



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Rosmarinus
officinalis* L. (ROMERO) FRENTE A *Streptococcus
pyogenes* ATCC 19615 Y *Staphylococcus aureus* ATCC
25923**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO**

AUTORES:

Bach. MENDOZA SALAS, MARGOT
<https://orcid.org/0000-0002-7537-3878>

Bach. GONZALES SUYO, FRAN DANY
<https://orcid.org/0000-0002-7135-4143>

ASESOR:

Dr. VÍLCHEZ CÁCEDA, HÉCTOR ALEXANDER
<https://orcid.org/0000-0001-7094-0821>

LIMA – PERÚ

2022

DEDICATORIA

A mis queridos padres Justina Salas de Mendoza y Segundo Jordán Mendoza Palomino por haberme forjado como la persona que hoy en día soy; muchos de mis logros se los debo a ellos, en donde incluyo este; me formaron con reglas, valores, pero al mismo tiempo con ciertas libertades y siempre me motivaron para que pudiera alcanzar mis sueños. A mis hijos Jhoisy, Héctor, Pepe y Tatiana que me brindaron su apoyo, me comprendieron, tuvieron tolerancia e infinita paciencia. A mi pareja por impulsarme a seguir con mi futuro profesional, brindándome su apoyo y comprensión. A todos ellos, mi infinito cariño y gratitud.

Margot Mendoza Salas

Primeramente, a Dios; porque a él le debo todo lo que soy, gracias a él que me regala sabiduría, entendimiento y conocimiento día con día; gracias a él que me fortalece y me llena de oportunidades y misericordia cada mañana. Y por qué no dedicárselo si gracias a él yo tengo el privilegio de presentar este proyecto que es de mucha importancia para mí. A mis padres Purificación Suyo Huillca y Virgilio Gonzales León; por haberme dado su apoyo incondicional durante todos estos años y por ser esa razón el más grande aliciente para el cumplimiento de mis objetivos y metas que significa alegría y orgullo para mí, como también para ellos. A mis hermanos porque de alguna u otra forma ellos han influido en mi vida, experiencia y confianza que tienen hacia mí es por eso que se los dedico a ellos. A mi amigo Mijaíl Delmer Ccoa Condori; por el apoyo incondicional, la ayuda que me brindó ha sido sumamente importante, estuvo en los momentos y situaciones más difíciles, siempre ayudándome es por ello que se lo dedico a él.

Fran Dany Gonzales Suyo

AGRADECIMIENTO

Gracias a Dios y a nuestros padres por habernos dado la vida, acompañarnos a lo largo de nuestra carrera profesional y por darnos la fortaleza necesaria para alcanzar nuestros objetivos. A la Universidad María Auxiliadora de Lima y a todas sus autoridades por acogernos y permitirnos concluir con nuestra carrera profesional. A nuestro asesor Dr. Héctor Alexander Vélchez Cáceda de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, por haber compartido su tiempo, sus conocimientos, sus experiencias y brindarnos toda la ayuda necesaria para desarrollar nuestra tesis. Agradecemos también a nuestros docentes quienes fueron partícipes con sus enseñanzas, ideas, conocimientos y su paciencia durante el transcurso de toda nuestra carrera profesional.

Margot Mendoza Salas

Fran Dany Gonzales Suyo

Índice General

	Páginas
Resumen	viii
Abstract	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	7
2.1 Enfoque y diseño de la investigación	7
2.2 Población, muestra y muestreo	7
2.3 Variables de investigación	9
2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	9
2.5 Proceso de recolección de datos	10
2.6 Métodos de análisis estadístico	13
2.7 Aspectos éticos	14
III. RESULTADOS	15
IV. DISCUSIÓN	28
4.1 Discusión de resultados	28
4.2 Conclusiones	31
4.3 Recomendaciones	32
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
ANEXOS	43

Índice de Tablas

Tabla 1. Determinación del índice afrosimétrico saponina	15
Tabla 2. Determinación del pH del extracto hidroalcohólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero)	15
Tabla 3. Solubilidades del extracto hidroalcohólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero)	16
Tabla 4. Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero)	17
Tabla 5. Resultados del análisis in vitro por el método Kirby-Bauer	18
Tabla 6. Análisis de varianza (ANOVA) para <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC – 19615	19
Tabla 7. Comparación múltiple para <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	20
Tabla 8. Análisis de Prueba de Tukey para <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	21
Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	23
Tabla 10. Comparación múltiple para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	24
Tabla 11. Análisis de prueba de tukey para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	25
Tabla 12. Escala Duraffourd del extracto hidroalcohólico de romero frente a las cepas	27

