



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE MEDICINA

EFFECTO ANTIBACTERIAL DEL EXTRACTO OLEOSO DE HOJAS DE
***Rosmarinus officinalis* SOBRE *Escherichia coli* ATCC25922 COMPARADO CON**
NITROFURANTOÍNA, ESTUDIO IN VITRO

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO
CIRUJANO

AUTOR:

PEDRO MARCELO ALVA JARA

ASESORES:

Mg. DAVID RENÉ RODRÍGUEZ DÍAZ

Mg. Blgo. JAIME ABELARDO POLO GAMBOA

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRANSMISIBLES

PERÚ - 2019

DEDICATORIA

Dedicado a, mi Madre, mujer a la cual amo inconmensurablemente; fuerza y apoyo en mi vida, a mi Padre que con su recuerdo me impulsa en nuevas aventuras como la que hoy está por empezar.

Pedro Marcelo

AGRADECIMIENTO

A mis asesores por ayudarme frente a mis dudas para terminar esta tesis, por brindarme su tiempo para ayudarme y alentarme a continuar y no renunciar.

A la Universidad César Vallejo, mi querida sede de estudios en donde me formé con las condiciones que hoy me caracterizan como profesional.

Pedro Marcelo

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada **“EFECTO ANTIBACTERIAL DEL EXTRACTO OLEOSO DE HOJAS DE *Rosmarinus officinalis* SOBRE Escherichia coli ATCC25922 COMPARADO CON NITROFURANTOÍNA, ESTUDIO IN VITRO”**, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para el título Profesional de Médico Cirujano.

Pedro Marcelo Alva Jara

ÍNDICE

PÁGINAS PRELIMINARES

PÁGINA DEL JURADO	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO	iii
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD	iv
PRESENTACIÓN.....	v
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	9
1.1 REALIDAD PROBLEMÁTICA	9
1.2 TRABAJOS PREVIOS	10
1.3 TEORIAS RELACIONADAS AL TEMA	11
1.4 PROBLEMA.....	14
1.5 JUSTIFICACIÓN.....	14
1.6 HIPÓTESIS:	15
1.7 OBJETIVOS.....	15
1.7.1 OBJETIVO GENERAL:.....	15
1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	16
II. MÉTODO.....	16
2.1 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:.....	16
2.2 VARIABLES Y OPERALIZACIÓN	18
2.3 POBLACIÓN Y MUESTRA	19
2.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD	20
2.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS.....	20
2.6 ASPECTOS ÉTICOS:.....	21
III. RESULTADOS	22
IV. DISCUSIÓN	26
V. CONCLUSIONES:.....	28
VI. RECOMENDACIONES	29
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
VIII. ANEXOS	35

RESUMEN

En la investigación se determinó el efecto antibacteriano del extracto oleoso del *Rosmarinus officinalis* "Romero", sobre *Escherichia coli* ATCC 25922, comparado con Nitrofurantoína 300 µg, mediante un estudio experimental in vitro, usando el método de Kirby-Bauer. Cada dilución (100%, 75%, 50% y 25%), corresponde respectivamente a 750 µL de Aceite esencial (AE), 500 µL y 250 µL, además de un control neutro con Dimetil Sulfoxido (DMSO). Se realizaron 11 mediciones acorde a cada dilución, en donde se demostró que el extracto oleoso logra halos de inhibición bacteriana sobre los cultivos de *Escherichia coli* desde una concentración mínima de 250 µL (9.90 mm, DS: 1.22 ± 3.68 , IC 95%: 9.08 – 10.72) resultados que demuestran la no eficacia del extracto oleoso a bajas concentraciones. Mientras que en concentraciones de 100%, se obtuvo una media de halo de inhibición de 19.63 mm (DS: 9.24 ± 2.78 , IC 95%: 19.01 a 20.25) entre los intervalos de 18 a 21mm y al 75%, la media del halo de inhibición es 15.90 mm (DS: 1.22 ± 3.68 , IC 95%: 15.08 a 16.72) con intervalo de 14 a 18 mm demostrando la eficacia antibacteriana del extracto oleoso, pero menor a comparación de Nitrofurantoína. El análisis estadístico ANOVA fue altamente significativo (0.000), usando el análisis Post Hoc de Tukey se demostró que a medida que aumentan las concentraciones de dilución el efecto antibacteriano aumenta. Se concluye que el extracto oleoso del *Rosmarinus officinalis* tiene efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli*, pero menor al del efecto producido por la Nitrofurantoína.

PALABRAS CLAVES: *Rosmarinus Officinalis*, Kirby-Bauer, *Escherichia coli*, extracto oleoso, cultivo.

ABSTRACT

In the research the antibacterial effect of the oil extract of *Rosmarinus officinalis* "Romero" was determined, on *Escherichia coli* ATCC 25922, compared with Nitrofurantoin 300 µg, by means of an experimental study in vitro, using the Kirby-Bauer method. Each dilution (100%, 75%, 50% and 25%) corresponds, respectively, to 750 µL of essential oil (AE), 500 µL and 250 µL, in addition to a neutral control with Dimethyl Sulfoxide (DMSO). 11 measurements were made according to each dilution, where it was demonstrated that the oily extract achieved halos of bacterial inhibition on *Escherichia coli* cultures from a minimum concentration of 250 µL (9.90 mm, DS: 1.22 ± 3.68 , 95% CI: 9.08 - 10.72) results that demonstrate the non-efficacy of the oily extract at low concentrations. While in concentrations of 100%, a mean inhibition halo of 19.63 mm was obtained (DS: 9.24 ± 2.78 , 95% CI: 19.01 to 20.25) between the intervals of 18 to 21mm and 75%, the average of the halo of inhibition is 15.90 mm (DS: 1.22 ± 3.68 , 95% CI: 15.08 to 16.72) with a range of 14 to 18 mm demonstrating the antibacterial efficacy of the oil extract, but lower compared to Nitrofurantoin. The ANOVA statistical analysis was highly significant (0.000), using the Tukey Post Hoc analysis it was shown that as the dilution concentrations increase the antibacterial effect increases. It is concluded that the oily extract of *Rosmarinus officinalis* has an antibacterial effect on *Escherichia coli*, but less than the effect produced by Nitrofurantoin.

KEY WORDS: *Rosmarinus Officinalis*, Kirby-Bauer, *Escherichia coli*, oily extract, cultivate.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 REALIDAD PROBLEMÁTICA

En la actualidad el uso de la medicina tradicional se ha vuelto muy común en varias partes del mundo, según la Organización mundial de la salud (OMS), un 80% de la población de países que se encuentran en vías de desarrollo usan algún tipo de esta, tanto por cultura o por costumbre, además de que formaron parte desde hace muchos años de nuestra variedad culinaria y que con el paso de los años se ha ido investigando diversas formas de utilizar dichos elementos en el campo de la medicina.¹

A nivel mundial la incidencia de infecciones causadas por *Escherichia coli* es de 150 millones de casos por año, siendo las vías urinarias femeninas las zonas más afectadas. En Estados Unidos se realizan al menos 7 millones de consultas por infección del tracto urinario (ITU) mientras que en el Perú la cifra es desconocida, pero es presumible que sean equiparables a las cifras de EEUU. Dentro de la población femenina, las jóvenes son las más afectadas en donde se calcula una incidencia de 0.5 a 0.7 infecciones cada año. Teniendo en cuenta lo antes mencionado se calcula que de todas las mujeres que cursan con esta patología, el 25% al 30% serán candidatas a desarrollar ITUs recurrentes que no tengan origen anatómico-estructural.²

Las ITU son de las patologías infecciosas más comunes y que conlleva una gran responsabilidad económica por parte del sistema de Salud. En los EEUU, las ITUs representan más de 7 millones de consultas anuales, en donde 2 millones son por cistitis. Así mismo el porcentaje de antibióticos destinados a tratar las ITUs representan un 15% de todos los antibióticos distribuidos a nivel mundial, con costos que sobrepasan los 1000 millones de dólares.^{2,3}

Teniendo en cuenta que en la mayor parte de casos no es necesario estudios adicionales para su diagnóstico, se establece mayor importancia a la clínica básica que este cuadro presenta, en donde tendremos un paciente con síntomas tales como disuria, polaquiuria, tenesmo o dolor suprapúbico.^{3,4} Una vez establecido el

diagnóstico clínico de esta patología se procede a plantear la mejor alternativa terapéutica, la cual consta de seleccionar el fármaco antimicrobiano apropiado, el cual representará una mejor tasa de curación, menor riesgo a reinfecciones futuras, resistencias microbianas y efectos secundarios no deseados, puesto que varios antimicrobianos también actúan sobre la flora vaginal e intestinal normal.⁵

1.2 TRABAJOS PREVIOS

Castro N (Perú, 2016), en este estudio se comparó el efecto del *Rosmarinus officinalis* sobre *Staphylococcus aureus* obteniendo una media de halo inhibitorio de 7,4 mm de diámetro con una concentración al 100% con 30 repeticiones por dicha concentración, con un nivel de significancia de 0,0001.⁶

Sanches G, et al (USA, 2014), en un total de 29198 y 32742 resultados con cepas de E. Coli entre el 2001 y 2010 obtuvieron una prevalencia de que la nitrofurantoina ha demostrado una buena actividad antimicrobiana frente a Cepas de E. Coli que adquirieron resistencia al largo de los tratamientos previos, teniendo resultados de resistencia entre 2.1 y 7.5% en cepas de E. Coli. El nivel para la significación estadística se fijó en 0,05 y entre los años 2001 y 2010 se fijó una una asociación estadística de (P, 0.0001).⁷

