superficial, el drenaje quirúrgico local y antisépticos o antibióticos tópicos en el tratamiento son suficientes. En una afectación profunda el tratamiento sería necesariamente con antibióticos sistémicos. En caso de afectación profunda puede ser necesario el tratamiento antibiótico sistémico. Las paroniquias bacterianas deben diferenciarse de las producidas por *Cándida* o herpes simple. Y la diferenciación debe tenerse en cuenta por las producidas por *cándida* o herpes simple”.²⁰

F. Celulitis:

Esta inflamación de la piel corresponde, cuando es afectada o se detecta la presencia de inflamación en una zona de la piel, en particular de la dermis y tejido celular subcutáneo al cual se reconoce por el edema, eritema y dolor de la zona afectada. Los bordes laterales suelen ser poco diferenciados dada la profundidad de la zona de infección. Los microorganismos que más se implican son *S. pyogenes* y *S. aureus*, aunque en algunas circunstancias neumococo, *Salmonella* o enterobacterias también pueden también producir la infección. La celulitis originada en el pie tras punción a través del zapato se origina principalmente por *P. aeruginosa*”.²⁰

“En caso de mordedura, *Pasteurella* anaerobios podrían estar implicados, y si la celulitis se relaciona con inmersión en agua, *Aeromonas* (agua dulce) o *Vibrio* (agua salada) podrían ser agentes responsables”, en este caso habría que trabajar con un aminoglucósido o quinolona al tratamiento antibiótico habitual. “La celulitis puede producirse por contigüidad por otro tipo de infección, como impétigo, o como consecuencia de una bacteriemia”. A demás puede producir complicaciones como artritis, osteomielitis, tromboflebitis, bacteriemia o

fascitis necrotizante. “El diagnóstico etiológico puede conseguirse en un 25% de los casos con hemocultivo (5%) o cultivo de aspirado de la zona de máxima inflamación”.

G. Forúnculo:

Los forúnculos acorde con la propuesta de Ruvertoni M.; son un “proceso inflamatorio más profundo que la foliculitis, puede haber protuberancias dolorosas con compromiso de la grasa subcutánea asociada a la glándula sebácea. Habitualmente afecta a un solo folículo, aunque pueden estar comprometidos muchos a la vez. Se manifiesta como un abultamiento rojo que luego se hace fluctuante y purulento. En muchas ocasiones puede abrirse al exterior a través del folículo afectado. En las zonas húmedas suelen ser más frecuentes, se tornan calientes y expuestas a roce frecuente, como en las zonas de cuello, cara, axilas, pliegues inguinales y nalgas”.²¹

Los factores que predisponen el desarrollo de forúnculos destacan: “estado de portador nasal de cepas de *S. aureus*, obesidad, tratamiento prolongado con corticoides, defectos en la serie blanca (neutrófilos), estrés y probablemente diabetes mellitus”. Como consecuencia de la manipulación incorrecta de la lesión puede haber diseminación hematológica conocida como bacteriemia. Se debe tener especial cuidado con los forúnculos próximos a la nariz y labio superior, por la posibilidad de que haya diseminación hemática al seno cavernoso a través de las venas emisarias facial y angular.

H. Linfangitis:

Ruvertoni M. (1995)²¹ Inflamación que se haya en los vasos linfáticos subcutáneos, especialmente de las extremidades, “y puede estar en relación con una infección aguda bacteriana, o con un proceso más crónico secundario a *Nocardia*, hongos (*Sporothrix*), *Mycobacteria* o parásitos”. La bacteria *S. pyogenes* es la más frecuente hallada, y con menor frecuencia la bacteria de *S. aureus*, *Pasteurella* en la mordedura de perro o gato o *Spirillum* en la mordedura de rata. En el hemocultivo que se lleva a cabo puede resultar positivo. La linfangitis aguda bacteriana puede

ser una complicación de otra infección cutánea como la celulitis o iniciarse también a partir de solución de continuidad de la piel, con frecuencia inaparente. “Se caracteriza por un cordón lineal doloroso, caliente y eritematoso, que va desde la puerta de entrada hasta los ganglios linfáticos regionales, que suelen también estar inflamadas”. El tratamiento va consistir primordialmente en primera medida la penicilina, ya que presenta buena cobertura para las bacterias más frecuentemente implicadas, excepto *S. aureus* y que se debe considerar otros antibióticos si existe sospecha de esta bacteria.

III. Facitis Necrotizante:

En este caso señalando la referencia que propone Ruvertoni M. la Facitis Necrotizantees una “infección aguda y que se extiende rápidamente por el tejido subcutáneo, con un elevado riesgo de morbimortalidad ya que provoca una necrosis. Puede afectar la fascia superficial y a veces la profunda. Las partes más afectadas del cuerpo son las extremidades y está favorecida por cualquier lesión cutánea previa, siendo de especial relevancia la infección por el virus de la varicela”.²¹

El cuadro comienza con un traumatismo local como lo es el edema difuso, eritema, laceración, quemaduras, calor y dolor. Tiene un progreso rápido de 48 horas y la zona adquiere una coloración gris-azuladas con formación de ampollas amarillentas. Sin un tratamiento se desarrollan bullas, necrosis muscular y el proceso se extiende a lo largo de la fascia. “Por último, aparece necrosis extensa del tejido celular subcutáneo. Asocia alteración del estado general, fiebre elevada, afectación multiorgánica y shock séptico”. El diagnóstico es fundamentalmente con pruebas de laboratorio que revelaran al microorganismo, se asocia también la exploración quirúrgica para desbridamiento, estudio de extensión y recogida de muestras para gram y cultivo. Se puede apoyar en estudios de ecografía, TC o resonancia magnética (RM).

J. Miositis:

La miositis corresponde a una “inflamación del tejido muscular esquelético. Se clasifica como miositis aguda transitoria, miositis crónica y piomiositis. La primeramiositis aguda es la producida por el virus influenza, para influenza, enterovirus, herpes simple, rotavirus y *Mycoplasma*”. La pleurodinia es una entidad clínica que se produce al inflamarse los músculos del tórax y del abdomen en su parte superior, y está originada por virus de la familia Coxakie B. Todas estas miositis afectan de forma transitoria y por lo tanto el tratamiento es atacar solo los síntomas, consistiendo en antiinflamatorios, reposo y mucha hidratación. La miositis crónica se presenta en que los músculos se inflaman durante un periodo de tiempo largo debido a una infección parasitaria bacteriana o viral como la infección por *Trichinellaspiralis*, *Taeniasolium*, *Toxoplasma gondii*, *Borrelia burgdorferi* o VIH. Debe hacerse la identificación que diagnostique las etiologías autoinmunes como en el caso de la dermatomiositis juvenil.

K. Piomiositis:

Saavedra J. (2008)²⁰ “En un 95% la etiología de la infección bacteriana es rara y afecta al musculo por la bacteria de *S. aureus*. También puede producirse por estreptococos y BGN como *Serratia*, *Klebsiella*, *Yersinia*, *Salmonella* y *Pasteurella*. Los músculos más afectados con frecuencia son los músculos largos del tronco y los miembros. Existe una entidad clínica conocida como miositis tropical originada por *S. aureus* y en la que se afectan los músculos del hombro”. Algunas veces se presenta abscesos de forma concomitante. En un inicio el cuadro tiene baja expresión clínica, pudiéndose ver sólo dolor sin signos inflamatorios, posteriormente apareciendo progresivamente signos de inflamación. La prueba diagnóstica más sensible en los primeros estadios es la RM. “Puede producirse afectación a distancia con manifestaciones como empiema, pericarditis y abscesos pulmonares. Algunos parámetros de laboratorio como leucocitosis en sangre periférica y aumento de

reactantes de fase aguda (PCR y VSG) pueden ser útiles en el diagnóstico”.

Saavedra J. (2008)²⁰ “La piomiositis del psoas también es una entidad clínica característica de la infancia-adolescencia. El dolor abdominal o de espalda son síntomas característicos, que se irradia al hombro. La miositis por *S. pyogenes* también se observa con mayor frecuencia en la actualidad debido al carácter de invasividad del microorganismo”. Se ha relacionado con el antecedente de varicela y puede progresar a un cuadro de shock tóxico. El tratamiento de la piomiositis consiste en antibioterapia empírica con penicilina anti estafilocócica, y en caso de haber absceso, drenaje. La piomiositis por *S. pyogenes* suele necesitar drenaje quirúrgico o aseo quirúrgico acompañado al tratamiento antibacteriano que consiste en un betalactámico y clindamicina.

L. Ectima:

La ectima corresponde a una “infección bacteriana que tiene forma de ampolla de la piel similar al impétigo, pero más profundamente invasivo que éste, caracterizado clínicamente por una vesícula o pústula que evoluciona hacia la formación de una úlcera de bordes como de una costra amarillenta, de curso crónico y que cura en forma lenta”.²⁰

El que da origen a la lesión suele ser el estreptococo beta hemolítico grupo A, es frecuente encontrar colonización mixta con el *S. aureus*, siendo difícil determinar si se trata de una infección sinérgica o el estafilococo simplemente coloniza mucho después la lesión.

M. Erisipela:

De lo indicado por Saavedra J. (2008)²⁰ “La erisipela es una infección bacteriana infecciosa aguda de la capa externa de la piel y parte superior del tejido celular subcutáneo, se caracteriza por placas eritematosas y edematosas bien delimitadas, acompañadas de malestares generales. El responsable de la infección es el estreptococo beta-hemolítico del grupo A, algunas veces es ocasionada por el *S. aureus*, y menos frecuentemente por estreptococos de los grupos B, C y G”.

N. Dactilitis Ampollosa:

En la designación de Healy B. (2006), “es la infección superficial de un dedo, caracteriza-da clínicamente por una ampolla sobre una base eritematosa. Es causada casi siempre por el estreptococo beta-hemolítico y, algunas veces, por el *S. aureus* o estreptococos del grupo B. La dactilitis ampollosa es más frecuente en los niños en edad escolar, y ocasionalmente adultos. Las lesiones se localizan en la cara palmar de las manos y los pies”.

Las lesiones pueden alcanzar los 2cm sobre una base eritematosa. Suelen romperse fácilmente con mínimos golpes, por lo que en muchas ocasiones sólo se observa una superficie erosionada.

2.2.8.1 Diagnóstico de infecciones cutáneas

Healy B. (2006)²² El diagnóstico en su mayoría de las infecciones cutáneas es clínico o microbiológico, dado que muchas de estas infecciones presentan características subjetivas. En ocasiones, por mala respuesta al tratamiento empírico o recidiva, “bien por la necesidad de un diagnóstico preciso ante cuadros potencialmente graves (síndrome de Stevens-Johnson o ectima gangrenosa en pacientes neutropénicos), pueden ser necesarios estudios microbiológicos (tinción, cultivo y estudio de sensibilidad) o histológicos”. Es de importancia ver la profundidad de las lesiones, si se presenta necrosis asociada, signos de afectación sistémica y la presencia de factores de riesgo de mal mejoramiento. En aquellos pacientes que presenten síntomas de afectación sistémica se debe realizar hemocultivo, hemograma, y determinar equilibrio ácido base, proteína C reactiva, creatinina y creatinina-fosfoquinasa.