Índice de Figuras

Figura 1. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero)	3
--	---

Índice de Anexos

Anexo A. Instrumento de recolección de datos	44
Anexo B. Matriz de consistencia	47
Anexo C. Operacionalización de las variables	48
Anexo D. Resolución de aprobación proyecto de tesis UMA	49
Anexo E. Certificación botánica de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	50
Anexo F. Certificado del laboratorio T.I.P.I.N SRL.	51
Anexo G. Constancia del laboratorio LAASA LAB	52
Anexo H. Certificación de la cepa <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	53
Anexo I. Evidencias fotográficas del trabajo de campo	58

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) frente a *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Métodos: Se efectuó a través del método de maceración, el análisis fitoquímico se realizó mediante el método Olga Lock. Se utilizó el método de Kirby - Bauer para determinar la actividad antibacteriana en un grupo experimental compuesto por extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) a concentraciones de 20 %, 40 % y 60 % utilizando cefuroxima 30 µg como control positivo, se utilizaron datos del análisis para la prueba ANOVA y Tukey.

Resultado: Los resultados señalan que se encontraron metabolitos secundarios como flavonoides, saponinas, alcaloides y antraquinonas. Según la escala de Duraffourd se demostró el efecto antibacteriano frente a *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 en las concentraciones de 20 %, 40 % y 60 % con promedio de halo inhibitorio de 9,19 mm, 11,14 mm y 15,19 mm igualmente frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923., con promedio de halo de inhibición de 9,85 mm, 13,91 mm y 16,40 mm respectivamente, el control positivo formó halo inhibitorio de 30,45 mm.

Conclusiones: El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), presenta efecto antibacteriano *in vitro* en las diferentes concentraciones frente a las dos cepas bacterianas en estudio cuyo efecto se relaciona con los metabolitos secundarios encontrados.

Palabras claves: *Rosmarinus officinalis* L., Antibacteriano, Extracto, *In vitro*, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the *in vitro* antibacterial effect of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) against *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Methods: It was carried out through the maceration method, the phytochemical analysis was carried out using the Olga Lock method. The Kirby-Bauer method was used to determine the antibacterial activity in an experimental group composed of hydroalcoholic extract of the leaves of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) at concentrations of 20%, 40% and 60% using cefuroxime 30 µg as positive control, analysis data were used for the ANOVA and Tukey test.

Results: The results indicate that secondary metabolites such as flavonoids, saponins, alkaloids and anthraquinones were found. According to the Duraffourd scale, the antibacterial effect against *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 was demonstrated at concentrations of 20%, 40% and 60% with an average inhibitory halo of 9.19 mm, 11.14 mm and 15.19 mm, also against to *Staphylococcus aureus* ATCC 25923., with an average inhibition halo of 9.85 mm, 13.91 mm and 16.40 mm, respectively, the positive control formed an inhibitory halo of 30.45 mm.

Conclusions: The hydroalcoholic extract of the leaves of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) has an *in vitro* antibacterial effect at different concentrations against the two bacterial strains under study, the effect of which is related to the secondary metabolites found.

Keywords: *Rosmarinus officinalis* L., Antibacterial, Extract, *In vitro*, *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus*.

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones bacterianas son un problema de salud con importantes costos económicos para los afectados, la importancia de prevenir y controlar las infecciones causadas por bacterias multirresistentes porque es un problema principal de salud pública mundial debido al uso excesivo de antibióticos¹.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), agregó recientemente a la lista de enfermedades tropicales a la sarna como causante de morbilidad poco reconocida en muchos países en desarrollo, debido a una infección bacteriana secundaria de la piel que, a su vez, puede conducir a complicaciones sistémicas graves como enfermedad renal y potencialmente, enfermedad cardíaca reumática.

La Organización Panamericana de la Salud (OPS) menciona que el 0,03 % de los habitantes a nivel mundial presentan letalidad así mismo un 4 % en niños y ancianos. De todos estos al infectarse con *Staphylococcus aureus* un 10 % necesitó atención médica². En nuestro país es muy frecuente la incidencia de *Staphylococcus aureus*, es un patógeno importante de su género, causante de diversas infecciones, tanto de procedencia social como de origen nosocomial.