Warren J, et al (Canadá, 2013), en este estudio de 752 mujeres entre los años 2009 y 2011 demostraron que la nitrofurantoina frente a cepas de E. Coli demuestra baja resistencia, reportándose solo 0.5% de casos de resistencia ($p=0.01$) con un intervalo de confianza de (IC: 95).⁸

Trujillo A (Colombia, 2012), si bien es cierto que el tratamiento para la cistitis no complicada puede ser empírico, se aconseja el no emplear Amoxicilina, TMP/SMX, Acido pipemídico y cefalosporinas de primera generación debido a que tienen niveles

elevados de resistencia, en especial Amoxicilina (10-15%) lo cual modificara la eficacia de dicho fármaco contra cepas de E. Coli causantes de Cistitis aguda, se debe resaltar que el tratamiento aconsejado por esta guía es de 5 días, a diferencia de los 7 días empleados por otros estudios del mismo País.⁹

Faine B (USA, 2011), el tratamiento en pacientes con cistitis aguda no complicada con Nitrofurantoina 100 mg, 2 veces al día, durante 3 días ha demostrado igual o superior eficacia, frente al tratamiento con ciprofloxacino 250 mg, en donde se puede evidenciar una respuesta positiva frente a la resolución del cuadro infeccioso, y que durante los controles post tratamiento realizados a los 28 días después de terminado el tratamiento, se vio una menor cantidad de reinfecciones.¹⁰

Ibrahim K (USA, 2010), el efecto antibacterial fue investigado en dos cepas de bacterias gram negativas (E. coli y P. aureginosa) con aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, con un halo inhibitorio de 18 mm para E. coli con una concentración de 64 ul/ml con una desviación estándar de 2.7, mientras que con una concentración menor (32 ul/ml) se obtuvo 17 mm de halo inhibitorio.¹¹

Yomayusa N, et al (Colombia, 2003), refiere que el tratamiento no está especificado y que solo es dirigido en función a los patrones de susceptibilidad del agente microbiano que puede tener mayor prevalencia tanto por grupo etario como en la región o localidad. Pero algunos estudios indican que la resistencia hacia fármacos de primera línea como son Amoxicilina y Trimetoprim son bastantes altas (33%) versus 1 a 2% de resistencia hacia Nitrofurantoina y a Quinolonas, colocando a la Nitrofurantoina como un fármaco seguro para el tratamiento de primera línea en las ITU no complicadas.¹²

1.3 TEORIAS RELACIONADAS AL TEMA

Las infecciones agudas de las vías urinarias se clasifican en infección de vías urinarias inferiores, las cuales comprometen uretra y vejiga, e infección de las vías urinarias

superiores las cuales comprometen al riñón. La infección de uretra y vejiga son patologías en su mayoría no complicadas y que se limitan a la afectación de la mucosa que conforma el tracto urinario, la cistitis por lo general es una patología muy frecuente que se caracteriza por la infección superficial del epitelio de revestimiento de la vejiga y de los canales conductores de orina.²

Epidemiológicamente, este grupo de infecciones se pueden clasificar en hospitalarias y extrahospitalarias, las cuales pueden presentarse de manera sintomática, pero también como asintomáticas. Las infecciones extrahospitalarias son de las más frecuentes y causan más de siete millones de consultas médicas al año en país como Estados Unidos. La población más afectada es la femenina la cual se ven afectada entre 1 a 3% del total de escolares, posteriormente la presencia de esta patología aumenta de manera considerable con el inicio de las relaciones sexuales. La mayor parte de aquellas infecciones sintomáticas agudas están presentes en las jóvenes.²

La *Escherichia coli* es una enterobacteria gramnegativa de tipo anaerobia facultativa, se encuentra en humanos y animales, sobre todo en la mayor parte del tracto digestivo, es causante de la mayor parte de infecciones de vías urinarias por mucho. Esta bacteria tiene factores que contribuyen a la infección del epitelio urinario, los cuales se conforman por proteínas ubicadas en sus fimbrias o pilis, las principales proteínas implicadas son las P, I y S, que tienen funciones desde fijación y movilidad en todo el tracto urinario, lo que permite en todos los casos el ascenso de esta bacteria hasta la última porción del tracto urinario, en cuyos casos se puede lograr una infección de uretra, vejiga y riñones (uretritis, cistitis y pielonefritis).^{2, 13}

La nitrofurantoína es un fármaco antibacteriano, generalmente bacteriostático, que tiene utilidad comprobada frente a infecciones del tracto urinario, las cuales son producidas por gram negativos, aunque en algunos resultados se logró demostrar su eficacia frente a bacterias gram positivas, este fármaco se encarga de inhibir la formación de la pared celular por medio de su acción sobre el metabolismo de los carbohidratos, todo mediado por la inhibición de la acetil-coenzima A de la bacteria.^{14,}

¹⁵ Tras la administración oral de Nitrofurantoína, su absorción es rápida, y la

biodisponibilidad de este fármaco aumenta cuando es consumido con alimentos o algún otro medicamento que disminuya la rapidez del vaciado gástrico.^{15, 16}

Sus concentraciones máximas en orina son evidentes a los 30 minutos después de la dosis, mientras que en concentraciones plasmáticas se pueden evidenciar concentraciones sumamente bajas las cuales no tienen importancia como tratamiento antibacterial de origen sistémico, un 30 a 50% se une a proteínas plasmáticas, ayudando a su distribución, puede atravesar la barrera placentaria y se pueden encontrar leche materna. Cualquier afección de la función renal puede aumentar el tiempo de semivida plasmática de 20 minutos (normalmente) a 45 o más. Es metabolizado parcialmente en el hígado, pero gran parte se excreta por la orina por medio de filtración glomerular sin sufrir cambio alguno. El tratamiento con nitrofurantoína se basa en dosis de 100 mg, cada 6 horas durante 7 a 10 días o 5 – 7 mg por kilo de peso, repartidos en 4 dosis.¹⁷

El *Rosmarinus officinalis* "romero", es una planta aromática del género *Rosmarinus* propia del mediterráneo y que pertenece a la familia Lamiaceae, con forma de arbusto y que tiene tallos cortos, crece en zonas rocosas cercanas a regiones marítimas, pertenece a la familia Lamiaceae, en los extremos de sus ramas tiene hojas estrechas y pequeñas, con flores de color azul claro con manchas violáceas, llega a florecer dos veces al año y su tamaño varía hasta un metro de altura, su composición química principalmente se basa en Ácidos fenólicos, Flavonoides, Esteres terpénicos como; Alcanfor, 1,8-Cineol, β -Cariofeleno y Verbenol. El principal compuesto químico encontrado en las hojas son el Ácido rosmarínico, Rosmaricina y el Ácido carnósico.¹⁸

El Romero es una planta con grandes concentraciones de principios activos con diferentes acciones; desde antiinflamatorias, antibacterianas y antitumorales, entre otras más, teniendo acción en los diferentes órganos del cuerpo humano. Gracias a sus diferentes compuestos que contiene; de Ácido Rosmarínico, Ácido Carnósico, Carnosol, alcanfor (13.4%), 1,8-Cineol (10.1%), β -Cariofeleno (6.1%) y Verbenona (5.3%), se han podido demostrar mediante estudios in vitro el efecto antibacterial de su extracto oleoso y metanólico, los cuales principalmente actúan sobre bacterias

Gram-negativas y Gram-positivas como *Escherichia coli*, *Enterobacterias fecalis*, *Pseudomona aeruginosa* entre otras que generan inestabilidad en la pared bacteriana y su posterior permeabilidad.¹⁹

Existe un alto contenido de ácido rosmarinico y de su derivado rosmaricina, así como ácido carnosico, terpenoides, diterpenos y triterpenos que son los que confieren a esta planta su efecto antibacteriano.^{20, 21} El extracto oleoso de *Rosmarinus officinalis* tiene efecto sobre la membrana bacteriana, teniendo efecto citotóxico sobre esta, afectando directamente la fase mitótica de las bacterias Gram negativas y positivas entre las que destacan *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *S. aureus* y *Listeria monocytogenes*.²²

Fue usado desde tiempos antiguos por ser del conocimiento de los pobladores sobre sus efectos medicinales, cuenta con cuarenta principios activos y más de veinte principios antivíricos por lo que puede ayudar a enfrentar infecciones respiratorias o intestinales, crece en la costa, sierra y selva peruana hasta 3,500 m.s.n.m. Ha mostrado evidencia de su efecto inhibitorio en cepas cultivadas de *Escherichia coli*, mediante estudios de laboratorio controlados, pero que mayormente provienen de la experiencia y cultura. Su aceite esencial se obtuvo por primera vez mediante destilación en el año 1330 por investigación de Ramón Llull.^{23, 24}

1.4 PROBLEMA

¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto oleoso de la hoja del *Rosmarinus officinalis* "Romero" sobre cepas de *Escherichia coli* comparado con el efecto de la Nitrofurantoína?

1.5 JUSTIFICACIÓN

Las infecciones causadas por las distintas cepas de *Escherichia coli* forman parte de una gran demanda en el medio de salud y generan mayor repercusión en la salud de

mujeres que, las cuales son un grupo etario que padece frecuentemente de infección del tracto urinario con tendencia a exacerbarse debido a factores del huésped.