Principalmente el diagnóstico de infección de una herida se basa solo mayormente en criterios clínicos. Se valora la evaluación de los tejidos que rodean la herida y de la propia herida en busca de signos y síntomas de infección, también factores que probablemente aumenten el riesgo y la gravedad de la infección que se presente. “La incorporación de la evaluación de una posible infección al cuidado

habitual de las heridas facilitará la detección precoz y el consiguiente tratamiento”.

2.2.8.2 Signos y Síntomas de infecciones cutáneas

- **Eritema:** Pommier L. (2002)²³ Hay presencia de un enrojecimiento de la piel, con presencia de exudación o simplemente congestivo.
- **Ulceración:** Blanco JL. (2003)²⁴ “Es una lesión de la piel, producida por un proceso de isquemia, que puede afectar y necrosar aquellas zonas de la epidermis, dermis, tejido subcutáneo y músculo donde se asientan, también pudiendo afectar hasta las articulaciones y huesos”.
- **Edema:** Flores V. (2014)²⁵ Hinchazón por el aumento de volumen del líquido en el intersticio que se caracteriza al oscultamiento de un hoyuelo al ejercer presión sobre la piel. “En una persona de tamaño promedio el exceso de líquidos aproximado requerido para que el edema se haga aparente es de 2.3 a 4.5 kg o cuando el líquido intersticial representa más de 10% del peso corporal”.
- **Sensibilidad de la zona:** López A. (2015)²⁶ “Es el proceso del dolor se inicia con la activación y sensibilización periférica donde tiene lugar la transducción por la cual un estímulo nociceptivo se transforma en impulso eléctrico”. La fibra nerviosa estimulada involucra reflejos a un impulso nervioso denominado potencial de acción conectada hasta la segunda neurona que se encuentra en la asta dorsal de la médula.
- **Equimosis:** Jiménez J. (2016)²⁷ Es una lesión subcutánea caracterizada por definición, una equimosis mide un promedio

de 1 y 2 centímetros de largo presentes mayormente por agresión física provocando la ruptura de vasos sanguíneos conduciendo la salida de sangre al tejido subcutáneo provocando la inflamación.

- **Fiebre:** En lo mencionado por Alpizar L. (1998), “Se señala la importancia del hipotálamo en el control de la temperatura corporal y las diversas formas de medir la fiebre, para lo cual se usan valores normativos o referenciales para nuestro medio”.²⁸

2.2.9 Romero (*Rosmarinus officinalis.L*)

Purca TP. (2013)⁵ El Romero (*R. officinalis. L*) Es una planta que procede del griego “rhops y myrinos” que significa “arbusto marino” ya que tiene su desarrollo muy cerca de las costas. Es una planta mediterránea el epíteto “*R. officinalis. L*” tiene una variedad de usos y existen muchas especies que se usan en las oficinas farmacéuticas y también a aquellas plantas que son consideradas terapéuticas o medicinales.

Purca T. (2013)⁵ El Romero desde épocas del antiguo Egipto ya se conocía este arbusto o planta, según la historia faraones egipcios utilizaban para sepultar a sus difuntos en sus tumbas pequeños ramos de romero para perfumar el viaje hacia dónde van los muertos. Mucho después sus usos medicinales ya fueron reconocidos por Dioscórides en los capítulos 81, 82 y 83 del Libro III, en el que habla del libanotis coronaria: el Romero. Por primera vez en el año 1330 por Ramón Llull su aceite esencial fue adquirido y desde en ese momento, se da ese uso en la perfumería. En el siglo XVI la reina Isabel utilizó el aceite de Romero para tratar el reumatismo que adolecía en ese momento convirtiéndose en «el agua de la reina de Hungría», en uno de los remedios más famosos de la corte de Luis XIV. “Los boticarios utilizaban el romero en gran número de preparados, pero en la actualidad sólo el aceite esencial está incluido en las farmacopeas”.

2.2.9.1 Taxonomía

Nombre científico: *Rosmarinus officinalis.L.*

Reino: PLANTAE

División: MAGNOLIOPHYTA

Clase: MAGNOLIOPSIDA

Orden: LAMIALES

Familia: LAMIACEAE

Género: Rosmarinus

Especie: ***Rosmarinus officinalis.L.***

Nombre común: (Romero).

2.2.9.2 Descripción botánica

Purca T. (2013)⁵; San Román I. (2013)⁶ “El Romero es un arbusto leñoso de hojas perennes con muchas ramificaciones, puede medir 2 metros de altura. Se haya de color verde todo el año, con tallos jóvenes borrosos y tallos añosos de color rojizo con la corteza resquebrajada”.

Purca T. (2013)⁵ “Las hojas son como alargadas, pequeñas y muy abundantes, de forma linear. Son opuestas, sésiles, con los bordes hacia abajo y de un color verde oscuro, mientras el envés presenta un color blanquecino y están cubiertas de vello. En la zona de unión de la hoja con el tallo nacen los ramilletes floríferos”.

Purca T. (2013)⁵, Castaño H. (2010)²⁹ Las flores se hayan de unos 5 mm de largo. “Tienen la corola bilabiada de una sola pieza. El color es azul violeta pálido, rosa o blanco, con cáliz verde o algo rojizo, también bilabiado y acampanado”. Suelen ser flores axilares aromáticas a simple contacto o acercamiento y contienen miel el cual se localizan en la cima de las ramas, tienen dos estambres encorvados soldados a la corola y con un pequeño diente. Florece empezando la primavera, aunque pueden encontrarse flores durante todo el año que continua. “El fruto, encerrado en el fondo del cáliz, está formado por cuatro pequeñas nuececitas trasovadas, en tetraqueno, de color parduzco”.

2.2.9.3 Distribución geográfica

Purca T. (2013)⁵ La planta de Romero, es una planta que se desarrolla en cualquier parte del mundo y se distribuye desde la región mediterránea, sur de Europa, norte de África. Incluso se haya también en Asia Menor y Sudamérica. En España se halla en la mayor parte de Cataluña, en el Perú se encuentra esta planta tanto en la costa como en la sierra y selva.

2.2.9.4 Hábitat

Purca T. (2013)⁵ Este arbusto se desarrolla en variedades de climas como tropicales, subtropicales, húmedos, y en suelos áridos, secos, ligeros, algo arenosos, muy permeables, bien drenados, calcáreos o pobres, pero lo que se observa es que no está adaptada a las tierras arcillosas compactas. En el Perú crece en la costa, sierra y selva hasta los 3,500 msnm, que hace parte del arbusto del bosque sin problema alguno.

2.2.9.5 Composición química

Coy C. (2013)³⁰ En la planta del Romero se han encontrado muchos compuestos químicos a los que los autores las han agrupados de manera general, en ácidos fenólicos, flavonoides, aceite esencial, ácidos triterpénicos y alcoholes triterpénicos. De manera general, la composición química del aceite esencial de Romero ha sido descrita en trabajos que indican el tipo de moléculas activas presentes. Se ha identificado la presencia de α -pineno, β -pineno, canfeno, ésteres terpénicos como el 1,8-cineol, alcanfor, linalol, verbinol, terpineol, carnosol, rosmanol, isorosmanol, 3-octanona, isobanil-acetato y β -cariofileno; los ácidos vanílico, caféico, clorogénico, rosmarínico, carnósico, ursólico, oleanólico, butilínico, betulínico, betulina, α -amirina, β -amirina, borneol, y acetato de bornilo.

En el caso de las hojas del romero prevalece un alto contenido de ácido rosmarínico y su derivado rosmaricina, también está presente el ácido carnósico que se caracteriza por ser inestable, su degradación se da por incremento de la temperatura y exposición a la luz; en

presencia de oxígeno puede oxidarse para formar carnosol, rosmanol, epirosmanol y 7- metil-epirosmanol.

Dentro de los compuestos activos con efecto antibacteriano útil, se mencionan los siguientes compuestos:

- **Terpenoides.** Llamados “isoprenoides que forman parte de aceites vegetales de algunas plantas. En la que se hallan diterpenos (picrosalvina, carnosol, isorosmanol, rosmadial, rosmaridifenol, rosmariquinona), Triterpenos (ácidos oleanólico y ursólico, y sus 3-acetil-ésteres). Son metabolitos que tienen elementos adicionales, como oxígeno; se especula que produce ruptura de la membrana celular por los compuestos lipofílicos.”³⁰
- **Fenólicos y Polifenoles.** Estas “Son sustancias que en su compuesto tienen el anillo fenol. En la que se encuentran (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 tienen que ver con la toxicidad contra los microorganismos, virus, bacterias y hongos; se cree que tiene una inhibición enzimática o una interacción no específica con las proteínas, Coy C (2013)”³⁰
- **Flavonas, Flavonoides y Flavonol.** Coy C. (2013)³⁰ Son pigmentos de la planta que hacen que los insectos se sientan atraídos. (Cirsimarina, diosmina, hesperidina, homoplantiginina, fegopolina, nepetina y nepitrina), “son sintetizadas estas sustancias por las plantas en respuesta a infecciones bacterianas, 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”.³⁰
- **Alcaloides.** Coy C (2013)³⁰ “Están dentro de un grupo heterogéneo de bases nitrogenadas, tiene efecto antimicrobiano, viral: se le da la capacidad de intercalarse con el DNA”.
- **Taninos.** Son compuestos polifenólicos, cuya acción es como antibacteriana, inhibidora de enzimas, tienen la capacidad de inactivar adhesinas microbianas, enzimas, proteínas

transportadoras en la célula y formar complejos con la pared celular.”³⁰

2.2.9.6 Usos y aplicaciones

El Romero es muy utilizado sobre todo en común las hojas y a veces, las flores. “Con el aceite esencial que se extrae directamente de las hojas, se prepara alcohol de Romero, que se utiliza para prevenir las úlceras”. También se ve empleada para tratar dolores de tipo reumáticos y lumbalgias. La infusión de hojas de Romero utilizada para el alivio de la tos y también es usada para el hígado y para mejorar los espasmos y cólicos intestinales. Se toma antes o después de las comidas.³¹

El efecto que tiene el humo de Romero sirve como tratamiento para el asma, el alcanfor de Romero tiene efecto hipertensor y tonifica la circulación sanguínea. “También tiene propiedades antisépticas, su forma de aplicación es por decocción colocándose encima de las llagas y heridas como efecto cicatrizante. También tiene el efecto de regular ligeramente la menstruación. “De sus hojas se obtiene el "agua de la reina de Hungría", para perfumería y también un agua destilada que se utiliza como colirio, la esencia puede usarse para combatir dolores reumáticos”.Avila R. (2011)³¹

Avila R. (2011)³¹ El Romero se usa también en el arte culinario como condimento y para aromatizar muchas variedades de bebidas. Del Romero también se extrae el aceite de Romero, muy empleada en perfumería para lociones capilares, “en la fabricación de jabón y como ingrediente de algunas aguas de colonia. Medicinalmente, la infusión de romero, presenta propiedades antiespasmódicas, estimulantes y diuréticas”. Al ser mezclado con alcohol de 95° se produce una loción agradable y se usa frotando las partes doloridas e inflamadas.

2.2.9.7 Capacidad antioxidante del Romero

Avila R. (2011)³¹, Se han demostrado en diversos estudios la eficacia de estas plantas derivando de aquí diferentes aplicaciones comerciales (Bracco et al. 1981, Zheng M & Wang 2001, Stefanovitis

2003, Stojanovic&Nesic 2010). Los compuestos activos de lasalvia y el Romero que presentaron mayor actividad antioxidante son los ácidos fenólicos, flavonoides, pigmentos naturales (capsaicina y curcumina) y terpenos “(rosmanol, ácido carnósico, carnosol, epirosmanol e isorosmanol)”.