Actualmente es de interés clínico farmacéutico estudiar este patógeno por su alta incidencia, así mismo por presentar casos clínicos por cepas resistentes a la metilina y de enfermedades invasivas por el *Streptococcus pyogenes*³, el impétigo es una infección epidérmica causada por *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*⁴.

En un estudio de investigación realizado en tres hospitales de Lima, al aislar 276 microorganismos de *Staphylococcus aureus* se determinó que 81 eran procedentes de pacientes ambulatorios y 195 de enfermos hospitalizados, casi todos procedentes de cultivos microbiológicos en sangre, lesiones en piel y tejidos corporales no óseos, con 90 y 86 cepas respectivamente⁵.

La fitoterapia se ha utilizado desde la antigüedad para sanar o reducir enfermedades, para crear productos fitosanitarios con menor tasa de toxicidad y precio bajo en comparación con los productos de síntesis⁶. Hoy en día se está reevaluando como una terapia agradable y no excesiva, con una amplia gama terapéutica para el tratamiento de enfermedades leves a moderadas, como también de afecciones crónicas⁷.

En el Perú contamos con grandes superficies territoriales que sirven como reservas de biodiversidad global, por tal motivo es considerado como un país megadiverso por la gran variedad de flora. Es notable la presencia de plantas útiles para el hombre, especialmente las que se han utilizado con fines medicinales desde la colonización pre inca e inca hasta la actualidad⁸. Posee una alta diversidad de especies: respecto a la flora, alberga alrededor de 25 000 especies (10 % del total mundial) de las cuales un 30 % son endémicas⁹.

Las cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* son microorganismos los cuales producen con frecuencia infecciones en la comunidad, así como intrahospitalarias¹⁰. En cuanto a *Streptococcus pyogenes*, son cocos anaerobios Gram-positivo perteneciente a géneros altamente diversos, causante de una serie de afecciones patológicas, como glomerulonefritis posestreptocócica, celulitis, endocarditis, meningitis e inflamación de las articulaciones sépticas¹¹. Las cepas de *Staphylococcus aureus* está catalogada dentro de las primeras bacterias altamente frecuentes en la mayoría de los casos clínicos médicos, causante de muchas patologías leves como muy severos tanto por manifestación directa o a través de sus toxinas¹².

Rosmarinus officinalis L. (romero), hierba medicinal procedente de la familia *Lamiaceae* y comúnmente conocida como romero, además de sus usos culinarios debido a su característico aroma¹³. El romero es un arbusto de hoja perenne, ramificado, tupido, siempre verde y con una flor azul-blanca, que alcanza una altura de aproximadamente 1 m. Se caracteriza por hojas de 1 a 4 cm de largo y 2 a 4 mm de ancho, sésiles, pilosos, rectos a rectas-lanceoladas, con bordes curvos,

parte superior y granulosa de color verde oscuro¹⁴.



Figura 1. *Rosmarinus officinalis* L. (romero)

Fuente: Fotografía propia

Su taxonomía está conformada de la siguiente manera. Reino: *Plantae*, División: *Magnoliophyta*, Clase: *Magnoliopsida*, Orden: *Lamiales*, Familia: *Lamiaceae*, Género: *Rosmarinus* L., Especie: *Officinalis*, Nomenclatura Binomial: *Rosmarinus officinalis* L.¹⁵.

Los usos tradicionales de la especie vegetal que se conocen son:

- En manifestaciones clínicas interiores: indigestiones, cólicos menstruales, dolor abdominal y problemas hepáticos¹⁶.
- En manifestaciones clínicas exteriores: dermatitis, calambres, aflicción muscular y reumáticas¹⁶.

Entre los antecedentes al desarrollo del trabajo de investigación se dispone de los siguientes:

García J. (2020), determinó la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. sobre *Streptococcus pyogenes* comparado con amoxicilina en concentraciones de 25 %, 50 %, 75 % y 100 %, evidenciándose que al 100 % presentó mayor efecto antibacteriano.

Por consiguiente, se determinó que tiene alto efecto antibacteriano in vitro por encima de la amoxicilina¹⁷.