En la actualidad se realizan diferentes estudios para encontrar mejores alternativas que sean rentables y eficaces contra bacterias como *Escherichia coli*, teniendo en cuenta el nuevo impacto que se le está dando a la medicina alternativa en base a productos herbales, siendo su aplicación una ventaja positiva que gracias los diferentes estudios que se realizan en nuestros tiempos, y que, gracias a la aceptación por parte del personal médico, ayuda a reducir los grandes gastos por parte de las entidades sanitarias, dando una alternativa natural para el manejo de este agente bacteriano, siendo de menor costo y demostrando mayor eficacia en estudios previos, comparado a diferentes antibióticos sintéticos ya estudiados a fondo. Si el estudio demostrara la utilidad del extracto oleoso del *Rosmarinus officinalis* frente a una bacteria que se diferencia en más de 20 géneros y hasta en 120 especies, que tienen principal impacto en enfermedades digestivas y urinarias, abriría una nueva oportunidad en la terapéutica para el manejo de enfermedades producidas por bacterias como *Escherichia Coli*, con bajos costos y menor repercusión en la salud de los pacientes.

1.6 HIPÓTESIS:

H₁: El extracto oleoso de la hoja del *Rosmarinus officinalis* "Romero" tiene efecto antibacteriano in vitro sobre cepas de *Escherichia coli* comparado con Nitrofurantoína.

H₀: El extracto oleoso de la hoja del *Rosmarinus officinalis* "Romero" no tiene efecto antibacteriano in vitro sobre cepas de *Escherichia coli* comparado con Nitrofurantoína.

1.7 OBJETIVOS

1.7.1 OBJETIVO GENERAL:

Identificar el efecto antibacteriano in vitro del extracto oleoso de la hoja del *Rosmarinus officinalis* "Romero" que tiene sobre cepas de *Escherichia coli* comparado con Nitrofurantoína.

1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar el efecto antibacteriano in vitro del extracto oleoso de la hoja del *Rosmarinus officinalis* "Romero" al 100%.
- Identificar el efecto antibacteriano in vitro del extracto oleoso de la hoja del *Rosmarinus officinalis* "Romero" al 75%.
- Identificar el efecto antibacteriano in vitro del extracto oleoso de la hoja del *Rosmarinus officinalis* "Romero" al 50%.
- Identificar el efecto antibacteriano in vitro del extracto oleoso de la hoja del *Rosmarinus officinalis* "Romero" al 25%.
- Identificar el efecto antibacteriano in vitro de la Nitrofurantoína a 300 µg sobre cepas de *Escherichia coli*.

II. MÉTODO

2.1 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPO DE INVESTIGACIÓN:

TIPO DE INVESTIGACIÓN: Básico

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN: Experimental con repeticiones múltiples, post prueba

RG₁	X₁	O₁
RG₂	X₂	O₂
RG₃	X₃	O₃
RG₄	X₄	O₄
RG₅	X₅	O₅
RG₆	X₆	O₆

Donde:

RG₁₋₆: Grupos de estudio

X₁: Dilución de la hoja del *Rosmarinus officinalis* "Romero" al 25% (250mg/ml)

X₂: Dilución de la hoja del *Rosmarinus officinalis* "Romero" al 50% (500mg/ml)

X₃: Dilución de la hoja del *Rosmarinus officinalis* "Romero" al 75% (750mg/ml)

X₄: Dilución de la hoja del *Rosmarinus officinalis* "Romero" al 100% (1000mg/ml)

X₅: Control positivo: Nitrofurantoína 300 µg

X₆: Control negativo: Dimetil sulfoxido (DMSO)

O₁₋₆: Las observaciones del diámetro del halo de inhibición

2.2 VARIABLES Y OPERALIZACIÓN

VARIABLE INDEPENDIENTE: Agente antibacteriano.

- **Agente antimicrobiano no farmacológico:** Extracto oleoso de la hoja del *Rosmarinus officinalis* "Romero"
- **Agente antimicrobiano farmacológico:** Nitrofurantoína 300 µg

VARIABLE DEPENDIENTE: Efecto antibacteriano.

- **Si efecto antimicrobiano:** aumento del halo ≥ 17 mm
- **No efecto antimicrobiano:** disminución del halo < 17 mm

OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES:

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
Variable independiente: Agente antibacteriano para cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Tratamiento no farmacológico: Extracto oleoso de <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero). ²⁵ Tratamiento farmacológico: Nitrofurantoína. ²⁶	La Oleorresina de <i>Capsicum pubescens</i> será dividida en las siguientes diluciones: a. 100 % b. 75 % c. 50 % d. 25 % e. Nitrofurantoína µg f. DMSO	RG1 RG2 RG3 RG4 RG5 RG6	Cualitativa Nominal
Variable dependiente: Efecto antibacteriano del extracto oleoso de la hoja del <i>Rosmarinus officinalis</i> .	Efecto antibacteriano del extracto oleoso de <i>Rosmarinus officinalis</i> determinado por el método de Kirby Bauere. ²⁶	Según Kirby Bauer, se consideró:²⁶ a) Sensible: ≥ 17 mm b) Intermedio: 15-16 mm c) Resistente: ≤ 14 mm	Si efecto antimicrobiano: ≥ 17 mm No efecto antimicrobiano: < 17 mm	Cualitativa Nominal

2.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

POBLACIÓN: Estuvo constituido por el grupo de placas petri con el cultivo de cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, en el Laboratorio de La Universidad Cesar Vallejo de Trujillo.

MUESTRA:

Tamaño muestra: La muestra estuvo conformada por 66 unidades muestréales que corresponde: 1 planta de *Rosmarinus officinalis* "Romero"; 2 extracto oleoso de la hoja; en concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%) + Nitrofurantoina (control positivo) + agua destilada (control negativo); 3 cepas del *Escherichia coli* y 11 repeticiones por cada cepa de *Escherichia coli*.²⁷ **(Ver Anexo 01).**

Unidad de análisis: Cada uno de los cultivos de cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922

Unidad de muestra: Cada placa Petri con cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Muestreo: Fue aleatorio simple en cada grupo de observación.

CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Criterios de inclusión:

- Placas petri con cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 viables.
- Placas petro con cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 cultivadas de 18 – 24 horas.

Criterios de exclusión:

- Placas contaminadas con otros microorganismos (distintas bacterias a la utilizada u hongos).
- Placas con cepas de *Escherichia coli* de baja actividad para formar unidades formadoras de colonias.
- Placas con cepas de *Escherichia coli*, cultivadas en mayor tiempo a 24 horas.

2.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD

LA TÉCNICA: La técnica usada para la recolección de datos fue mediante observación directa de los halos de inhibición en los cultivos de las placas Petri.^{28, 29}

PROCEDIMIENTO: En el estudio se siguieron los siguientes pasos: **(Ver Anexo 02)**

- a) La planta fue identificada taxonómicamente por el Herbario Antenor Orrego (HAO).
- b) Se obtuvo el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* “romero” mediante la técnica de arrastre de vapor de agua.³⁰
- c) Se utilizó el medio de cultivo agar Muller-Hinton, para el cultivo de la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, en la prueba de susceptibilidad, de acuerdo con el Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión.²⁹
- d) Se evaluó la susceptibilidad antibacteriana siguiendo las normas y procedimientos establecidos en los estándares M100-S25, M02 A12 y M100S del CLSI.^{31, 32, 33}

INSTRUMENTO: El instrumento que se utilizó fue una guía de observación, que tuvo como finalidad recopilar los resultados que se obtuvieron en el laboratorio; la misma que por sus características no requiere ser validado. El instrumento para la recolección de datos de los halos de inhibición estuvo conformado por una regla milimetrada o calibrador vernier; obteniéndose unas medidas que se registraron en un cuadro de base de datos. **(Ver Anexo 03).**

VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

El instrumento fue validado por opinión de tres profesionales médico y biólogo, quienes analizaron que los ítems considerados en la ficha de recolección de datos permiten el adecuado registro de los datos obtenidos durante el estudio. **(Ver Anexo 04).**

MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS

La información de la recolección de datos, será ingresada en la base de datos en el programa estadístico SPSS-25.0 con tabulación automatizada, la información será presentada en las tablas y gráficos de cajas y bigote.

Para el análisis de los datos obtenidos se aplicarán las estadísticas descriptivas: como promedios, media, desviación estándar en los casos que corresponda. Desarrollaran el ANOVA por bloques luego se realizará pruebas de comparación múltiple con pruebas Post Hoc de Tukey. Para determinar la dilución que presente mayor efecto.

2.5 ASPECTOS ÉTICOS:

En el presente estudio se tomó en cuenta las normativas aplicadas a nivel nacional e internacional del código de ética profesional para la práctica de procedimientos in vitro dadas en Helsinki³⁴ y en el Colegio Médico del Perú.³⁵ **(Ver Anexo 06).**

Para el desarrollo de un trabajo de investigación de carácter médico, se prestó atención a los factores que son potencial a causar daño en el medio ambiente y el personal, los cuales son los materiales inflamables y desechos orgánicos del producto, los cuales se tuvo en cuenta la manipulación y manejo de los desechos de las muestras con las cepas de *Escherichia coli*, de acuerdo al manual de seguridad en laboratorios de microbiología médica.^{36, 37} **(Ver Anexo 05).**

III. RESULTADOS

TABLA 01: Eficacia antibacteriana del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 comparado con Nitrofurantoína, 300 µg en un estudio in vitro.