Aruoma et al. (1996)³², Se ha observado que la actividad antioxidante de los extractos de romero se debe particularmente a los ácidos caféico y rosmarínico, estos últimos poseen una doble función: “como antioxidante y estimulante de la producción de prostaglandina E2 e inhibidor de la producción de leucotrienos B4 en leucocitos polimorfonucleares en el humano”.

López M. (2008)³³ Los investigadores confirmaron la eficacia antioxidante del Romero en extracto metanólico en manteca de cerdo almacenada en la oscuridad durante 6, 14, 21, 28 y 36 días a través de la determinación de peróxidos, mientras que Mierlici (2009) demostró la presencia de polifenoles y flavonas, sustancias con propiedades antioxidantes, en extractos hidroalcohólicos obtenidos del romero.

López M. (2008)³³En la búsqueda de la capacidad antioxidante en otras investigaciones se basa principalmente en la extracción de polifenoles y flavonoides, los polifenoles son metabolitos secundarios generalmente extraídos de plantas y los flavonoides poseen 13 subclases con un total de más de 4000 compuestos.

López M. (2008)³³El estudio determina que los antioxidantes se clasifican así mismo en primarios que son aquellos que reaccionan con especies reactivas de oxígeno (ERO), mientras los antioxidantes secundarios actúan bajo numerosos mecanismos reduciendo la oxidación de los lípidos por varias acciones, pero sin estabilizar a las ERO. Para ello realizó un estudio donde cuyo objetivo fue realizar la extracción etanólica de compuestos polifenólicos de Romero y chile ancho para evaluar la actividad antioxidante comparándolos con antioxidantes sintéticos (BHA Y BHT), obteniendo finalmente como resultados el más alto valor de polifenoles en el extracto etanólico del romero en proporciones 50:50, 75:25 y 100:0, concluyendo que la

actividad antioxidante del romero es equivalente al antioxidante más utilizado en la industrias de alimentos que es el BHA por lo que se puede utilizar el extracto de romero como antioxidante natural en la industria de alimentos.

2.2.9.8 Efectos secundarios y contraindicaciones

Almela L. (2006)³⁴; Moreno S.et al (2006)³⁵ Estos autores han considerado que el principio activo del Romero no es toxica; sin embargo, existen personas que pueden experimentar reacciones alérgicas ya que pueden ser alérgicas al contacto como se ha reportado una pequeña cantidad que exponiéndose al Romero se notó dermatitis. “Un hombre de 56 años reaccionó al carnool, el principal constituyente del Rosmanox, el cual se prepara con hojas de romero (*Rosmarinus officinalis*)”, asimismo, no es recomendable que las personas que padecen con cálculos biliares recurran a esta droga sin consultar antes con un médico. Esto es debido a que cuando existe litiasis biliar, un aumento del drenaje de la vesícula biliar puede ir acompañado de una obstrucción de los conductos biliares.

El Romero, tiene la posibilidad de presentar intoxicaciones por el consumo de infusiones de Romero es muy baja, de forma que a una sobredosis conllevaría a un cuadro de espasmo abdominal, vómitos, gastroenteritis, hemorragia uterina e irritación renal.

Almela L. (2006)³⁴; Moreno S.et al (2006)³⁵ “En cuanto al uso del aceite esencial, en concentraciones elevadas puede ser tóxico para el sistema nervioso central y provocar convulsiones”. Por el cual, no se recomienda el uso durante períodos de tiempos largos o a dosis mayores a las recomendadas y se debe tener mucho cuidado el uso en niños. Por la aplicación tópica, la esencia de Romero puede causar dermatitis y eritema en personas hipersensibles.

El Romero no debe usarse en la etapa de gestación ya que, ya que existe la posibilidad de que induzca a un aborto espontáneo por su posible efecto estrogénico por lo que no tiene una base científica demostrada hasta el momento no se considera seguro en casos de gestantes, por lo que tampoco debe emplearse durante la lactancia.

2.3 Formulación de la Hipótesis

2.3.1 Hipótesis general

La aplicación del extracto etanólico de tallos de Romero (*Rosmarinus officinalis.L*), afecta significativamente en la reducción bacteriana en cultivos de *Staphylococcus aureus*.

2.3.2 Hipótesis específicas

1. Existen algunos tipos de metabolitos secundarios en mayor cantidad en el extracto etanólico de tallos de Romero (*Rosmarinus officinalis.L*).
2. La aplicación de las concentraciones del extracto etanólico de tallos de romero afecta significativamente en la reducción bacteriana en cultivos de *Staphylococcus aureus*.

2.4 Variables

2.4.1 Tabla de operacionalización de variables

Variable	Dimensión	Indicador	Escala
Variable Independiente compuestos del extracto de Romero	Fitoquímico	<ul style="list-style-type: none">• Concentración del extracto de Romero• Identificación de compuestos químicos	25% 50% 75%
Variable Dependiente reducción bacteriana	Microbiológica	<ul style="list-style-type: none">• Diámetro de halo de inhibición	Milímetros de diámetro

2.5 Marco Conceptual

1. **Actividad antibacterial:** Habilidad específica o capacidad de un producto de lograr su efecto deseado sobre determinados microorganismos.³⁵

2. **Antibiograma:** Sussmann O. (2002)³⁶ Son reportes de test de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos.
3. **Antimicrobiano:** Seija V. (2002)³⁷ “Es una molécula natural (producida por un organismo vivo, hongo o bacteria), sintética o semisintética, capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias, virus u hongos”.
4. **Cepas ATCC:** “ Es un material biológico de referencia certificado por American Type Culture Collection. Rockville, EU”.³⁸
5. **Cultivo microbiológico:** Consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada los microorganismos”.³⁹
6. **Extracto etanólico:** Gonzales A. (2004)⁴⁰ Extracto con olor característico, obtenido por maceración en contacto con etanol.
7. **Flora bacteriana:** Cisterna R. (2007)⁴¹ Agrupación de microorganismos que se encuentran localizados en contacto con el exterior.
8. **Halo de inhibición:** Zona alrededor de un disco que contiene el extracto antibiótico colocado en un antibiograma en el cual no se produce el crecimiento antibacteriano”.³⁵
9. **Infección:** Cisterna R. (2007)⁴¹ Es un proceso de multiplicación de microorganismos patógenos mediante colonización previa en el huésped susceptible.
10. **Invasidad:** Capacidad de invadir tejidos celulares del huésped.⁴¹
11. **Medios de cultivo:** Casado c. (2012)³⁹ Son nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares”.
12. **Multiplicación patógena:** Capacidad de un determinado microorganismo para reproducirse su número de colonias.⁴⁰
13. ***Rosmarinus officinalis*.L:** Es una planta mediterránea cuyo término se deriva del griego rhops y myrinos que significa arbusto marino”.⁵
14. **Staphylococcus aureus:** Es un agente etiológico de diversas patologías incluyendo infecciones de piel y tejido blando”.¹⁸

CAPITULO III

MÉTODO

3.1 Tipo de Estudio

Esta investigación por su alcance es de tipo descriptiva: Se pretende medir y recoger información de manera independiente de las variables.

Esta investigación por su finalidad es aplicada: Este estudio se llevó a cabo de manera práctica mediante experimentos en cepas de cultivos de *Staphylococcus aureus*. Los resultados podrán tener aplicabilidad útil.

Esta investigación por su condición temporal es transversal: Este estudio evaluó las muestras en una sola vez.

Nivel de la investigación: Esta investigación alcanzará un nivel explicativo y descriptivo donde se identificará el efecto del extracto de Romero en muestras experimentales de cultivos bacterianos.

3.2 Diseño a utilizar

Esta investigación por su diseño es experimental porque es posible la manipulación ex profesa de la variable independiente.

3.3 Población

Variable independiente:

Un kilo de la planta de *Rosmarinus officinalis.L*

Variable dependiente:

La población de estudio estará constituida por todas las placas Petri que puedan ser cultivadas por sembrado derivado de cepas ATCC.

3.4 Muestra

- **Variable independiente**

400 gr de Tallo de la planta de *Rosmarinus officinalis L.*

- **Variable dependiente**

La investigación planificada será llevada a cabo en una muestral representativa de la población de estudio obtenidas de forma probabilística, en un tamaño muestral mínimo. Para la determinación del tamaño muestral se hará uso de la fórmula por delta estandarizado.

$$\Delta E = \frac{\bar{X}_c - \bar{X}_e}{S_c}$$

Dónde:

- ΔE = Delta Estandarizado o Diferencia clínica.
- \bar{X}_c = Media del Grupo Control.
- \bar{X}_e = Media del Grupo Experimental.
- S_c = Desviación Estándar del Grupo Control.

$$\Delta E = \frac{15.5 - 9.0}{1.4}$$

Dónde:

- $\Delta E = ?$
- $\bar{X}_c = 15.5^{(1)}$
- $\bar{X}_e = 9.0^{(1)}$
- $S_c = 1.4^{(1)}$ $\Delta E = 4.64$

Considerando un nivel de significancia a dos colas de 0.05, bajo un valor estimado de delta de 1.50, y un $\beta=0.2$, se estableció:

$$n = 9 \text{ placas petri}$$

Considerando la posibilidad que existan placas que puedan echarse a perder durante el desarrollo de la investigación, se recalculó el tamaño muestral por grupo en base a una tasa de pérdida de 10%.

$$n_c = n \frac{1}{1 - R}$$

Dónde:

- **nc**=Tamaño Muestral Corregido a Pérdidas.
- **n**=Tamaño Muestral no Corregido a Pérdidas.
- **R**=Tasa Estimada de Pérdida.

$$nc = 9 \frac{1}{1 - 0.1}$$

Dónde:

- **nc**=?
- **n**=9
- **R**=10%= 0.1

$$n = 10 \text{ placas}$$

3.5 Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

3.5.1 Técnica de recolección de datos

La recolección de los datos en el presente estudio se llevó a cabo por medio de la técnica de observación estructurada, individual, de laboratorio; por la cual el investigador realizó la evaluación de observación de las que conformen la muestra de estudio; dichos datos obtenidos fueron registrados en el instrumento de investigación.

3.5.2 Instrumento de recolección de datos

El instrumento de recolección de datos empleado en la presente investigación es una ficha de observación ad-hoc, diseñada para los fines específicos de la investigación, la cual está conformada por ítems abiertos y cerrados acorde a los indicadores de las variables operacionalizadas. La mencionada ficha fue aplicada únicamente por el investigador, todas las mediciones serán llevadas a cabo bajo las mismas circunstancias (físicas, emocionales y procedimentales). Además se apoyara en el paquete de datos SPSS versión 22 para Windows, dicho instrumento de recolección de datos tanto para la variable dependiente como independiente se localizan en los anexos N°. 4.