Rodríguez D, et al (2018), determinaron que *Rosmarinus officinalis* L. Presentó eficacia antibacteriana a concentraciones de 25 %, 50 % y 75 % sobre *Staphylococcus aureus*. Así mismo encontraron metabolitos secundarios demostrando su acción antibacteriana¹⁸.

Janampa E. (2018), determinó la efectividad *in vitro* del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L., donde demostró que *Streptococcus mutans* es susceptible a la acción del extracto, encontrando que la concentración de 75 mg/ml es semejante a la eficacia de la clorhexidina¹⁹.

Solano X, et al (2018), determinaron el efecto antibacteriano del extracto acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* L. frente a *Streptococcus mutans*. donde los extractos tanto acuoso y oleoso presentaron halos de inhibición de 0 mm y de 11,93 mm respectivamente. Demostrando que el extracto oleoso tiene acción antibacteriana sobre *Streptococcus mutans*²⁰.

Bone K. (2018), evaluó el extracto acuoso de romero al 100 % como agente antibacteriano mezclado con el extracto etanólico de propóleos a concentraciones de 25 %, 50 % y 75 % en cepa de *Enterococcus faecalis*. Demostrando que la mezcla del extracto acuoso de romero y el extracto etanólico de propóleos al 75% tiene mayor efectividad antibacteriana frente a cepas de *Enterococcus faecalis*²¹.

Montero M, et al (2017), determinaron la eficacia antimicrobiana del extracto oleoso crudo de romero sobre *Escherichia coli* a concentraciones de 20 %, 40 %, 60 % y 80 %. Donde el extracto oleoso al 60 % y 80 % presentaron un alto efecto antibacteriano al formar halos inhibición de 9,10 mm y 10,90 mm respectivamente. Se concluye que el extracto oleoso tiene efecto antimicrobiano²².

Se justifica esta investigación por la gran importancia que tiene el estudio curativo de enfermedades infecciosas que ha sido objeto de interesantes investigaciones en el campo farmacéutico. Por esta razón, es imprescindible investigar el efecto antibacteriano de *Rosmarinus officinalis* L. por ser de procedencia vegetal para

superar, afrontar la agresividad del patógeno y modular las reacciones adversas provocadas por los fármacos sintéticos²³.

En el siguiente estudio de investigación podremos comprobar el método de extracción hidroalcohólica de las hojas de romero utilizado frente a cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* para determinar el efecto antibacteriano, de modo que este método que se utilizará servirá de base para contribuir a futuros estudios que con sus principios activos naturales, beneficiarán tanto al campo farmacéutico como al médico, calificado como producto sustituto en la farmacoterapia y en la medicina alternativa. Proporcionará a la industria farmacéutica una amplia gama de nuevos fármacos basados en principios activos de forma natural.

El objetivo general del estudio fue evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) frente a *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

La hipótesis general del estudio fue: El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ENFOQUE Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Enfoque: cuantitativo

Experimental: Puesto que nos permitió manipular la variable independiente.

Analítico: Puesto que se realizaron estudios de las variables y comparaciones de la asociación causal.

Explicativo: Puesto que se llegó a evidenciar el motivo y el suceso de un fenómeno. Se analizó sobre el efecto antibacteriano.

Prospectivo: Puesto que se recolectaron referencias posteriores a la fecha de inicio.

2.2 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO: Criterios de inclusión y exclusión

La población estaba constituida por 7 kg de la especie vegetal de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), procedentes del sector de Limacpunco en el distrito de Marcapata, provincia de Quispicanchis, departamento del Cusco, a una altitud de 3 098 m.s.n.m.

La muestra estuvo constituida por 2000 g de la especie vegetal *Rosmarinus officinalis* L. (romero).

El muestreo fue aleatorizado, considerando la zona de cultivo.

Posteriormente se llevó el recurso vegetal a la Universidad Nacional Amazónica de Madre de Dios (UNAMAD) para su respectiva identificación taxonómica realizada por el Especialista Forestal de Identificación de especies vegetales (ANEXO E).

Se destinaron solo puras hojas, así mismo se escogieron las que presenten excelentes condiciones, inmediatamente se eliminaron las impurezas de las hojas con un escobillón de laboratorio.