Diámetro del halo de inhibición								
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
R. officinalis 25%	11	9.909	1.2210	.3682	9.089	10.729	8.0	12.0
R. officinalis 50%	11	13.364	.6742	.2033	12.911	13.817	12.0	14.0
R. officinalis 75%	11	15.909	1.2210	.3682	15.089	16.729	14.0	18.0
R. officinalis 100%	11	19.636	.9244	.2787	19.015	20.257	18.0	21.0
Nitrofurantoína 100mg	11	25.364	.8090	.2439	24.820	25.907	24.0	27.0

Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver. 25

TABLA 02: Eficacia antibacteriana del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 comparado con Nitrofurantoína, 300 µg en un estudio in vitro.

Análisis de varianza (ANOVA)					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1556,073	4	389,018	393,309	,000
Dentro de grupos	49,455	50	,989		

P: 0.000. Altamente significativo

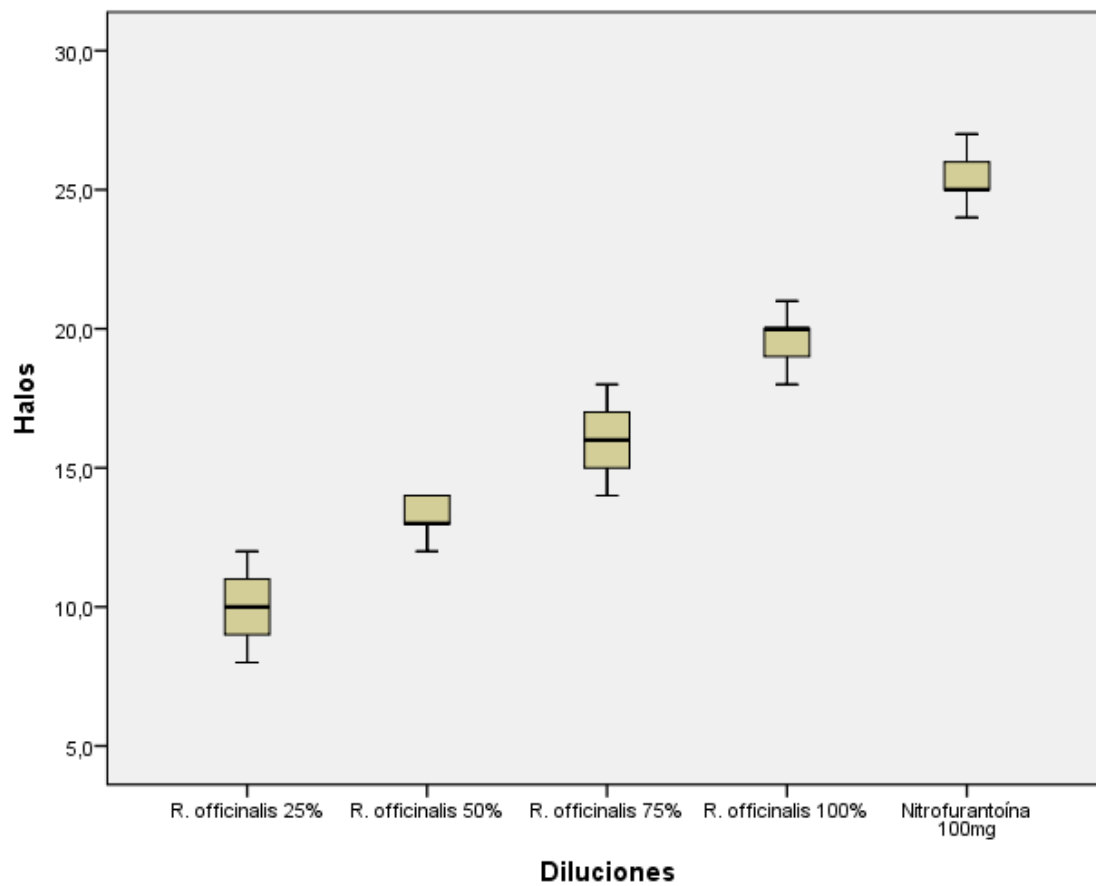
Fuente: Reporte de resultados SPSS Ver. 25

TABLA 03: Eficacia antibacteriana del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 comparado con Nitrofurantoína, 300 µg en un estudio in vitro.

PRUEBAS POST HOC DE TUKEY

		Efectos				
		HSD Tukey ^a				
Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
R. officinalis 25%	21	9,909				
R. officinalis 50%	21		13,364			
R. officinalis 75%	21			15,909		
R. officinalis 100%	21				19,636	
Nitrofurantoína 300µg	21					25,364
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 = 21,000.						

Fuente: Reporte de resultados SPSS versión 25



Fuente: Reporte de resultados SPSS versión 25

GRÁFICO 01: Eficacia antibacteriana del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 comparado con Nitrofurantoina, 300 µg en un estudio in vitro.

IV. DISCUSIÓN

Con el objetivo de evaluar el efecto antibacteriano del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 comparado con Nitrofurantoína 300µg, se desarrolló el presente estudio experimental in vitro. Para lo cual se hizo la obtención del aceite esencial de la *Rosmarinus officinalis*, en diluciones del 100%, 75%, 50% y 25%, para luego realizar una comparación con Nitrofurantoina 300µg y un control negativo con Dimetilsulfóxido (DMSO).

En la Tabla N° 1 podemos observar la media de los halos de inhibición según las diferentes diluciones del aceite esencial de la planta y el control positivo de la Nitrofurantoína; se observa inhibición bacteriana en todas las concentraciones del aceite esencial, con mayor eficacia a una concentración de 100%, una media de halo de inhibición de 19.63 (DS: 9.24 ± 2.78), IC 95% (19.01 a 20.25) entre los intervalos de 18 a 21mm. Al 75%, la media del halo de inhibición es 15.90 mm (DS: 1.22 ± 3.68), IC 95% (15.08 a 16.72) con intervalo de 14 a 18 mm; siendo las concentraciones de 50 y 25% las que obtuvieron un menor halo de inhibición.

En el análisis de varianza ANOVA Tabla N° 02 evidencia que los resultados encontrados fueron altamente significativos para el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* y en la prueba de homogeneidad de Tukey, Tabla N°03, se puede observar que los grupos en estudio fueron homogéneos; que a mayor concentración del aceite esencial mayor halo de inhibición, pero no superan el efecto antibacteriano de la Nitrofurantoína.

En el gráfico 1 se visualiza las medias, en donde las concentraciones del aceite esencial al 75 y 100%, son eficaces, aunque no tienen mayor halo de inhibición que la Nitrofurantoína.

Los estudios realizados con el *Rosmarinus officinalis* son varios y podemos comparar los resultados de Castro Y.¹⁰ estudio el efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* usando 30 repeticiones por cada dilución %(25, 50, 75 y 100%) respectivamente en donde la

concentración al 100% obtuvo una media de halo inhibitorio de 7,4 mm con una desviación estándar de 0.6074, en cuya comparación con el resto de diluciones con al 75% con un halo de 8,0mm y una desviación estándar de 0.7397, y de 7,4mm y 6,7mm para diluciones de 50% y 25% respectivamente, dando una diferencia estadística significativa con un $p < 0,0001$, mientras que Ibrahim K.¹⁶ quien evaluó el efecto del extracto oleoso del *Rosmarinus officinalis* sobre bacterias gram negativas como son las cepas de *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, obtuvo un halo de inhibición de 19 mm, usando una concentración de 64 $\mu\text{l/ml}$ de aceite esencial, mientras que con *P. aeruginosa* se obtuvo un halo de 18 mm con la misma concentración.

Finalmente se considera que los resultados de los distintos estudios varían según el agente bacteriano, el lugar en donde se cultiva y según el tipo de sustancia utilizada para realizar cada experimento, pues el romero presenta diversas formas de uso como en presentación de extracto acuoso, etanólico y en aceite esencial utilizado en sus distintas formas con múltiples finalidades en la medicina alternativa

V. CONCLUSIONES:

- El aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* "romero" a concentraciones altas, evidenció efecto antibacteriano.
- El efecto antibacteriano del aceite esencial de la hoja de *Rosmarinus officinalis* "romero" no supera en efecto antibacteriano a la Nitrofurantoína.
- A la dilución del 100% se obtuvo un halo de inhibición de 19.5 mm.
- A la dilución de 75% se obtuvo un halo de inhibición de 15.8 mm.
- A la dilución del 50% se obtuvo un halo de inhibición de 13.3 mm.
- A la dilución del 25% se obtuvo un halo de inhibición de 9.9 mm.
- La Nitrofurantoína tuvo un halo de inhibición de 25.4 mm, mayor que las concentraciones del aceite esencial de la hoja de romero al 75% y 100%.