3.5.3 Equipos y materiales

Materiales:

- Agua destilada
- Probetas
- Matr az de Erlenmeyer
- Placas Petri
- Pipetas
- Esterilizador de calor seco (horno)
- Mecheros
- Estufa
- Refrigeradora
- Tubos de ensayo
- Guantes y mascarillas
- Hisopo
- Vaso beacker
- Gradillas
- Pinzas de madera
- Reactivos para screeningfitoimico
- Pipetas pasteur
- Papel wotman N  1, 2, 3
- Mortero

Equipos:

- Estufa
- Incubadora
- Balanza
- Baño María
- Computadora
- Refrigeradora

3.5.4 Obtención del extracto etanólico de tallos de *Rosmarinus officinalis* (Romero)

La planta en estudio, *Rosmarinus officinalis L.* (Romero), se recolectó en la Amazonía Peruana de la Provincia Rodríguez de Mendoza del departamento de Amazonas cultivado a unos 1 295 m.s.n.m. sobre el nivel del mar. Se trasladó a los laboratorios de farmacia y bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega; donde se dispuso a ser el respectivo limpiado de la planta para eliminar contaminantes separando las hojas del tallo que luego se pesó 400g de tallo en una balanza común y luego se procedió al secado a 40 grados centígrados en estufa por dos semanas, posteriormente se procedió a pulverizar el tallo seco y se colocó en un frasco de vidrio de color ámbar y se le agregó 1L de etanol de 70, dejándose macerar por 2 semanas, agitándolo todos los días.

Al cabo de la semana de maceración, 50 ml del extracto fue filtrada con papel whatman N°1, 2, 3, por tres veces, para obtener solo el líquido conteniendo los metabolitos de interés, este líquido paso por el rota vapor para evaporar el alcohol contenido en la muestra, una vez volatilizado el alcohol, la muestra fue colocada en un pírex de vidrio y fue llevada a la estufa para obtener la pasta semisólida.

Luego se pesó 2.3 gr de la pasta semisólida y se mezcló con 30 ml de alcohol para realizar la marcha fitoquímica.

3.5.5 Marcha fitoquímica del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis L.* (romero)

Para la identificación de compuestos químicos se realizó la marcha fitoquímica del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis L. (Romero)*, de la siguiente manera.

1. Identificación de carbohidratos:

- a.- **Reactivo molish:** En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis.L* (romero), luego se agregó 5 gotas del reactivo molish y finalmente se agregó 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado y se dejó en reposo, un resultado positivo formaría un anillo violáceo.

2. Identificación de azúcares:

- a.- **Reactivo Benedict:** En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis L.* (romero), luego se agregó 5 gotas del reactivo Benedict se agito y finalmente se llevó a baño maría por 10 minutos, un resultado positivo formaría un precipitado color amarillo.
- b.- **Reactivo Fehling A + Fehling B:** En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis L.*(romero), luego se agregó 5 gotas del reactivo Fehling A, más 5 gotas del reactivo Fehling B se agito y finalmente se llevó a baño maría por 10 minutos, un resultado positivo daría un precipitado color anaranjado rojizo.
- c.- **Reactivo Tollens:** En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis L.*(romero), luego se agregó 3 gotas del reactivo Tollens se agito y finalmente se llevó a baño maría por 10 minutos, un resultado positivo formaría un espejo de plata.

3. Identificación compuestos fenólicos:

En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis L.* (romero), luego se agregó 5 gotas del reactivo de tricloruro férrico al 5 % (FeCl_3 5%), un resultado positivo daría cambio de coloración pardo a azul.

4. **Identificación de cumarinas:** En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis L.* (romero), luego se agregó 2 gotas del reactivo de hidróxido de sodio al 10 % (NaOH 10 %), un resultado positivo daría un color amarillo intenso.

5. **Identificación de taninos:** En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis L.* (Romero), luego se agregó 5 gotas del reactivo de gelatina más 3 gotas de cloruro de sodio al 10 % (NaCl 10 %), un resultado positivo formaría un coloide.

6. Identificación de saponinas:

En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis L.* (romero), luego se agregó 1 ml de H₂O destilada y se agito por dos minutos, un resultado positivo formaría espuma.

7. Identificación de flavonoides:

- a. En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis L.***(Romero), luego se agregó trozo de limaduras de Mg^{+2} se agito y finalmente se agregó 5 gotas de HCl concentrado en zona, un resultado positivo daría un tono rojo.

8. Identificación de Alcaloides:

- a.-En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis L.*** (Romero), luego se agregó 3 gotas del reactivo de Dragendorf en zona, un resultado positivo daría un precipitado anaranjado.
- b.-En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis L.*** (Romero), luego se agregó 3 gotas del reactivo de Mayer en zona, un resultado positivo daría un precipitado amarillo.
- c.-En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis L.*** (Romero), luego se agregó 3 gotas del reactivo de Popof en zona, un resultado positivo daría un precipitado blanco lechoso.
- d.-En un tubo de ensayo se colocó 2ml del extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis L.*** (Romero), luego se agregó 3 gotas del reactivo de wagner en zona, un resultado positivo daría un precipitado marrón.

9. Prueba de solubilidad:

- En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis L.*** (Romero), muestra patrón.
- En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis L.*** (Romero), luego se agregó 1 ml de acetato de etilo.
- En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis L.*** (Romero), luego se agregó 1 ml de ciclohexano.

- En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis L.*** (Romero), luego se agregó 1 ml de metanol.
- En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis L.*** (Romero), luego se agregó 1 ml de butanol.
- En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis L.*** (Romero), luego se agregó 1 ml de éter de petróleo.
- En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis L.*** (Romero), luego se agregó 1 ml de agua destilada.
- En un tubo de ensayo se colocó 1ml del extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis L.*** (Romero), luego se agregó 1 ml de etanol.

3.5.6 Identificación y recolección del material botánico

El material vegetal se recolectó en buen estado y se identificó la especie por un biólogo botánico. Se obtuvo solo los tallos de ***R. officinalis.L.***, que posteriormente se secaron y se colocaron a maceración etanólica para determinar por marcha fitoquímica la composición de compuestos químicos activos y el efecto antibacteriano sobre cepas de ***S. aureus. ATCC 6538.***

3.5.7 Obtención de las muestras biológicas

Siendo un trabajo experimental el tamaño de la muestra está constituido por 5placas Petri obtenidas del laboratorio microbiológico de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos de la ciudad de Lima, la cual a cada una de ellas contiene especie de bacterias de ***Staphylococcus aureus*** siendo del tipo ATCC 3568 para el respectivo estudio.

Criterios de Inclusión

- Cepas del género Aureus.
- Placas esterilizadas.
- Placas de tamaño mediano.

- Cepas de bacterias jóvenes.

Criterios de Exclusión

- Placas deterioradas.
- Placas usadas en otras pruebas.
- Placas contaminadas.
- Cepas de bacterias antiguas.

3.5.8 Preparación de las concentraciones del extracto de Romero

La muestra se encontraba en forma de extracto alcohólico del cual se preparó diluciones al 75%, 50% y 25% con etanol 70°. Las muestras fueron diluidas en viales de 5mL.

1. La preparación de las diluciones se realizó de la siguiente manera:

Se llevó a estufa alrededor de 500ml de extracto a 40°C por dos días para obtener una muestra más concentrada del cual se procedió a colocar en un vial 3 mL del extracto y 1 mL de alcohol para obtener la concentración de 75%, en otro vial se agregó 2 mL del extracto y 2 mL de alcohol para obtener la concentración de 50% y en otro vial se añadió 1 mL del extracto y 3 mL de alcohol para obtener la concentración de 25%.

Se utilizó discos vacíos para difusión en placa, los cuales se embebieron con las distintas diluciones de la muestra a analizar, para cada dilución se usó tres discos. La cantidad de muestra agregada a los discos fue de 100µL.

También se agregó etanol 70° en tres discos para utilizarlos como control negativo.

3.5.9 Desarrollo del método

3.5.9.1 Método de disco – difusión (Kirby – Bauer): Este método se eligió considerando las ventajas y desventajas.

Ventajas:

- Los resultados son altamente reproducibles
- Es recomendado por el comité de ensayos de susceptibilidad.
- Es un método rápido y fácil de para realizar un antibiograma.

Desventajas:

- Los discos están compuestos de celulosa los cuales tienen muchos grupos hidroxilo libres de manera que hace que la superficie del disco sea hidrofílica provocando que exista interferencia con algunos compuestos absorbiéndolos e impidiendo difusión de estos en el agar.

En la presente investigación la desventaja es mínima ya que vehículo usado en el extracto es el alcohol y cuyo solvente tiene características polares como apolares.

3.5.9.2 Preparación del Agar Mueller Hinton

El agar Mueller - Hinton se preparó con agua destilada de acuerdo a las instrucciones del “fabricante”. Autoclavar el agar a 121°C y 15 lb/pg² durante 15 minutos. Inmediatamente después de autoclavar dejar enfriar en Baño María a 45 - 50°C. Una vez temperado verter el preparado fresco y tibio a placas Petri de vidrio estériles, para dar un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm. Esto corresponde a 25 - 30 ml para placas de 100 mm de diámetro. El medio de agar debe dejarse enfriar a temperatura ambiente. El pH de cada lote de agar Mueller Hinton debe tener un pH entre 7,2 - 7,4. Esta medición puede realizarse sumergiendo el bulbo del electrodo del potenciómetro en el agar antes de autoclavar.

3.5.9.3 Preparación del inóculo bacteriano

A partir de colonias puras del microorganismo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 tomar una cierta cantidad de colonias y diluirla en un tubo de ensayo conteniendo 10 ml de suero fisiológico (cloruro de sodio 0.9%) de tal manera que la solución resultante tenga una

turbidez muy similar al tubo N°1 de la escala de **Mac Farland** el cual corresponde a una concentración de 3×10^8 ufc/ml.

A partir de esta última solución realizar una dilución de 1 en 3, para ello de esta solución preparada tomar 3 ml y diluirlo a un volumen total de 9 ml con suero fisiológico en un tubo con tapa rosca, todos los materiales usados deben ser estériles y también el área de trabajo. La solución resultante tendrá una concentración de 1×10^8 ufc/ml.

Bajo las mismas condiciones realizar una dilución de 1 en 100 añadiendo 0.1 ml de la solución anterior a un tubo con 9.9 ml de suero fisiológico, la solución resultante tendrá una concentración de 1×10^6 ufc/ml. Por lo tanto, al final tendremos un tubo de ensayo con una solución de 1×10^6 ufc/ml de ***Staphylococcus aureus***.

3.5.9.4 Inoculación de las placas

Agregar 100 uL del inóculo bacteriano preparado (1×10^6 ufc/ml) a 5 placas Petri con agar Mueller Hinton ya solidificado (3 para las muestras y dos para los controles) y con la ayuda de una espátula de Drigalsky esparcir el inóculo por toda la placa de tal manera que se obtenga un crecimiento homogéneo, para lo cual se desliza el asa en la placa en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie de la misma. Luego se repite el procedimiento rotando la placa 60° en dos oportunidades más.

Deben extremarse los cuidados en sembrar las placas de borde a borde, porque de lo contrario puede haber problemas en la realización de las lecturas. Dejar secar 3 a 5 minutos antes de colocar los discos.

3.5.9.5 Preparación de los discos de antibióticos

Los discos de antibióticos fueron preparados a partir de Amoxicilina Estándar con una pureza del 90%. Con la cual se preparó una solución de 0.5 mg/mL de la siguiente manera: se pesó 29.7 mg de amoxicilina estándar en una Fiola de 50 mL y se enrasó con agua destilada. De la solución resultante se tomó 20 uL y se añadió a tres

discos respectivamente. Por lo tanto, cada disco resultó con una concentración de 10 ug de amoxicilina.