Las hojas limpias se almacenaron en un cuarto ventilado sobre una tarima con pliegos de papel estraza de esta manera se logró el secado con la propia temperatura del ambiente por medio mes. Consecutivamente las hojas fueron

trituras en una máquina de moler donde obtuvimos 1 kg de polvo refinado, este a su vez pasó por el procedimiento de maceración con una solución de etanol al 70 % por un periodo de una semana en una cubeta de vidrio acaramelado sin presencia de oxígeno realizando ciertos movimientos de agitación de izquierda a derecha por un cuarto de hora en la mañana y por la noche todos los días, la purificación del extracto se realizó mediante el filtrado empleando papel whatman N° 40 con el propósito de eliminar el residuo, en un tiempo aproximado de media hora²⁷. Seguidamente se colocó en la estufa a 40° C hasta la obtención de extracto seco, la cual se trasvasa en un recipiente estéril y se dejó en refrigeración hasta su uso²⁸.

El extracto hidroalcohólico se efectuó en el Laboratorio T.I.P.I.N SRL. CUSCO. (ANEXO F).

Referente a la unidad de análisis se trabajó con cepas certificadas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 que fue adquirida de la empresa GenLab del Perú S.A.C. (ANEXO H).

Criterios de inclusión:

- Material vegetal perteneciente al distrito de Limacpunco, provincia de Quispicanchis, departamento del Cusco.
- Pertenece a la Familia: *Lamiaceae*, Género: *Rosmarinus* L., Especie: *Officinalis*.
- Hojas grandes bien desarrolladas, frescas, limpias y bien verdes en excelentes condiciones de conservación.
- Cepas certificadas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Criterios de exclusión:

- Material vegetal no perteneciente al distrito de Limacpunco, provincia de Quispicanchis, departamento del Cusco.
- No pertenece a la Familia: *Lamiaceae*, Género: *Rosmarinus* L., Especie: *Officinalis*.
- Hojas deterioradas, secas, sucias, quebradas y marchitadas (negras).

- Cepas no certificadas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

2.3 VARIABLES DE INVESTIGACIÓN

Variable independiente: Extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero).

Definición conceptual: Usando alcohol de 70 % y plantas, se pueden usar como insecticidas, fungicidas, desinfectantes y repelentes de insectos dependiendo de las plantas utilizadas para el brebaje; El alcohol puede extraer las propiedades de los vegetales.

Definición operacional: El extracto hidroalcohólico es una forma práctica de concentrar y obtener los principios activos sintetizados por las plantas. Los extractos hidroalcohólicos ayudan a extraer sustancias que tienen determinados efectos en nuestro organismo.

Variable dependiente: Efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Definición conceptual: Grupo de compuestos químicos que actúan sobre los microorganismos, matan o inhiben su crecimiento y provocan diversas enfermedades provocadas por bacterias, virus, hongos o parásitos.

Definición operacional: La actividad antibacteriana. El método Kirby Bauer nos ayudará a evaluar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) frente a bacterias.

2.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Se utilizó la observación como técnica, se utilizaron las fichas Ad-Hoc para el registro de datos para todos los procesos experimentales como la prueba de solubilidad y marcha fitoquímica^{24,25}. Para comprobar la susceptibilidad y el efecto antibacteriano se utilizó la técnica de Kirby-Bauer²⁶.

2.5 PROCESO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

2.5.1 Análisis previo del extracto hidroalcohólico

El análisis previo del extracto hidroalcohólico se realizó en el laboratorio de Investigación botánica Tecnología e Ingeniería de Procesos Industriales (TIPIN) en el cual se realizaron las siguientes pruebas:

- a) **Índice afrosimétrico:** Se colocó 1 g de extracto seco en un tubo de ensayo posteriormente se añadió 10 ml de agua destilada, se calentó a baño María y posteriormente se agitó de manera vigorosa durante 1 minuto, evidenciándose una espuma muy persistente el cual nos da una evidencia clara de la presencia de saponinas.
- b) **Determinación de pH a 25° C:** En un tubo de ensayo se agregó 0,5 g de extracto seco con 10 ml de etanol al 70 %, el cual se disolvió con permanente agitación a una temperatura de 25° C. Posteriormente se procede a medir con ayuda de pH metro de marca Hanna.
- c) **Prueba de solubilidad:** En 6 tubos de ensayo se colocó 0,5 g de extracto seco, inmediatamente se adiciono un solvente diferente a cada tubo; acetato de etilo, etanol, metanol, n-butanol, N-hexano y agua destilada respectivamente. A continuación, se procedió a dar movimientos de arriba hacia abajo y viceversa hasta obtener los resultados³⁰.