VI. RECOMENDACIONES

1. Continuar el estudio con otras bacterias Gram negativas y Gram positivas, hongos y parásitos.
2. Realizar estudios como tratamiento coadyuvante con otros medicamentos antibacterianos o antimicóticos para evaluar si potencia sus acciones farmacológicas antibacterianas o antimicóticas.
3. Realizar otro tipo de preparados de *Rosmarinus officinalis* como extracto acuoso y metanólico para determinar su efectividad, sobre agentes patógenos.
4. Realizar estudios experimentales con roedores para evaluar el efecto antibacteriano en seres vivos, efectos adversos, dosis mínima inhibitoria.
5. Estudiar los demás beneficios del *Rosmarinus officinalis*, como analgésico y antitumoral.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dipierri J. Impacto E Integración Entre La Medicina Alternativa Y La Convencional. Cuadernos de la Facultad de Humanidades y Ciencias Sociales - Universidad Nacional de Jujuy. 2004;(22):241-263. [Citado: 24 abril 2017]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=18502217>.
2. T. R. Harrison, W. R. Resnick, M. M. Wintrobe, G. W. Thorn. Editores. Principios de Medicina Interna. 18ª edición. México: Mc Graw Hill; 2012.
3. E. Martínez, J. Osorio, J. Delgado, G. Esparzad, G. Motoae, V.M. Blancoe, et al. Infecciones del tracto urinario bajo en adultos y embarazadas: consenso para el manejo empírico. IBRO Rep. 2013: 1-14. [Citado: 24 abril 2017]; Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/inf/v17n3/v17n3a02.pdf>.
4. Elgueta L, Bases de la Medicina Clínica, Infección urinaria. Chile. [Citado: 20 enero 2017]; Disponible en: http://www.basesmedicina.cl/nefrologia/12_15_infec_urinaria/contenidos.htm.
5. Echevarría. Z. J, Sarmiento. A. E, Osore. P. F. Infección del Tracto Urinario y Manejo Antibiótico. Rev Peru Med 2006: 26-31. [Citado: 20 enero 2017]; Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/acta_medica/2006_n1/pdf/a06.pdf.
6. Castro Negreiros Y. Eficacia Antibacteriana de los aceites esenciales de *Mentha piperita* "menta" y *Rosmarinus officinalis* "romero", sobre *Staphylococcus aureus*, estudio *in vitro*. [Tesis para obtener el título de Médico Cirujano]. Trujillo: Universidad Cesar Vallejo; 2016. . [Citado: 28 mayo 2017]. Disponible en: http://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/UCV/553/castro_ny.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
7. Sanchez G., Baird A., Karlowsky J., Master R., Bordón J. Nitrofurantoin retains antimicrobial activity against multidrug-resistant urinary Escherichia coli from US outpatients. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2014 [Citado: 20 octubre 2017]; 69: 3259-3262. Disponible en: https://oup.silverchair-cdn.com/oup/backfile/Content_public/Journal/jac/69/12/10.1093_jac_dku282/1/dku282.pdf?Expires=1498082696&Signature=QC3nD5JBO-~jf0jnjdKlZtY7SOjN3Qw5f4yuCrmWdOCOF4UOBYNan-wBPM~hMsTGVomYpmgYc7f30ijWFEp-

[IJXsq2ectKCB9c8ijsIpAOSBgg9YwnENJbrurI54uxiv6cSgMJLJBupYl6WFp0oYNvRdM
rnCmgNZGxyAzqRLr~YBW58eLvSHV2Jm60Zg9YgOvsPQZhBJcd-
wd78Veyci~4rurs~FzdAG78DeagunRm6N~M17R2VCOyFyj8sQRiH~PjAlO3rmLGAO
c~iE7ZPfTh3AzXjAZpP8NqRpKpFb2nwnz5NOIEpeSBIGQNr62xGxfwD7e3cs73f9Phf
bt639-w &Key-Pair-Id=APKAIUCZBIA4LVPVW3Q.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3852451/)

8. Warren J, Moineddin R, Meaney C, Mazzulli T. Antibiotic-resistant Escherichia Coli in women with acute cystitis in Canada. 2013 [Citado: 25 noviembre 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3852451/>.
9. Trujillo A. Guía de Manejo Infección Urinaria. Carmen Emilia Ospina 2012; 1-22, Colombia. [Citado: 25 noviembre 2018]. Disponible en: <https://worldwidescience.org/topicpages/i/infecciones+urinarias+extrahospitalarias.html>.
10. Faine B, Bell G, Denning G. Addressing Antibiotic Resistance: A Randomized, Controlled Trial Comparing Short-Course Nitrofurantion versus Ciprofloxacin for the Treatment of Acute Uncomplicated Cystitis. 2011 [Citado: 27 noviembre 2017]; 58 (49). disponible en: [http://www.annemergmed.com/article/S0196-0644\(11\)00854-7/pdf](http://www.annemergmed.com/article/S0196-0644(11)00854-7/pdf).
11. Ibrahim, K. (2010). Antimicrobial Activity of Rosemary (Rosmarinus Officinalis) Leaf Essential Oils Against Three Bacterial Species. Al- Mustansiriya, 2(4), p.6. [Citado: 25 noviembre 2017]; Disponible en: <https://www.iasj.net/iasj?func=fulltext&aid=77503>.
12. Yomayusa N. y Altahona H. 2003. Infección de la vía urinaria inferior. Capítulo XXII. 1176-1184. Guías para el manejo de urgencias, Bogotá. [Citado: 25 noviembre 2017]; Disponible en: [http://acceso.siweb.es/content/980129/Infeccion de la via urinaria inferior.pdf](http://acceso.siweb.es/content/980129/Infeccion%20de%20la%20via%20urinaria%20inferior.pdf).
13. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research. Tract Infections: Developing Drugs for Treatment Guidance for Industry. CDER. 2018; [Citado: 20 octubre 2018]; 3(2):3-10; Disponible en: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070981.pdf>.

14. Miyahira J. Urinary tract infection. 2016 [Citado: 20 octubre 2017]; 27 (3). [Citado: 20 octubre 2017]; Disponible en: <http://www.upch.edu.pe/vrinve/dugic/revistas/index.php/RMH/index>.
15. Avedaño L, García P, Rodríguez M, Díaz C, Ríos J, Peláez S. Nefrología Clínica. 3ª edición. España: Editorial Medica Panamericana, S, A.; 2008. [Citado: 20 octubre 2017], Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=LfvX3WgYsNIC&pg=PA537&lpg=PA537&dq=tratamiento+de+la+cistitis+aguda+con+nitrofurantoina&source=bl&ots=hvylFLV7mC&sig=hPF4XCrcH_h2X9ExK0iSfi7lWk&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjj_K2wqNHPAhVEqB4KHdqTAN0Q6AEISDAH#v=onepage&q=tratamiento%20de%20la%20cistitis%20aguda%20con%20nitrofurantoina&f=false.
16. Grave. M, Akerlund. T, Botto. H, Gek. M, Naber. K.G, Tenke. P, Wagenlehner. Guía Clínica sobre las Infecciones Urológicas. Eur Urol. 2010 abr; (8): 1290-1423. [Citado: 20 enero 2017]; Disponible en: http://www.aeu.es/UserFiles/17-GUIA_CLINICA_SOBRE_LAS_INFECCIONES_UROLOGICAS.pdf.
17. Cuervo I. Tratamiento de infecciones en el tracto urinario no complicado en adultos. Tribuna Médica 2010 [Citado: 25 noviembre 2018] 1-18. Disponible en: https://issuu.com/innovar_virtual/docs/guia_de_manejo_para_la_infeccion
18. Avila, R., Navarro, A. and Vera, O. (2011). *Romero (Rosmarinus officinalis L.): una revisión de sus usos no culinarios*. Bioquímico. Universidad Autónoma de Puebla. Disponible en: <http://www.umar.mx/revistas/43/0430103.pdf>.
19. Curtiss W, Giese N, Varghese M, et al. An Evidence-Based Systematic Review of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) by the Natural Standard Research Collaboration. *J Diet Suppl*. 2010; 7(4):351-413. doi:10.3109/19390211.2010.525049. [Citado: 24 abril 2017]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22432564?fbclid=IwAR10-vOPN6dx38Bs4nKvjTVGyh7PLLvxSkNmRTTp1CWfXNVhLjA3pJ1_VI.
20. Hernández R, Gally M. Plantas medicinales. Colombia: editorial Pax México, 1981
21. Romero (*rosmatinus officinalis*) información para usuarios y pacientes. Disponible en: <http://www.medizzine.com/plantas2/romero.php>.

22. Estrada S. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de romero y tomillo. 2010.
23. Arteche A, Vanaclocha B, Güenechea J. Fitoterapia 3ra ed. Vademécum de prescripción. Plantas medicinales. Barcelona: Masson; 1998.
24. Bruneton J. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2da ed. Editorial Acribia. 2001.
25. Aníbal, J. (2017). Evaluación del efecto bacteriano del extracto de romero (*Rosmarinus officinalis*) in vitro en cepa certificada de *Escherichia coli*. Licenciatura. Universidad Técnica de Ambato. Disponible en: <http://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/25103/1/Tesis%2081%20Medicina%20Veterinaria%20y%20Zootecnia%20-CD%20472.pdf>.
26. Pedrique Magaly, Determinación de la sensibilidad de las bacterias a los antibioticos (antibiograma).2002:1-9 (consultado el 11 de mayo del 2017) Disponible en: http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Antibiograma.pdf.
27. Alvitres, V. 2000. Método científico. Planificación de la investigación. 2da Edición. Editorial Ciencia. Chiclayo-Perú. 2000. Pag. 158 – 205. Dawson B., Trapp R. Bioestadística Médica. 3 ed. México: El Manual Moderno; 2002. [Citado: 15 junio 2017].
28. Picazo, J. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica. 11th ed. [ebook] Barcelona: Juan Picazo, p.12. [Citado: 25 noviembre 2017]; Disponible en: http://coesant-seimc.org/documents/M%C3%A9todosEspeciales_Sensibilidad.pdf.
29. Peredo H. Palou E. López A. Aceites esenciales método de extracción. Temas selectos de ingeniería de alimentos. Journal plant. 2009 3-1. p24-32. [Citado: 22 mayo 2018]. Disponible en: [http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](http://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf).
30. Ministerio de Salud del Perú. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2002. [Citado: 25 mayo 2018].Disponible en: http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/1/manua_l%20sensibilidad.pdf.