3.5.9.6 Aplicación de los discos a las placas inoculadas

Estos deben ser colocados con dispensador o pinza estéril. Luego de estar sobre el agar se debe presionar los discos levemente para que queden adheridos al mismo. Deben estar a más de 15 mm del borde de la placa y deben distribuirse de tal manera que no haya superposición de los halos de inhibición. Los discos de antibióticos fueron colocados de la siguiente manera:

- Tres discos del antibiótico en una placa inoculada con un microorganismo de tal manera que se obtengan resultados por triplicado.
- Luego de colocados los discos la placa debe incubarse a 35-37°C durante 18-24 horas. La placa debe colocarse en forma invertida.
- Los discos con la muestra fueron colocados de manera similar, tres discos por cada placa, estos también se incubaron a 35-37°C durante 18-24 horas.
- El diluyente de las muestras o control negativo también se trabajó de la misma manera.

3.5.9.7 Determinación de la actividad antimicrobiana

Después de 18 a 24 horas de incubación, cada placa fue examinada. Las zonas de inhibición resultantes deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento bacteriano. Los diámetros de la zona de inhibición completa son medidos en milímetros pasando por el centro del disco. La medición se realizó con un vernier digital, se realizaron tres mediciones por cada disco y el promedio se reportó como resultado. Los valores de las mediciones promedio de los tres discos deben compararse con las medidas de los halos de inhibición producidos por los antibióticos.

Tabla N° 1. Protocolo de evaluación para placas Petri

Grupo	Criterio de evaluación	Concentración
PLACA 1: Metanol Control (-)	1 placa petri + etanol 70°	100ul
PLACA 2: Amoxicilina Control (+)	1 placa petri + solución de amoxicilina	10 ug/mm
PLACA 3: Extracto de Romero	1 placas petri + extracto etanólico de Romero	25% (100ul x disco)
PLACA 4: Extracto de Romero	1 placa petri + extracto etanólico de Romero	50% ((100ul x disco)
PLACA 5	1 placa petri + extracto etanólico de Romero	75%(100ul x disco)

PLACA 1: Esta muestra estuvo constituida por 1 placa petri y se le colocó una concentración de alcohol 70° en 3 discos.

PLACA 2: Esta muestra estuvo constituido por 1 placa petri en a que se adiciono la solución de amoxicilina a 10ug/mm en 3 discos.

PLACA 3: Esta muestra estuvo constituido por 1 placa petri a la que se le adiciono el extracto de *Rosmarinus officinalis.L* (Romero) en 3 discos a una concentración de 25%.

PLACA 4: Esta muestra estuvo constituido por 1 placa petri a la que se le adiciono el extracto de *Rosmarinus officinalis. L* (Romero), en 3 discos a una concentración de 50%

PLACA 5: Esta muestra estuvo constituido por 1 placas petri a la que se le adiciono el extracto de *Rosmarinus officinalis. L* (Romero), en 3 discos a una concentración de 75%.

Al cabo de 24 horas de incubación de las placas petri a temperatura de 37°C se evaluó las medidas con el instrumento vernier a cada grupo de siembra con las diferentes concentraciones para determinar el halo de inhibición correspondiente demostrándose así el efecto del tallo de Romero su efecto antibacteriano y cuantificar los resultados al 100%.

3.6 Técnica de Procesamiento de Datos

3.6.1 Procesamiento de datos

La recolección de los datos se llevó a cabo de manera secuencial según la disposición de los indicadores, ello se realizó a cabo evaluando cada unidad muestral de forma individual. Para lograr los objetivos planificados se llegarán a cabo los siguientes pasos de manera secuencial.

3.6.2 Materiales para la recolección y procesamiento de datos

- Fichas de recolección de datos y lápices
- Programa estadístico SPSS
- Computadora

CAPITULO IV

RESULTADOS

4.1 Resultados de la Investigación

Después de haber realizado la marcha fitoquímica se concluye que el Romero tiene presencia de metabolitos secundarios como, compuestos fenólicos, flavonoides, , saponinas, taninos, cumarinas y alcaloides, siendo las ultimas muy importantes porque tienen la actividad antibacteriana y sin presencia de azucares.

Los Taninos son conocidos por sus efectos astringentes y antibacterianas teniendo efecto como antibacteriano.

Tabla N°2.Screening Fitoquímico

Metabolitos	Reacción	Resultados
Carbohidratos	RVO. MOLISH + HSO	(-)
Azucares	RVO. BENEDICT	Precitado color amarillo (-)
	RVO. FEHLING A+ FEHLING B	(-)
	RVO.TOLLENS	Forma espejo de plata (-)
Compuestos Fenolicos	RVO.TRICLORURO FERRICO	Coloración pardo azul (+++)
Cumarinas	RVO. HIDROXIDO DE SODIO AL 10%	Coloración amarillo intenso (++)
Taninos	RVO. DE GELATINA – SAL+ NAOH 10%	Formación de coloide (++)
Saponinas	H ₂ O DESTILADA + AGITACION	Formación de espuma (+++)
Flavonoides	LIMADURAS DE Mg ²⁺ + HCL	Cambio de color a tono rojo (+++)
Alcaloides	RVO. DRAGENDORF	Presencia de precipitado anaranjado (+++)
	RVO. MAYER	Presencia de precipitado blanco (+++)
	RVO. POPOF	(++)
	RVO. WAGNER	Presencia de precipitado marrón (+++)

Leyenda:

Abundante (+++)

Regular (++)

No presenta (-)

Tabla N° 3. Prueba de solubilidad

1.	ACETATO DE ETILO	SOLUBLE
2.	CICLOHEXANO	INSOLUBLE
3.	METANOL	SOLUBLE
4.	BUTANOL	POCO SOLUBLE
5.	ETER DE PETROLEO	INSOLUBLE
6.	AGUA DESTILADA	SOLUBLE
7.	ETANOL	SOLUBLE

Lectura de resultados del extracto de Romero

El extracto etanólico analizado de *Rosmarinus officinalis*. L presenta efecto antibacteriano inhibiendo el crecimiento de bacterias de *Stahylococcus aureus* en las placas petri estudiadas, a las concentraciones de 25, 50 y 75% de muestra en discos.

Tabla N° 4. Distancia inhibitoria en mm de diámetro en las concentraciones control y concentraciones experimentales

Microorganismo	CONTROLES			MUESTRA		
	HALO DE INHIBICIÓN (mm)			EXTRACTO ALCOHÓLICO		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	AMOXICILINA 10 ug			75%		
	47.25	47.71	47.11	16.12	15.28	15.81
				50%		
				14.12	13.83	12.95
	ALCOHOL ETILICO 70°			25%		
0	0	0	12.79	10.93	10.34	

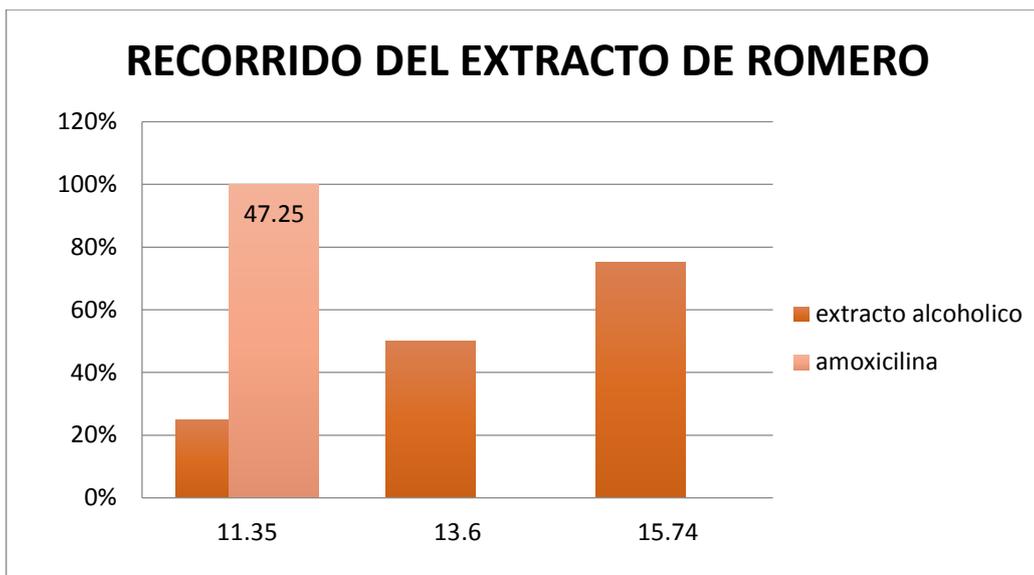


Figura N° 1. Determinación del efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis.L*

Se realizó la medición de los halos de inhibición formados en las placas petri con vernier.

Recolección de datos:

Se recolectó las mediciones de los halos de inhibición en fichas A-DOC.

Tabla N°5. Estadística descriptiva para los halos obtenidos de cada extracto alcohólico aplicado

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1,00	3	47,3567	,31390	,18123	46,5769	48,1364	47,11	47,71
2,00	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
3,00	3	15,7367	,42477	,24524	14,6815	16,7919	15,28	16,12
4,00	3	13,6333	,60929	,35177	12,1198	15,1469	12,95	14,12
5,00	3	11,3533	1,27868	,73825	8,1769	14,5298	10,34	12,79
Total	15	17,6160	16,39884	4,23416	8,5346	26,6974	,00	47,71

Leyenda:

1. Control Positivo (Amoxicilina)
2. Control Negativo (Alcohol de 70°)
3. Extracto Alcohólico al 75%
4. Extracto Alcohólico al 50%
5. Extracto Alcohólico al 25%

N: Número de Muestras (Placas Petri)

En este cuadro podemos observar los valores de los límites superior e inferior por cada tratamiento aplicado. Si observamos la media o promedio por cada tratamiento todos se encuentra dentro de los límites establecidos.

Tabla N°6. Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
5,090	4	10	,017

Dónde:

H₀ (Hipótesis Nula) = Las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneos ($P < 0.05$)

H₁ (Hipótesis alternativa) = Las varianzas de los tratamientos aplicados no son homogéneos ($P > 0.05$)

La prueba de homogeneidad de varianzas nos permite determinar si las varianzas de cada tratamiento aplicado son iguales o diferentes estadísticamente, depende de ello para determinar el tipo de prueba estadística inferencial a ser aplicado. Observamos que $p < 0.05$, por lo tanto, se concluye que las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneas, aceptando la hipótesis nula. Al determinar ello, podemos deducir diferentes tipos de pruebas estadísticas, que en este caso será ANNOVA oneway o de un factor y la prueba de Tukey.

Tabla N° 7. ANOVA de un factor

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3760,336	4	940,084	2056,866	,000
Dentro de grupos	4,570	10	,457		
Total	3764,906	14			

Dónde:

H_0 = No existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ($P > 0.05$)

H_1 = Existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ($P < 0.05$)

La prueba ANNOVA OneWay nos permite descifrar si existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados comparando la media de cada uno de ellos. Al observar el resultado ($P < 0.05$) se afirma la hipótesis alternativa, es decir, existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. Si deseamos determinar que medias son estadísticamente diferentes se debe aplicar pruebas POST HOC, en este caso se aplicará la prueba de TUKEY.