2.5.2 Marcha fitoquímica

La marcha fitoquímica se realizó para reconocer e identificar los numerosos metabolitos activos que se encuentran en las hojas de *Rosmarinus officinalis* L., mediante reacciones de coloración y muestras de sedimentos utilizados con reactivos. En un matraz se colocó 0,5 g de extracto seco y 50 ml de alcohol de 70 %, luego se homogeneizó, posteriormente se colocó 0,5 ml de la muestra preparada en 10 tubos seguidamente se añadió 5 gotas de reactivo específico para identificar la presencia o ausencia de metabolitos secundarios³¹. Se efectuó según la metodología de Olga Lok³².

2.5.3 Actividad antibacteriana método Kirby Bauer o antibiograma

La difusión en disco para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana que diariamente se efectúan en los laboratorios clínicos está basado en el método

original de Kirby Bauer et al. (1966), este método fue estandarizado en 1976 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) debido a su simplicidad y reproducibilidad³³.

Actualmente El Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, anteriormente NCCLS) es responsable de actualizar, modificar y revisar los procedimientos originales de Kirby y Bauer mediante un proceso de consenso global. Esta técnica cualitativa se recomienda exclusivamente para la identificación de enterobacterias^{34,35}.

Se realizó en el Laboratorio LAASA LAB (ANEXO G) ubicado en la ciudad de Cusco, por el método de difusión en agar (KIRBY BAUER), donde se efectuaron las siguientes pruebas:

a) Preparación de los extractos a ensayar

Obteniendo el extracto seco se procedió a preparar las diferentes concentraciones²⁸:

Concentración 60 % = 6 gr extracto seco + 4 ml alcohol 70°.

Concentración 40 % = 4 gr extracto seco + 6 ml alcohol 70°.

Concentración 20 % = 2 gr extracto seco + 8 ml alcohol 70°.

Las concentraciones preparadas se conservaron en frascos acaramelados estériles y con un Vórtex se homogeneizaron todas las mezclas por medio minuto. Por último, se envolvió cada frasco en papel aluminio, debidamente rotulado y guardado en un frigobar para una mejor preservación hasta su siguiente uso²⁸.

b) Activación de la(s) cepa(s) de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 Y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

En cada KWIK-STIK-2 Pack, vienen 2 Sachet con un tubo de cepa liofilizada, la que contiene en su parte superior solución hidratante, la que se liberó de

su contenedor y bajó el hidratante a hidratar la cepa, esto se dejó por 15 minutos para que se hidrate al cabo de los cuales se pudo transferir a medio de propagación, tubos con Caldo Nutritivo o placas de Agar. Todo este procedimiento se realizó con las dos cepas *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 Y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

c) Preparación del inóculo

A partir de la placa o tubos de propagación de cada cepa se transfirió una asada de cepa a 2 tubos con agua destilada esterilizada, donde después de homogeneizar se dejó durante 15 minutos para estabilizar la cepa.

d) Preparación de los medios de cultivo

El Agar Mueller Hinton se preparó a partir de su presentación de deshidratado, siguiendo las instrucciones que establece los productores que vienen impresas en el envase, se pesó 38 g para 1000 ml de agua destilada, se disolvió el medio incrementando su temperatura sin permitir que alcance temperatura de ebullición, se esterilizó en Autoclave de vapor durante 15 minutos a 121° C, se debe esperar que enfríe el autoclave y cuando el balón o matraz de medio alcance la temperatura menor a 45° C para poder transferir 25 ml de medio en placas esterilizadas.

Este procedimiento se realizó 24 horas antes de realizar los ensayos microbiológicos para poder controlar las placas de la contaminación de microorganismos.

e) Inoculación de las placas

Completado el tiempo de dilución de la cepa con un hisopo esterilizado se realizó la siembra en las placas de Mueller Hinton Agar para *Staphylococcus aureus* y Agar Sangre para *Streptococcus pyogenes*, mediante la metodología de agotamiento en superficie, se incubó por 15 minutos.

f) Grupos a ensayar

Seguidamente en cada placa Petri, se colocaron los discos debidamente embebidos con las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero); las placas se incubaron

en una estufa a 37° C por 24 horas y finalmente se realizaron 6 repeticiones por cada grupo experimental.