31. Patel J, Cockerill F, Bradford P, Eliopoulos G, Hindler J, Jenkins G et al .Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014. [Citado: 22 mayo 2018]. Disponible en: <http://www.medsci.cn/webeditor/uploadfile/201505/20150518150013313.pdf>.
32. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard–Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015 [Citado: 22 mayo 2018]. Disponible en: https://clsi.org/media/1631/m02a12_sample.pdf.
33. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 26th ed. CLSI Supplement M100S. 19087 USA, 2016. [Citado: 25 mayo 2017]. Disponible en: <http://ljsx.cqrmhospital.com/upfiles/201601/20160112155335884.pdf>.
34. Williams JR. The declaration of Helsinki and public Health. Buelletin of the Wordl Health Organization [internet] 2008 [consultado el 12 de nobiembre2016]; 86:650-651. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2649471/>.
35. Colegio Médico del Perú. Código de Ética y Deontología. Lima [Perú]: CMP; 2007. [Citado: 28 mayo 2017]. Disponible en: http://cmp.org.pe/wp-content/uploads/2016/05/ley_creacion_cmp.pdf.
36. OMS, Manual de Bioseguridad en el Laboratorio ,Ginebra .2005:1-223 (consultado el 27 de mayo del 2017) Disponible en: http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguidad_laboratorio.pdf.
37. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. 3°ed. Ginebra, Suiza. Biblioteca OMS [Internet]. www1.paho.org. 2013 [Citado: 28 mayo 2018]. Disponible en: http://www1.paho.org/spanish/ad/ths/ev/lab-biosafety_omsspa.pdf?ua=1.

VIII. ANEXOS

ANEXO 01

Fórmula del tamaño de muestra

Fórmula

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2\delta^2}{(x_1 - x_2)^2}$$

Siendo:

N = el número de Placas

$Z_{\alpha/2} = 1.96$

$Z_{\beta} = 0.84$

$X_1 = 20$, Diámetro del halo de inhibición de la Nitrofurantoina. ²⁶

$X_2 = 18$, Diámetro halo de inhibición del Aceite Esencial de *Rosmarinus officinalis* "romero".²⁵

$\delta = \text{Desviación estándar estimada} = 2,7\text{mm}$

$N = \frac{(1,96 + 0,842)^2 2(2,7)}{(20 - 18)^2}$

$$(20 - 18)^2$$

$n = 10.584$ (Número de Placas mínimas)

$n = 11$

Repeticiones (6): $11 \times 6 = 66$

ANEXO 02

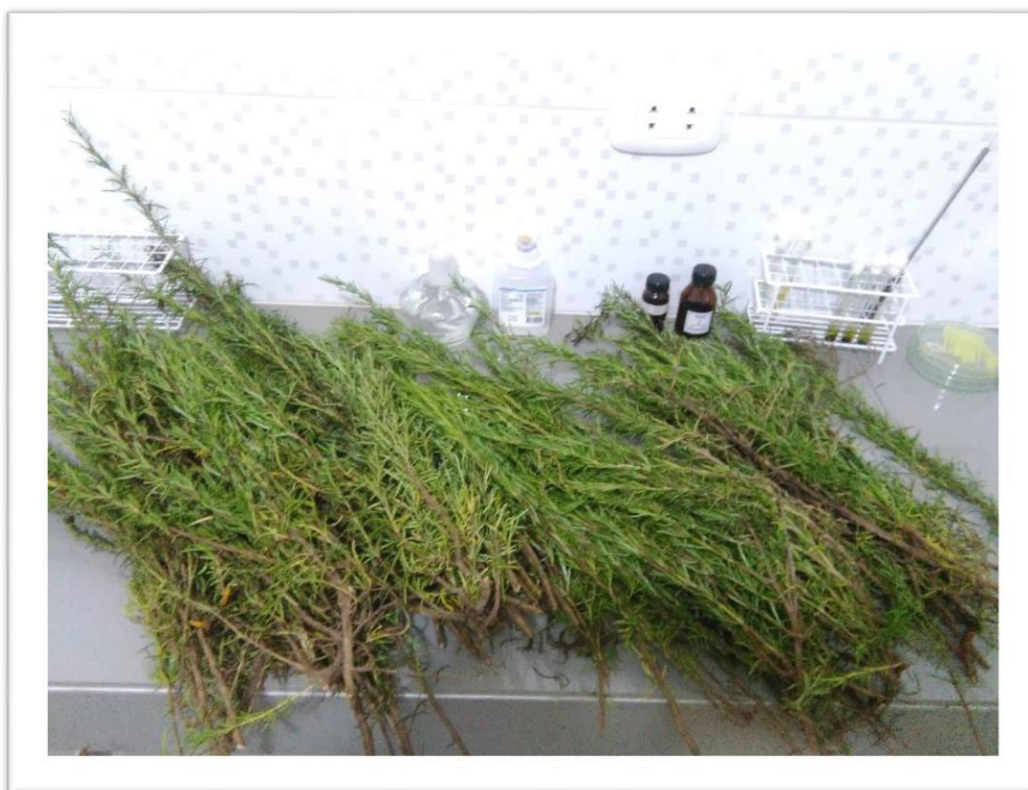
A) IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DEL *Rosmarinus officinalis*



B) OBTENCIÓN DEL EXTRACTO OLEOSO DEL *Rosmarinus officinalis* “romero” POR EL MÉTODO DE ARRASTRE DE VAPOR DE AGUA

Tratamiento de la muestra

Las plantas frescas de *Rosmarinus officinalis* “romero”, procedente de la provincia de Sánchez Carrión, Huamachuco, en una cantidad de 6 Kg aproximadamente, se llevaron al laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo de Trujillo, en donde se procedió a escoger las hojas con buenas condiciones; para obtener la “muestra óptima” (MO). La MO se lavó con agua destilada clorada y se llevó a un horno con temperaturas de entre 40-45°C durante 3-4 días para deshidratarla. Después, se trituraron las hojas secas hasta obtener partículas más pequeñas para luego ser almacenadas herméticamente en bolsas negras. Considerando a eso como “muestra seca” (MS).



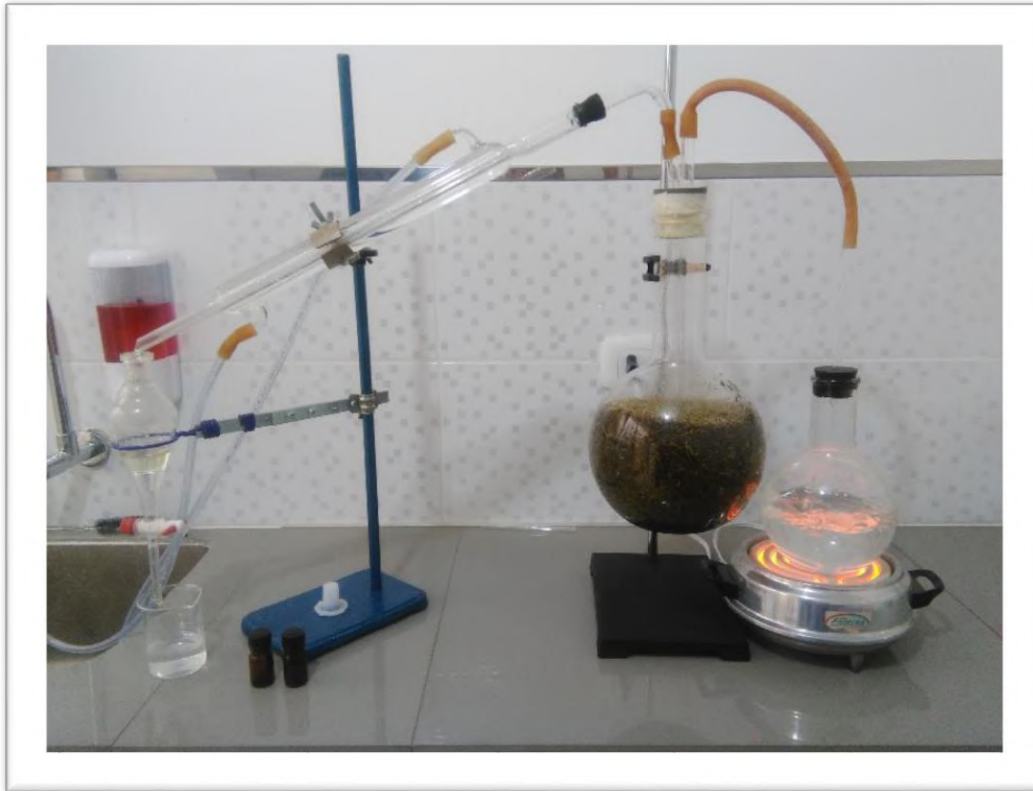
HOJAS FRESCAS de *Rosmarinus officinalis*
“romero”