Tabla N° 8. Variable dependiente: HALOS

HSD Tukey

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1,00	2,00	47,35667	,55199	,000	45,5400	49,1733
	3,00	31,62000	,55199	,000	29,8033	33,4367
	4,00	33,72333	,55199	,000	31,9067	35,5400
	5,00	36,00333	,55199	,000	34,1867	37,8200
2,00	1,00	-47,35667	,55199	,000	-49,1733	-45,5400
	3,00	-15,73667	,55199	,000	-17,5533	-13,9200
	4,00	-13,63333	,55199	,000	-15,4500	-11,8167
	5,00	-11,35333	,55199	,000	-13,1700	-9,5367
3,00	1,00	-31,62000	,55199	,000	-33,4367	-29,8033
	2,00	15,73667	,55199	,000	13,9200	17,5533
	4,00	2,10333	,55199	,022	,2867	3,9200
	5,00	4,38333	,55199	,000	2,5667	6,2000
4,00	1,00	-33,72333	,55199	,000	-35,5400	-31,9067
	2,00	13,63333	,55199	,000	11,8167	15,4500
	3,00	-2,10333	,55199	,022	-3,9200	-,2867
	5,00	2,28000	,55199	,014	,4633	4,0967
5,00	1,00	-36,00333	,55199	,000	-37,8200	-34,1867
	2,00	11,35333	,55199	,000	9,5367	13,1700
	3,00	-4,38333	,55199	,000	-6,2000	-2,5667
	4,00	-2,28000	,55199	,014	-4,0967	-,4633

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

Leyenda:

1. Control Positivo (Amoxicilina)
2. Control Negativo (Alcohol de 70°)
3. Extracto Alcohólico al 75%
4. Extracto Alcohólico al 50%
5. Extracto Alcohólico al 25%

6. La prueba de TUKEY es una prueba estadística que nos permite realizar comparaciones múltiples y además determina que medias son estadísticamente homogéneas. En el cuadro adjunto observamos que existen diferencias significativas entre los tratamientos 1 – 2 – 3 – 4 y 5. Por ello se debe aplicar la prueba de Subconjuntos de TUKEY para identificar las diferencias antes mencionadas.

**Tabla N° 9. Prueba de subconjuntos de Tukey
HSD Tukey^a**

CONCENTRACION	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
2,00	3	,0000				
5,00	3		11,3533			
4,00	3			13,6333		
3,00	3				15,7367	
1,00	3					47,3567
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

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

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000

En el cuadro adjunto podemos observar que todas las medias de los tratamientos aplicados son distintos (se observa en forma de escalera), por lo tanto, el extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis L.* Romero al 75% presenta la mejor inhibición de efecto antibacteriano.

4.2 Discusión de Resultados

Desde muchos años atrás y en la actualidad las plantas aportan un papel muy importante en el tratamiento de múltiples afecciones como tratamiento alternativo en el campo medicinal como sustituto de un fármaco por las propiedades que poseen entre muchas de ellas el efecto antibacteriano.

El trabajo microbiológico de inhibición de bacterias en placas petri es un modelo farmacológico preclínico que nos permite sustentar la hipótesis de que un extracto de una planta determinada tiene efecto antibacteriano.

Los resultados de la investigación muestran la efectividad antibacteriana del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis. L (Romero)* sobre cepas de

Staphylococcus aureus a concentraciones de 25%, 50% y 75% lo cual en los resultados se demuestra que esta bacteria es susceptible al extracto de Romero desde 25% de concentración obteniendo un halo de inhibición promedio de 11.35mm de diámetro, a una concentración de 50% se obtuvo un halo de inhibición promedio de 13.6 mm de diámetro mientras que a 75% de concentración se obtuvo un halo de inhibición de 15.7mm de diámetro, estos resultados señalan que el efecto antibacteriano depende de la concentración del extracto, por cuanto a concentraciones mayores el efecto antibacteriano aumenta. Así mismo este efecto del extracto de Romero puede atribuirse a los compuestos fenolicos, cumarinas y alcaloides ya que existe información que indica sus propiedades con actividad antibacteriana. Cowan MM Clin Microbiol Rev. 1999 relata que las plantas son ricas en una amplia variedad de metabolitos secundarios, como taninos, terpenoides, alcaloides y flavonoides, que se han encontrado in vitro con propiedades antimicrobianas. Esta revisión intenta resumir el estado actual de los esfuerzos de detección botánica, así como estudios in vivo de su efectividad y toxicidad. La estructura y las propiedades antimicrobianas de los fitoquímicos también se abordan.

En la presente investigación en relación al control positivo de amoxicilina base con efecto de 90%, se observó que también inhibió el crecimiento de las bacterias de ***Staphylococcus aureus*** con un halo de inhibición en promedio de 47.4 mm de diámetro, mientras que el control negativo (alcohol 70°) no se encontraron ningún efecto antibacteriano lo que nos valida que el efecto antibacteriano del extracto de Romero se debe al 100% a propiedades de la planta y no del vehículo con el que se maceró.

Los resultados encontrados por Purca T (2013) Efectividad antibacteriana "in vitro" del extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis. L*** (romero) sobre flora salival, consideró el efecto inhibitorio de menor a 8mm de halo de inhibición como nula, de 9mm a 14mm como sensibilidad mínima, de 15mm a 19mm como sensibilidad media y 20mm a mas como sensibilidad alta, teniendo como resultados de sus ensayos de 12.47mm a 20.56mm en concentraciones de 25,50 y 75mg/ml de extracto de romero comparado con

la clorhexidina como control positivo 0.12% con un halo de inhibición de 17mm, lo cual similares resultados se obtuvieron en nuestra investigación se aproximan basándonos en la sensibilidad mínima que se obtuvo fue de 11mm a 15.44mm que nos lleva a respaldar nuestros resultados obtenidos. Estos resultados también concuerdan con el estudio de Ardila Q .et al (2009). Que evaluaron la actividad antibacteriana “*in vitro*” de seis extractos de plantas diferentes, entre ellas utilizaron el extracto de ***Rosmarinus officinalis.L*** (romero) y el antibiótico vancomicina de 30 ug/ml. Contra *Clostridium perfringens ATCC 13124*; el extracto de romero presentó un halo de inhibición de 14,4 mm. De diámetro en el crecimiento bacteriano, casi semejante a la vancomicina 14.5 mm.

Nuestro resultado se decidió comparar con un control positivo para ello elegimos la amoxicilina obtenidos de los laboratorios de la UNMSM el cual es amoxicilina pura, que en la actualidad generalmente se usa como antibacteriano de primera elección también se utilizó el alcohol de 70° como el control negativo para asegurar la eficacia del extracto de romero. Los resultados obtenidos del extracto de romero es de 11.35mm a 15.74mm frente a los resultados de control de la amoxicilina 47.5mm se ve que son menores, datos por el cual se tiene en cuenta que la muestra de la amoxicilina se usó como patrón referencial siendo la cantidad usada de 10 ug patrón por el cual se trabaja en la UNMSM lo cual cabe destacar la importancia de ajustar la concentración del patrón positivo al extracto de romero para acercar el resultado de efecto que obtuvimos con el extracto de romero, siendo así los resultados de este estudio son prometedores, ya que también muestran la importancia de las aplicaciones terapéuticas del ***Rosmarinus officinalis. L*** (Romero) como método alternativo y su bajo costo en la prevención de las patologías infecciosas. De esta manera pasaría a formar una nueva alternativa económica y de fácil acceso para la población que es lo que se busca en el sector farmacéutico.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

1. El screening fitoquímico del extracto etanólico del tallo de ***Rosmarinus officinalis.L*** (*Romero*) determinó la presencia de flavonoides (+++), saponinas (+++), compuestos fenólicos (+++), alcaloides (+++) siendo estos metabolitos secundarios con mayor presencia.
2. El extracto etanólico de tallos de ***Rosmarinus officinalis.L*** (*Romero*) presenta efecto antibacteriano sobre cepas de ***Staphylococcus aureus*** y mayor halo de inhibición a medida que aumenta la concentración.

Los resultados de halos de inhibición se hallan entre los valores mínimos necesarios de sensibilidad: nula (inferior a 8mm), sensibilidad mínima (9mm a 14mm), sensibilidad media (15mm a 19mm) y muy sensible (mayor a 20mm).

5.2 Recomendaciones

1. Continuar con el presente estudio a fin de consolidar resultados, ya que sería importante encontrar puntos que ajusten concentraciones en forma de dosis.
2. Este estudio servirá de base, a partir del efecto antimicrobiano en otros modelos de estudio a fin de determinar la dosis adecuada como efecto bacteriostático y/o bactericida del extracto de tallos de ***Rosmarinus officinalis. L*** (Romero).
3. Debido a su presencia de flavonoides cuya propiedad es antioxidante puede ser de importancia y apoyo para la aplicación y/o estudios posteriores para la formulación de productos antioxidantes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Paganini H, et al. Estudio multicentrico sobre las infecciones ediatricas por *Staphylococcus aureus* meticilino-resistente provenientes de la comunidad en la Argentina. Arch Argent Pediatr.2008;106 (5):397-403.
2. Washington C. Diagnostico microbiológico.6a ed. Buenos Aires: Editorial médica panamericana; 2007.
3. Bustos Detección en paralelo de bacterias de importancia clínica, implementación de un sistema de identificación de elementos de resistencia y patogenicidad por medio de microarreglos.Mexico.2009.
4. Sosa JA. Efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de ***Rosmarinus officinalis.L*** (Romero) y del agua ozonizada sobre ***Streptococcus mutans*** y ***Enterococcus faecalis*** (tesis de titulación).Pimentel: Universidad señor de Sipan;2015.79p.
5. Purca TP. Efectividad antibacteriana "in vitro" del extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis.L*** (Romero) sobre flora salival [tesis de titulación].Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013. 97p.
6. San Román I. Actividad antimicrobiana in vitro del extracto etanólico de ***Rosmarinus officinalis.L*** (Romero) sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con bolsa periodontal salival [tesis de titulación].Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013.85p.

7. Solano XK. Inhibición del ***Streptococcus mutans***, mediante el uso de extracto acuoso y oleoso de ***Rosmarinus officinalis.L*** “romero”. Rev odontológica. 2016; vol. (19):29-34.
8. Mosquera Estudio comparativo de la eficiencia antibacteriana de una mezcla de parabenos frente al aceite de romero (***Rosmarinus officinalis.L*** *amiaceae*) utilizados como conservantes en una formulación cosmética. (tesis de titulación). Quito: Universidad Politécnica Salesiana; 2014.
9. Ramos A. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales e hidrosoles de *Rosmarinus officinalis* y *Taraxacum officinale* contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. (tesis de titulación). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2013. 46p.
10. Carrión AV. García C, preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de métodos. 2010:27-31.
11. Castillo J.M. Obtención de extractos, aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios de *Silybum marianum*. L con posible actividad antitumoral. (tesis de titulación). Ecuador: Universidad técnica particular de Loja; 2018. 77p.
12. Añazco KA, Suarez EF. Determinación de las condiciones óptimas en la extracción de glicósidos diterpenoides a partir de *Stevia rebaudiana* Bertoni en un digestor. (tesis de titulación). Ecuador: 2015. 184p.
13. Bague AJ. Tecnología farmacéutica. 1ª Ed. Cuba: Club universitario; 2012. 370p.
14. Ortuño MF. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. España. 1ª ed. ediciones Aiyana; 2006. 271p.