Grupo I: discos embebidos con el extracto de las hojas de romero al 20 %.

Grupo II: discos embebidos con el extracto de las hojas de romero al 40 %.

Grupo III: discos embebidos con el extracto de las hojas de romero al 60 %.

Grupo IV: discos embebidos con alcohol 70 %.

Grupo V: discos de antibiótico cefuroxima 30 µg.

g) Interpretación de los resultados

Las obtenciones de los resultados fueron promediadas y consideradas en milímetros y se utilizó el calibrador vernier digitalizado para la lectura de los halos de inhibición³⁸. Se midieron todas las zonas circundantes a cada disco de papel (halo de inhibición), con el instrumento adecuado seguidamente fueron registrados y finalmente se evaluaron los resultados mediante los rangos de Duraffourd³⁹:

- Menos de 8 mm de diámetro = (-) Nula.
- De 8 a 14 mm de diámetro = (sensible = +) Sensibilidad límite.
- De 14 a 20 mm de diámetro = (muy sensible = ++) Medio
- De 20 mm a más de diámetro = (+++) Sumamente sensible.

2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Después de obtener los resultados de los análisis que se evaluó mediante descripciones estadísticas utilizando los Microsoft Excel versión 2016, donde fueron sometidos a las diferentes pruebas de análisis de varianza (ANOVA), test de Tukey para determinar diferencia significativa entre los grupos de tratamiento, como también se utilizó el programa estadístico SPSS 26⁴⁰.

2.7. ASPECTOS ÉTICOS

La presente investigación se efectuó tomando en consideración los principios éticos Helsinki adoptada por la 64va Asamblea General, Fortaleza, Brasil, octubre 2013⁴¹. - **“La investigación debe realizarse de manera que reduzca al mínimo el posible daño al medio ambiente”**. Antes de ser descartadas como residuos biológicamente contaminantes, las muestras bacterianas que utilizamos en el desarrollo de este estudio fueron esterilizadas en autoclave para remover microorganismos, con el fin de preservar la integridad de todas las personas que estarán expuestas a estos residuos.

III. RESULTADOS

3.1 De las pruebas de análisis del extracto hidroalcohólico

Tabla 1. Determinación del índice afrosimétrico saponinas

Índice afrosimétrico	Resultados
Prueba de espuma (saponinas)	+++
LEYENDA Abundante (+++) Moderado (++) Leve (+) Ausencia (-)	

Fuente: Registro de recolección de datos

En la tabla 1, se observa la abundante presencia de saponinas lo cual, determina el contenido del metabolito secundario en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero).

Tabla 2. Determinación del pH del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero)

Muestra	Temperatura (° c)	Resultado
Romero	25	8,12
LEYENDA Ácido (<7) Neutro (=7) Básico (>7)		

Fuente: Registro de recolección de datos

En la tabla 2, se aprecia que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) presentó pH de 8,12 por consiguiente, el extracto se considera alcalino.

3.2 De las pruebas de solubilidad

Tabla 3. Solubilidades del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero)

SOLVENTES	RESULTADOS
Acetato de etilo	+
Etanol	+++
Metanol	+
N-butanol	+
N-hexano	++
Agua destilada	+++

Fuente: Registro de recolección de datos

LEYENDA:

(-) Insoluble

(+) Poco soluble

(++) Soluble

(+++) Muy soluble

En la tabla 3, se puede apreciar que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), presentó muy alta solubilidad con el solvente agua destilada como también con el etanol.

3.3 De la marcha fitoquímica

Tabla 4. Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero)

CONSTITUYENTES QUÍMICOS	ENSAYO	REACCIÓN
Compuestos fenólicos	Rvo. AlCl ₃	-
Taninos catéquicos	Rvo. Acetato de Plomo	-
Flavonoides	Rvo. FeCl ₃	+++
Esteroides y triterpenoides	Rvo. Liebermann Burchard	-
Alcaloides	Rvo. Dragendorff	++
	Rvo. OTTO	++
Antraquinonas	Rvo. Borntrager	+
Saponinas	Met. Espuma	+++

Fuente: Registro de recolección de datos

LEYENDA:

(+++) Abundante

(++) Moderado

(+) Leve

(-) Ausencia

En la tabla 4, se puede apreciar que en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), encontramos abundante presencia de flavonoides y saponinas; moderada presencia de alcaloides y una leve presencia de antraquinonas.