Colocación en horno de las hojas de *Rosmarinus officinalis* "romero"

Obtención del Aceite Esencial

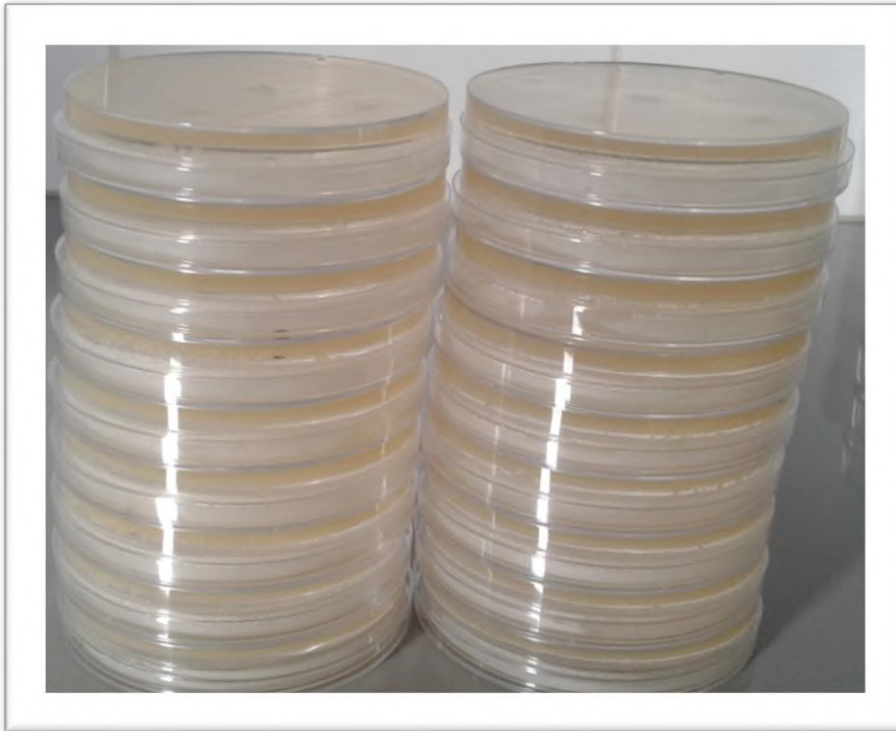
El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* "cedrón" se obtuvo por el método de arrastre de vapor de agua; para ello, en un balón de 2 L se colocó 1,5 L de agua destilada y en un balón de 4 L se colocó la MS hasta que llenó las 3/4 partes del balón. Ambos balones se taparon herméticamente y estuvieron conectados a través de un ducto. Al mismo tiempo el balón con la muestra estuvo conectado a un condensador recto (refrigerante), el cual desembocó en un embudo decantador tipo pera. De tal modo que, el Balón con agua se calentó con una cocina eléctrica y el vapor de agua pasó a través del ducto hacia el Balón con la MS y arrastró los componentes fitoquímicos (incluido los lípidos). Este vapor se condujo hacia el condensador en donde se convirtió en líquido que fue recepcionado por el decantador tipo pera. Este líquido se disoció en dos fases, quedando el aceite en la superficie por diferencia de densidades. Este proceso se realizó en 2 horas. De este modo, se obtuvo el Extracto oleoso (EO) considerado al 100%; el cual se colocó en un frasco de vidrio ámbar y se reservó a 4°C para su posterior utilización.



DESTILACION DEL ACEITE POR ARRASTRE DE
VAPOR DE AGUA

B) PREPARACIÓN DEL CULTIVO

El agar Mueller-Hinton es un medio de cultivo que se utiliza para el cultivo de varias bacterias. Se preparó suficiente medio para 10 placas Petri. Para ello, se agregó 200 ml de agua destilada en un matraz y se le adicionó 13 g de agar Mueller-Hinton (deshidratado granulada) marca Merck. Este medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se sirvió en Placas Petri estériles de plástico desechables, 18-20 ml por cada placa, y se dejó reposar hasta que solidificó completamente.



PLACAS PETRI CON MEDIO DE CULTIVO

C) PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD – DISCO DIFUSIÓN EN AGAR

Se evaluó utilizando el método de Kirby-Bauer de disco difusión en agar. Para ello, se consideró los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI de Estados Unidos de América. Se tomó en cuenta los estándares M02-A12 y M100.

1) Preparación del inóculo

El inóculo se preparó colocando 3-4 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota del microorganismo *Escherichia coli*, cultivado hace 18-20 horas, de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 0,5 de la escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml). Imágenes 1 y 2

2) Siembra del microorganismo

Se sembró el microorganismo *Escherichia coli*, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándolo sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie. Imagen 3

3) Preparación de las concentraciones del Extracto Oleoso (EO)

A partir del EO, se prepararon 4 concentraciones (100%, 75%, 50% y 25%) utilizando como solvente Dimetil Sulfoxido (DMSO); para ello, se rotularon 4 tubos de ensayo de 13x100mm estériles con las 4 concentraciones y se colocó 750 μ L de EO y 250 μ L de DMSO al tubo de 75%, 500 μ L de AE y 500 μ L de DMSO al tubo de 50%, y 250 μ L de AE y 750 μ L de DMSO al tubo de 25%. Imagen 4 y 5

4) Preparación de los discos de sensibilidad con EO

A partir de cada una de las concentraciones, se colocó 10 μ L en cada disco de papel filtro Whatman N° 1 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Se tomó 10 μ L de EO al 25% y se colocó en un disco, 10 μ L de EO al 50% en otro disco, 10 μ L de EO al 75% en otro disco y 10 μ L de EO al 100% en otro disco. Esto se repitió por 10 veces. Imagen 6

5) Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano

Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con EO, y se colocaron en la superficie del agar sembrado con el microorganismo *Escherichia coli*, de tal modo que quedaron los discos (uno de cada concentración) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Adicionalmente, se colocó el disco con Nitrofurantoina (control positivo). Se dejaron en reposo por 15 min y después las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 18-20 horas. Imagen 7

- 6) La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta medición se realizó para cada una de las Concentraciones de EO de *Rosmarinus officinalis* “romero” y para Nitrofurantoina. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M100 del CLSI. Imagen 8



IMÁGENES 1



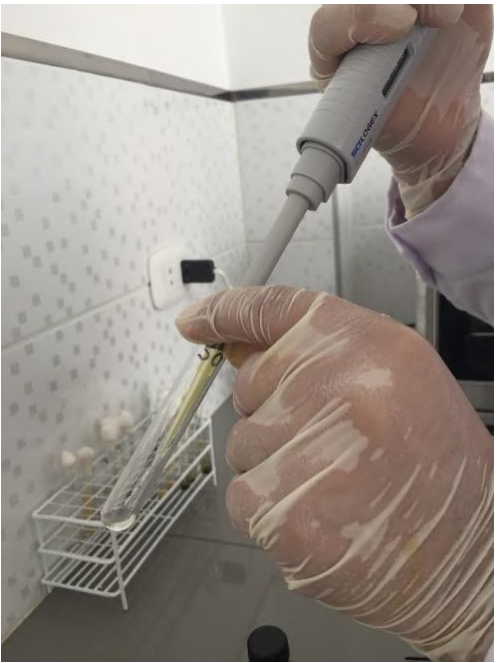
IMÁGENES 2



IMÁGENES 3



IMÁGENES 4



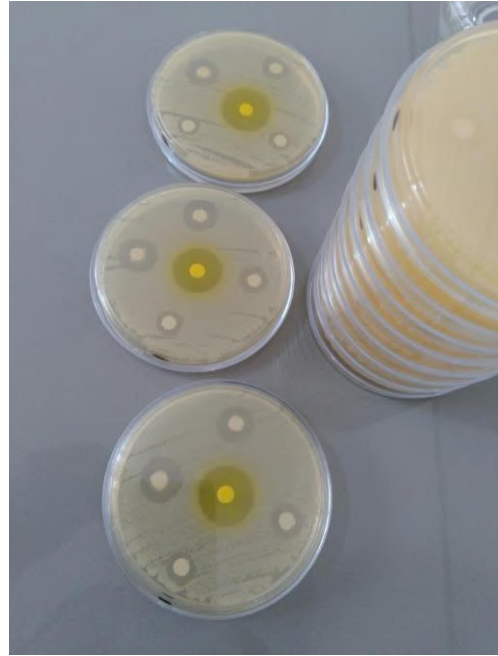
IMÁGENES 5



IMÁGENES 6



IMÁGENES 7



IMÁGENES 8

ANEXO 03

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nº DE PLACAS	CONCENTRACION DEL EXTRACTO OLEOSO DE ROSMARINUS OFFICINALIS <i>"romero"</i>				CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
	100%	75%	50%	25%	NITROFURANTOÍNA 300ug	DMSO
	Diámetro del halo de inhibición (mm)					
PLACA 1	20	18	13	8	25	0
PLACA 2	21	15	13	11	26	0
PLACA 3	19	17	13	9	26	0
PLACA 4	20	15	14	10	27	0
PLACA 5	19	15	14	11	25	0
PLACA 6	19	17	12	9	25	0
PLACA 7	18	14	14	9	24	0
PLACA 8	20	15	13	12	25	0
PLACA 9	20	16	13	9	26	0
PLACA 10	19	16	14	11	25	0
PLACA 11	21	17	14	10	25	0
Promedio del diámetro del halo de inhibición	20	16	13	10	25	0