15. Muñoz Plantas medicinales y aromaticas.2^{da}ed.Mundi-prensa; 1996.365p.
16. Villar D. Farmacología de antimicrobianos.2010.1-4.
17. Sanchez L, Saenz E. Infecciones cutáneas bacterianas. Servicio de Dermatología Hospital Militar. 2006; 16(1).
18. Gil M. Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a metilina. Revchilinfect. 2000; 17(2): 145-152.
19. Soriano EV, Salgado c, Sarez F, Trigo F. Patogenia microbiana: Conceptos básicos en la interacción hospedero-microorganismo.researchgate.2006 jun; 37(4):1-10.
20. Saavedra J, Santos M, González F, Hernández T, Navarro ML. Infecciones bacterianas de la piel y tejidos blandos. Hospital General Universitario Gregorio Marañón.160-179.
21. Ruvertoni M. Semiología Pediátrica: Exploración de la piel y sus anexos. 1era. edición. Montevideo: Oficina del Libro; 1995. 41-60p.
22. Healy B, Freedman A. La infección de las heridas en la práctica clínica. ABC of woundhealingInfections. 2006; 332: 838-41.
23. Pommier L. Dictionairehomeoparthiqued"urgence. 2da ed. Barcelona: Paidrotivo; 2002.
24. Blanco JL. Definición y clasificación de las úlceras por presión. HospitalsValld'Hebron. 2003; 23(4): 194-98.

25. Flores V, Flores I, Larcano M. Edema. Enfoque clínico. Hospital General de Cuernavaca. 2014; 30: 51-55.
26. López A, Iturralde F, Clerencia M, Galindo J. Dolor. Tratado de geriatría para residentes.
27. Jimenez JC, Chinchilla ST, Saborio L. Evaluación médico legal de las equimosis cutáneas. Medicina legal. 2016 marz; 33(1):1409-0015.
28. Alpizar LP, Medina EE. La fiebre conceptos básicos. Rev Cubana Pediatría. 1998; 70(2): 79-83.
29. Castaño HI, Ciro G, Zapata JE, Jiménez SL. Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus Officinalis* sobre algunas bacterias de interés alimentario. Facultad de administración politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavía. 2010; 17(2).
30. Coy CA, Acosta GE. Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero, tomillo y cúrcuma de Colombia. rev. Cbana de plantas medicinales. 2013 jun; 18(2):1028-4796.
31. Avila R, Navarro AR, Vera O, Davila RM, Melgoza N, Meza R. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.) una revisión de sus usos no culinarios. Universidad Autónoma de Puebla. 2011.
32. Aruoma OI, Spencer J, R. Rossi, R. Aeschbach, A. Khan, N. Mahmood, A. Muñoz, A. Murcia, J. Butler & B. Halliwell. 1996. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and provenzal herbs. Food Chemistry Toxicology, 34(3): 449-456.
33. Lopez MT. El romero planta aromática con efectos antioxidantes. offarm. 2008; 27(7):60-63.

34. Almela LB, Sánchez-Muñoz JÁ, Fernández-López MJ. Roca & V. Rabe 2006. Liquid chromatographic mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *Journal of Chromatography*, 1120(2): 221-229.
35. Pedraza PN, Castellanos HJ. estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro. *pontifica universidad javeina*.2009; 1-07.
36. Sussmann OA, Mattos L, Restrepo A. Resistencia bacteriana. *Universidad de medicina*.2002.
37. Seija V, Bignoli r. Principales grupos de antibióticos. *Temas de bacteriología y virología médica*.2002.
38. Montoya M. Las cepas atcc. *Instituto Colombiano de Medicina Tropical*.2002.
39. Casado C, González G, Medina M. Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología. *Laboratorio files wordpress*.2012.
40. Gonzales AA. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólico de plantas del Amazonas. *Universidad nacional de Colombia*.2004; 1-100.
41. Cisterna R. *Microbiologia*. Hospital de Basurto.2007.

ANEXO 1: Matriz de consistencia
EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE TALLOS DE *Rosmarinus officinalis*./(ROMERO) EN CULTIVOS DE *Staphylococcus aureus* ESTUDIO IN VITRO”

TÍTULO	DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS	CLASIFICACIÓN DE VARIABLES	DEFINICIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES	METODOLOGIA
EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE TALLOS DE ROMERO” (<i>Rosmarinus officinalis</i> .L) EN CULTIVOS DE “ <i>Staphylococcus aureus</i> ” ESTUDIO INVITRO	<p>Problema General: ¿Cómo afecta la aplicación del extracto de tallos de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>.L) en la reducción bacteriana en cultivos de <i>staphylococcus aureus</i>?</p>	<p>Objetivo General: Determinar cómo la aplicación del extracto de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>.L) en la reducción bacteriana en cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>Hipótesis Principal: La aplicación del extracto de tallos de Romero (<i>Rusmarinus officinalis</i>.L), afecta significativamente en la reducción bacteriana en cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>Variable Independiente: a)Compuestos del extracto de romero</p>	<ul style="list-style-type: none"> Concentración del extracto Presencia de metabolitos secundarios 	<p>TIPO: Por su alcance: Descriptiva Por su finalidad: Aplicada Secuencia temporal: Longitudinal NIVEL: Explicativo – Descriptivo Diseño de investigación: Experimental POBLACIÓN Placas Petri de cultivo microbiológico de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 MUESTRA: 5 placas Petri de cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i> TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS:</p> <ul style="list-style-type: none"> técnica de observación estructurada Instrumento-ficha de observación ad-hoc <p>Técnica de procesamiento de datos: SPSS</p>
	<p>Problemas Específicos:</p> <p>1. ¿Qué tipos de metabolitos secundarios presenta en mayor cantidad el extracto de tallos de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>.L)?</p> <p>2. ¿Determinar que concentraciones se presenta el efecto antibacteriano del extracto de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>.L) en cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i>?</p>	<p>Objetivos Específicos:</p> <p>1. Determinar algunos tipos de metabolitos secundarios con mayor presencia en el extracto de tallo de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>.L).</p> <p>2. Ddeterminar cómo las concentraciones del extracto de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>.L) afecta en el diámetro de halo de inhibición en cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i>.</p>	<p>Hipótesis Específicas:</p> <p>1. ¿Existen algunos tipos de metabolitos secundarios con mayor presencia en el extracto de tallos de Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i>.L)?</p> <p>2. ¿Las concentraciones del extracto etanolico de tallos de romero afecta significativamente al diámetro del halo de inhibición en cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i>?</p>	<p>Variable Dependiente: b)Reducción bacteriana</p>	<p>> Microbiológica:</p> <ul style="list-style-type: none"> Diámetro de halo de inhibición 	

ANEXO 2: Certificado botánico

Hamilton W. Beltrán S.
Consultor Botánico
Calle Natalio Sánchez 251- Jesús María
hamiltonbeltran@yahoo.com

CERTIFICACION BOTANICA

El Biólogo colegiado y autorizado por el Inrena según RD. N° 334-2013-MINAGRI-DGFFS/DGEFFS, con Registro N° 37, certifica que la planta conocida como "ROMERO" proporcionada por las Srtas. DIANA CAROLINA RODENAS EGOAVIL y AIDELY RODRIGUEZ VALQUI, ha sido estudiada científicamente y determinada como **Rosmarinus officinalis** y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Asteridae
Orden: Lamiales
Familia: Lamiaceae
Especie: **Rosmarinus officinalis** L

Se expide la presente certificación a solicitud de las interesadas para los fines que estime conveniente.

Lima, 06 noviembre 2017


Blgo. Hamilton Beltrán
Hamilton Wilmer Beltrán Santiago
Biólogo - Botánico
C.R.P. 2719

ANEXO 3: Certificado microbiológico

Thermo
SCIENTIFIC

Certificate of Quality

Product Name: S. aureus ssp aureus ATCC 6538 PK/5
Lot Number: 633937

Product Number: R4607016
Expiration Date: 2019-09-30
(YYYY-MM-DD)

This product has been manufactured, processed and packaged in accordance with Quality Systems Regulation, 21 CFR Part 820. Representative samples were tested per Remel Quality Control specifications and were found to meet performance criteria for this product.

Purity:

Standardized aliquots of the rehydrated product are inoculated onto nonselective media and examined for pure growth following the appropriate incubation. Selective and Differential media are also tested where applicable.

Viability And Quantification:

Each organism is recovered from the preserved state within the required time frame and at an acceptable level. Passage number is stated as the current preserved state.

Macroscopic And Microscopic Morphology:

Colony morphology is consistent with documented referenced description. Traditional staining is performed.

Biochemical Analysis:

Organism exhibits characteristic biochemical and/or enzymatic reactions. Automated and/or conventional testing was performed and results were within established limits. Antimicrobial testing performed where applicable. Results within expected ranges.

CFU/loop: >10(4)

Passage: 3

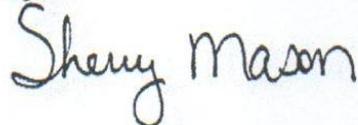
Gram Reaction: Gram Positive Cocci

Biochemical Profile: Vitek 2C GP

Appearance: Preserved Gel Matrix suspended in inoculating loop

pH: N/A

Signed



Product Performance Technologist

ANEXO 4: Instrumento de recolección de datos

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
Y BIOQUÍMICA

FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

**EFFECTO DE LA” APLICACIÓN DEL EXTRACTO DE ROMERO” (*Rosmarinus officinalis.L*) EN LA
”REDUCCIÓN BACTERIANA” EN CULTIVOS DE “*Staphylococcus aureus*”**

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático. Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación. Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad. En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación. Registre los datos sin borrones ni enmendaduras. Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea.

FECHA:

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA <i>Staphylococcus aureus</i> POR EL METODO DE KIRBY BAUER					
N° DE PLACA	CONCENTRACION (%) DEL EXTRACTO ETANOLICO DE <i>Rosmarinus officinalis . L (Romero)</i>			CONTROLES	
				AMXICILINA ug	METANOL 70°
	LONGITUD DEL HALO DE INHIBICION (mm)				
	25%	50%	75%	10 ug	100ul
PLACA 1					
PLACA 2					
PLACA 3					
PLACA 4					
PLACA 5					

ANEXO 5 Ficha de validación por juicio de expertos

Ficha de Validación por Juicio de Expertos.



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
Y BIOQUÍMICA

N°:

HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO
CUESTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE TALLOS DE ROMERO” (*Rosmarinus Officinalis.L*) EN CULTIVOS DE “STAPHYLOCOCCUS AUREUS” ESTUDIO INVITRO

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

- | | MENOS DE | | | | | |
|--|----------|-----|-----|-----|-------------------------------------|-----|
| | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| 1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?..... | () | () | () | () | <input checked="" type="checkbox"/> | () |
| 2. ¿En qué porcentaje considera que los items están referidas a los conceptos del tema?..... | () | () | () | () | <input checked="" type="checkbox"/> | () |
| 3. ¿Qué porcentaje de los items planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?..... | () | () | () | () | <input checked="" type="checkbox"/> | () |
| 4. ¿En qué porcentaje estima que los items del instrumento son de fácil comprensión?..... | () | () | () | () | <input checked="" type="checkbox"/> | () |
| 5. ¿Qué porcentaje de los items considera usted que siguen una secuencia lógica?..... | () | () | () | () | <input checked="" type="checkbox"/> | () |
| 6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrían datos similares si se aplicara en otras muestras?..... | () | () | () | () | <input checked="" type="checkbox"/> | () |

SUGERENCIAS

1. ¿Qué items considera usted que deberían agregarse?

.....

2. ¿Qué items estima que deberían eliminarse?

.....

3. ¿Qué items considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

.....

Fecha: 28/03/18

Validado por: Mg. Q.F. Pedrojaento Herrera

Firma: J.105

ANEXO 6: Ficha de OBSERVACION AD-HOC DE PRUEBA DE SOLUBILIDAD



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA

FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE PRUEBA DE SOLUBILIDAD

EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE TALLOS DE ROMERO
(*Rosmarinus officinalis.L*) EN CULTIVOS DE "STAPHYLOCOCCUS AUREUS"
ESTUDIO INVITRO

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.

Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea.

	DEMOSTRACION	IDENTIFICACION	RESULTADOS
ACETATO DE ETILO	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	
CICLOHEXANO	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	
METANOL	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	
BUTANOL	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	
ETER DE PETROLEO	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	
ETANOL	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	
AGUA DESTILADA	1ml extracto + 1ml del reactivo	Soluble o insoluble	

ANEXO 7 Ficha de validación por juicio de expertos

Ficha de Validación por Juicio de Expertos.



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
Y BIOQUÍMICA

N°:

HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO
CUESTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE TALLOS DE ROMERO” (*Rosmarinus Officinalis.L*) EN CULTIVOS DE “STAPHYLOCOCCUS AUREUS” ESTUDIO INVITRO

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

- | | MENOS DE | | | | |
|--|----------|-----|-----|-----|---|
| | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 - 100 |
| 1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?..... | () | () | () | () | <input checked="" type="checkbox"/> () |
| 2. ¿En qué porcentaje considera que los items están referidas a los conceptos del tema?..... | () | () | () | () | <input checked="" type="checkbox"/> () |
| 3. ¿Qué porcentaje de los items planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?..... | () | () | () | () | <input checked="" type="checkbox"/> () |
| 4. ¿En qué porcentaje estima que los items del instrumento son de fácil comprensión?..... | () | () | () | () | () <input checked="" type="checkbox"/> |
| 5. ¿Qué porcentaje de los items considera usted que siguen una secuencia lógica?..... | () | () | () | () | <input checked="" type="checkbox"/> () |
| 6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrían datos similares si se aplicara en otras muestras?..... | () | () | () | () | <input checked="" type="checkbox"/> () |

SUGERENCIAS

1. ¿Qué items considera usted que deberían agregarse?

.....
.....

2. ¿Qué items estima que deberían eliminarse?

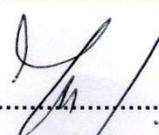
.....
.....
.....

3. ¿Qué items considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

.....
.....

Fecha: 28/03/18

Validado por: Mg. G.F. TEÓFILO CHIRE M.

Firma: 

C.R.F. 3510

ANEXO 8. Screening fitoquímico

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA**

FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE SCREENING FITOQUIMICO
EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE TALLOS DE ROMERO (*ROSMARINUS OFFICINALIS.L*) EN CULTIVOS DE "*Staphylococcus aureus* ESTUDIO INVITRO

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático. Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación. Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad. En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea.

Legenda: (+ +) Moderado, (+ + +) Abundante, (-) Ausente

SCREENING FITOQUIMICO				
	REACTIVO	DEMOSTRACION	IDENTIFICACION	RESULTADOS
IDENTIFICACION DE CARBOHIDRATOS	Molish	2ml extracto+ 5 gotas del Rvomolish+ 10 gotas H ₂ SO edejó en reposo	Formación de un anillo violáceo	
IDENTIFICACION DE AZUCARES	Benedict	2ml extracto + 5 gotas de reactivo, agitamos, luego llevamos a baño maría por 10 minutos.	Formación de un precipitado amarillo	
	Fehling A +Fehling B	2ml extracto + 5 gotas de Fehling A +FehlingB, agitar luego llevamos a baño maría por 10 minutos.	Formación de un precipitado anaranjado rojizo	
	Tollens	2ml extracto + 3 gotas del RvoTollens, agitamos, luego llevamos a baño maría por 10 minutos.	Formación de un espejo de plata	
IDENTIFICACION DE COMPUESTOS FENOLICOS	FeCl ₃	2ml extracto + 5 gotas del reactivo	Cambio de coloración pardo a azul	
IDENTIFICACION DE CUMARINAS	NaoH 10 %	2ml extracto + 2 gotas del reactivo	Amarillo intenso	
IDENTIFICACION DE TANINOS	Rvo Gelatina + NaCl	2ml extracto + 5 gotas del reactivo +3 gtas de NaCl 10%	coloide	
IDENTIFICACION DE SAPONINAS	H ₂ O	2ml extracto + 1ml de H ₂ O destilada agitación por 2 minutos	Forma espuma	
IDENTIFICACION DE FLAVONOIDES	Limaduras de Mg ₂	2ml extracto + limaduras de Mg ² (agitar) colocar 1º gta de HCl	Cambio de coloración a tono rojo	
IDENTIFICACION DE ALCALOIDES	Reactivo Dragendor	2ml extracto + 3 gotas del reactivo	Precipitado color anaranjado	
	Reactivo mayer	2ml extracto + 3 gotas del reactivo	Precipitado color blanco lechoso	
	Reactivo wagner	2ml extracto + 3 gotas del reactivo	Precipitado color marrón	

ANEXO 9. Screening fitoquímico

Ficha de Validación por Juicio de Expertos.



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS
Y BIOQUÍMICA

N°:

HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO
CUESTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE TALLOS DE ROMERO" (*Rosmarinus Officinalis.L*) EN CULTIVOS DE "STAPHYLOCOCCUS AUREUS" ESTUDIO INVITRO

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

- | | MENOS DE | | | | |
|--|----------|-----|-----|-----|---|
| | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 - 100 |
| 1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?..... | () | () | () | () | <input checked="" type="checkbox"/> () |
| 2. ¿En qué porcentaje considera que los items están referidas a los conceptos del tema?..... | () | () | () | () | <input checked="" type="checkbox"/> () |
| 3. ¿Qué porcentaje de los items planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?..... | () | () | () | () | <input checked="" type="checkbox"/> () |
| 4. ¿En qué porcentaje estima que los items del instrumento son de fácil comprensión?..... | () | () | () | () | <input checked="" type="checkbox"/> () |
| 5. ¿Qué porcentaje de los items considera usted que siguen una secuencia lógica?..... | () | () | () | () | <input checked="" type="checkbox"/> () |
| 6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrían datos similares si se aplicara en otras muestras?..... | () | () | () | () | <input checked="" type="checkbox"/> () |

SUGERENCIAS

1. ¿Qué items considera usted que deberían agregarse?

.....

2. ¿Qué items estima que deberían eliminarse?

.....

3. ¿Qué items considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

.....

Fecha: 28/03/18

Validado por: O.F. Teófilo Chire M.

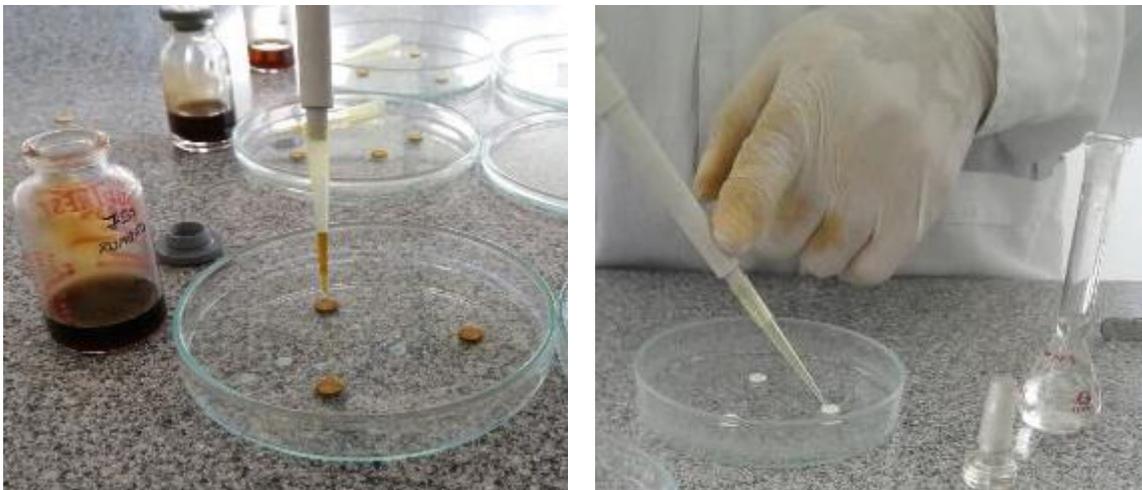
Firma:

C.O.F.: 3510

ANEXO 10. Testimonios fotográficos



a. Extracto etanólico *Rosmarinus officinalis.L* (Romero)



b. Agregando las diluciones y el control (Amoxicilina) en los discos



c. Las tres diluciones (75%, 50% y 25%) y sus respectivos discos



d. Discos con control positivo (Amoxicilina 10ug)



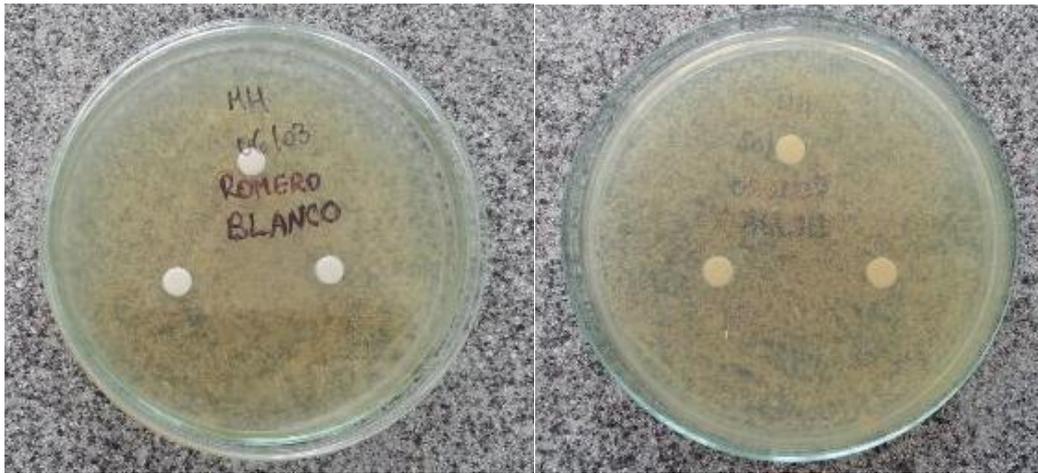
e. Agregando 100uL inóculo a la placa Mueller Hinton



f. Homogenizando el inóculo con la espátula de Drigalsky



g. Colocando los discos en la placa inoculada



h. Resultados. Blanco (alcohol 70°). No presentó inhibición. Crecimiento total



i. Resultados. Dilución 25%. Disco 1. 12.79mm; Disco 2. 10.93mm; Disco 3. 10.34mm



j. Resultados. Dilución 50%. Disco 1. 14.12mm; Disco 2. 13.83mm; Disco 3. 12.95mm



k. Resultados. Dilución 75%. Disco 1. 16.12mm; Disco 2. 15.28mm; Disco 3. 15.81mm



l. Resultados. Control (Amoxicilina 10ug). Disco 1. 47.25mm; Disco 2. 47.71mm; Disco 3. 47.11mm