ANEXO 4

VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

ÍTEM	CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ				CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ESPECÍFICOS							
	CONTENIDO <i>(Se refiere al grado en que el instrumento refleja el contenido de la variable que se pretende medir)</i>		CONSTRUCTO <i>(Hasta donde el instrumento mide realmente la variable, y con cuanta eficacia lo hace)</i>		RELEVANCIA <i>(El ítem es esencial o importante, es decir, debe ser incluido)</i>		COHERENCIA INTERNA <i>(El ítem tiene relación lógica con la dimensión o el indicador que está midiendo)</i>		CLARIDAD <i>(El ítem se comprende fácilmente, es decir, sus sintácticas y semánticas son adecuadas)</i>		SUFICIENCIA <i>(Los ítems que pertenecen a una misma dimensión bastan para obtener la dimensión de esta)</i>	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS GENERALES	SI	NO	OBSERVACIÓN
El instrumento contiene instrucciones claras y precisas para responder la ficha de cotejos	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Los ítems permiten el logro del objetivo de la investigación	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Los ítems están distribuidos en forma lógica y secuencial	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
El número de ítems es suficiente para recoger la información. En caso de ser negativa la respuesta sugiera los ítems a añadir	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
VALIDEZ			
APLICABLE	<input checked="" type="checkbox"/>	NO APLICABLE	APLICABLE TENIENDO EN CUENTA OBSERVACIÓN

Instrumento validado por:


 Jaime A. Polo Gamboa
 Firma y sello
 C.B.P. 4980


 Dr. Steve F. Hurtado Esquivel
 MICROBIOLOGO CLINICO
 Especialidad en Microbiología Clínica y Biología
 REDACIÓIN DE LA VERDAD
 Firma y sello
 C.B.P. 4980


 Ojeda C. Lopez Rincón
 MEdg. Espec. en Análisis Clínicos y Moléculas
 C.B.P. 4980
 Firma y sello

ANEXO 05

MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD

CÓDIGO DE PRÁCTICAS

Este código es una enumeración de las prácticas y los procedimientos de laboratorio esenciales que constituyen la base de las técnicas microbiológicas apropiadas.

Cada laboratorio debe adoptar un manual de seguridad o de trabajo en el que se identifiquen los riesgos conocidos y potenciales y se especifiquen las prácticas y los procedimientos encaminados a eliminar o reducir al mínimo esos riesgos. Las técnicas microbiológicas apropiadas son fundamentales para la seguridad en el laboratorio y no pueden sustituirse por equipo de laboratorio especializado, que no pasa de ser un complemento. A continuación, se exponen los conceptos más importantes.

a) Acceso

1. El símbolo y signo internacional de peligro biológico deberá colocarse en las puertas de los locales donde se manipulen microorganismos.
2. Sólo podrá entrar en las zonas de trabajo del laboratorio el personal autorizado.
3. Las puertas del laboratorio se mantendrán cerradas.
4. No se autorizará ni permitirá la entrada de niños en las zonas de trabajo del laboratorio.

b) Protección personal

1. Se usarán en todo momento monos, batas o uniformes especiales para el trabajo en el laboratorio.
2. Se usarán guantes protectores apropiados para todos los procedimientos que puedan entrañar contacto directo o accidental con sangre, líquidos corporales y otros materiales potencialmente infecciosos o animales infectados. Una vez utilizados, los guantes se retirarán de forma aséptica y a continuación se lavarán las manos.
3. El personal deberá lavarse las manos después de manipular materiales y animales infecciosos, así como antes de abandonar las zonas de trabajo del laboratorio.

4. Se usarán gafas de seguridad, viseras u otros dispositivos de protección cuando sea necesario proteger los ojos y el rostro de salpicaduras, impactos y fuentes de radiación ultravioleta artificial.
5. Estará prohibido usar las prendas protectoras fuera del laboratorio, por ejemplo, en cantinas, cafeterías, oficinas, bibliotecas, salas para el personal y baños.
6. No se usará calzado sin puntera.
7. En las zonas de trabajo estará prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto.
8. Estará prohibido almacenar alimentos o bebidas para consumo humano en las zonas de trabajo del laboratorio.
9. La ropa protectora de laboratorio no se guardará en los mismos armarios o taquillas que la ropa de calle.

c) Procedimientos

1. Estará estrictamente prohibido pipetear con la boca.
2. No se colocará ningún material en la boca ni se pasará la lengua por las etiquetas.
3. Todos los procedimientos técnicos se practicarán de manera que se reduzca al mínimo la formación de aerosoles y gotículas.
4. Se limitará el uso de jeringuillas y agujas hipodérmicas, que no se utilizarán en lugar de dispositivos de pipeteo ni con ningún fin distinto de las inyecciones por vía parenteral o la aspiración de líquidos de los animales de laboratorio.
5. Todos los derrames, accidentes y exposiciones reales o potenciales a materiales infecciosos se comunicarán al supervisor del laboratorio. Se mantendrá un registro escrito de esos accidentes e incidentes.
6. Se elaborará y seguirá un procedimiento escrito para la limpieza de todos los derrames.
7. Los líquidos contaminados deberán descontaminarse (por medios químicos o físicos) antes de eliminarlos por el colector de saneamiento. Puede ser necesario un sistema de tratamiento

de efluentes, según lo que indique la evaluación de riesgos del agente con el que se esté trabajando.

8. Los documentos escritos que hayan de salir del laboratorio se protegerán de la contaminación mientras se encuentren en éste.

d) Gestión de la bioseguridad

1. Incumbirá al director del laboratorio (la persona que tiene responsabilidad inmediata respecto del laboratorio) garantizar la elaboración y la adopción de un plan de gestión de la bioseguridad y de un manual de seguridad o de operación.

2. El supervisor del laboratorio (que dependerá del director) velará por que se proporcione capacitación periódica en materia de seguridad en el laboratorio.

3. Se informará al personal de los riesgos especiales y se le exigirá que lea el manual de seguridad o de trabajo y siga las prácticas y los procedimientos normalizados. El supervisor del laboratorio se asegurará de que todo el personal los comprenda debidamente. En el laboratorio estará disponible una copia del manual de seguridad o de trabajo.

4. Habrá un programa de lucha contra los artrópodos y los roedores.

5. Se ofrecerá a todo el personal en caso de necesidad un servicio apropiado de evaluación, vigilancia y tratamiento médico, y se mantendrán los debidos registros médicos.

ANEXO 06

CÓDIGO DE ÉTICA DEL CMP

En el presente trabajo se respetaron los principios del código de ética adoptados por el Colegio Médico del Perú Capítulo 6 Art. 48.²⁷

Art. 48: “El Médico debe presentar la información proveniente de una investigación médica, para su publicación independientemente de los resultados sin incurrir en falsificación ni plagio y declarando si tiene o no conflictos de interés.”

ANEXO 07

BASE DE DATOS ESTADÍSTICOS

Comparaciones multiples						
HSD Tukey						
(I) Diluciones	(J) Diluciones	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
R. officinalis 25%	R. officinalis 50%	-3.4545*	.4241	,000	-4.655	-2.255
	R. officinalis 75%	-6.0000*	.4241	,000	-7.200	-4.800
	R. officinalis 100%	-9.7273*	.4241	,000	-10.927	-8.527
	Nitrofurantoína 100mg	-15.4545*	.4241	,000	-16.655	-14.255
R. officinalis 50%	R. officinalis 25%	3.4545*	.4241	,000	2.255	4.655
	R. officinalis 75%	-2.5455*	.4241	,000	-3.745	-1.345
	R. officinalis 100%	-6.2727*	.4241	,000	-7.473	-5.073
	Nitrofurantoína 100mg	-12.0000*	.4241	,000	-13.200	-10.800
R. officinalis 75%	R. officinalis 25%	6.0000*	.4241	,000	4.800	7.200
	R. officinalis 50%	2.5455*	.4241	,000	1.345	3.745
	R. officinalis 100%	-3.7273*	.4241	,000	-4.927	-2.527
	Nitrofurantoína 100mg	-9.4545*	.4241	,000	-10.655	-8.255
R. officinalis 100%	R. officinalis 25%	9.7273*	.4241	,000	8.527	10.927
	R. officinalis 50%	6.2727*	.4241	,000	5.073	7.473
	R. officinalis 75%	3.7273*	.4241	,000	2.527	4.927
	Nitrofurantoína 100mg	-5.7273*	.4241	,000	-6.927	-4.527
Nitrofurantoína 100mg	R. officinalis 25%	15.4545*	.4241	,000	14.255	16.655
	R. officinalis 50%	12.0000*	.4241	,000	10.800	13.200
	R. officinalis 75%	9.4545*	.4241	,000	8.255	10.655
	R. officinalis 100%	5.7273*	.4241	,000	4.527	6.927

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

ANEXO 08

PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZA

Halos			
Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
1,780	4	50	,148

ANEXO 09

Pruebas de normalidad							
	Diluciones	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Halos	R. officinalis 25%	,226	11	,121	,924	11	,353
	R. officinalis 50%	,282	11	,015	,786	11	,006
	R. officinalis 75%	,226	11	,121	,924	11	,353
	R. officinalis 100%	,209	11	,195	,906	11	,217
	Nitrofurantoína 300µg	,310	11	,004	,866	11	,069

a. Corrección de significación de Lilliefors