Tabla 5. Resultados del análisis *in vitro* por el método Kirby-Bauer

GRUPOS		CEPAS							
		<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615				<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
		Halos de inhibición (mm)							
		N			X	N			X
		1	2	3		1	2	3	
Etanol 70%		6,24	6,20	6,31	6,25	6,24	6,19	6,27	6,23
Concentración del extracto hidroalcohólico (%)	20	9,04	9,48	9,05	9,19	9,89	9,93	9,73	9,85
	40	11,19	11,87	10,37	11,14	13,86	13,14	14,73	13,91
	60	15,09	14,98	15,51	15,19	16,95	15,48	16,79	16,40
Cefuroxima 30 µg		31,45	30,95	31,83	31,41	30,45	30,49	30,41	30,45

Fuente: Registro de recolección de datos

N: Número de ensayos microbiológicos

X: Promedio

En la tabla 5, se visualiza que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), a concentraciones de 20 %, 40 % y 60 %; Cefuroxima 30 µg presentaron halos de inhibición considerables frente a las dos cepas bacterianas en estudio.

Tabla 6. Análisis de varianza (ANOVA) para *Streptococcus pyogenes* ATCC – 19615

ANOVA					
Actividad antibacteriana frente a <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1181.58096	4	295.39524	1634.96867	,000
Dentro de grupos	1.80673333	10	0.18067333		
Total	1183.38769	14			

Fuente: Datos estadísticos

En la tabla 6, se aprecia en la prueba de **ANOVA**, donde el valor de sig., es 0,00 entre los grupos esto indica que existen diferencias significativas. (P-valor es menor que 0,05). Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (Ho), y se acepta la hipótesis (H1).

DECISIÓN: En definitiva, existe evidencia estadística significativa para indicar que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente a cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC - 19615

Tabla 7. Comparación múltiple para *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Comparaciones múltiples									
Q TEST	Variable dependiente: Actividad antibacteriana frente a <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615								
Group 1	Group 2	Mean	Std err	Q-Stat	Lower	Upper	P-Value	Mean-Crit	Cohen D
etanol 70 %	20 %	2.94	0.24540669	11.9801134	1.79787726	4.08212274	0.00	1.14212274	6.9167217
etanol 70 %	40 %	4.89333333	0.24540669	19.9396899	3.75121059	6.03545608	0.00	1.14212274	11.5121853
etanol 70 %	60 %	8.94333333	0.24540669	36.4429073	7.80121059	10.0854561	0.00	1.14212274	21.0403224
etanol 70 %	Cefuroxima 30µg	25.16	0.24540669	102.523692	24.0178773	26.3021227	0.00	1.14212274	59.1920809
20 %	40 %	1.95333333	0.24540669	7.95957648	0.81121059	3.09545608	0.00	1.14212274	4.59546362
20 %	60 %	6.00333333	0.24540669	24.4627939	4.86121059	7.14545608	0.00	1.14212274	14.1236007
20 %	Cefuroxima 30µg	22.22	0.24540669	90.5435782	21.0778773	23.3621227	0.00	1.14212274	52.2753592
40 %	60 %	4.05	0.24540669	16.5032174	2.90787726	5.19212274	0.00	1.14212274	9.52813704
40 %	Cefuroxima 30µg	20.2666667	0.24540669	82.5840017	19.1245439	21.4087894	0.00	1.14212274	47.6798956
60 %	Cefuroxima 30µg	16.2166667	0.24540669	66.0807843	15.0745439	17.3587894	0.00	1.14212274	38.1517586

Fuente: Datos estadísticos

En la tabla 7. Se observa el análisis para comparaciones múltiples, donde muestra la Sig. (0,000) menor a 0,05, existen diferencias significativas en las diferentes concentraciones aplicadas 20 %, 40 % y 60 % del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero).

DECISIÓN: El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), presenta efecto antibacteriano in vitro en todas las concentraciones aplicadas frente a la cepa de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 de manera que, se acepta la segunda hipótesis específica de la investigación.

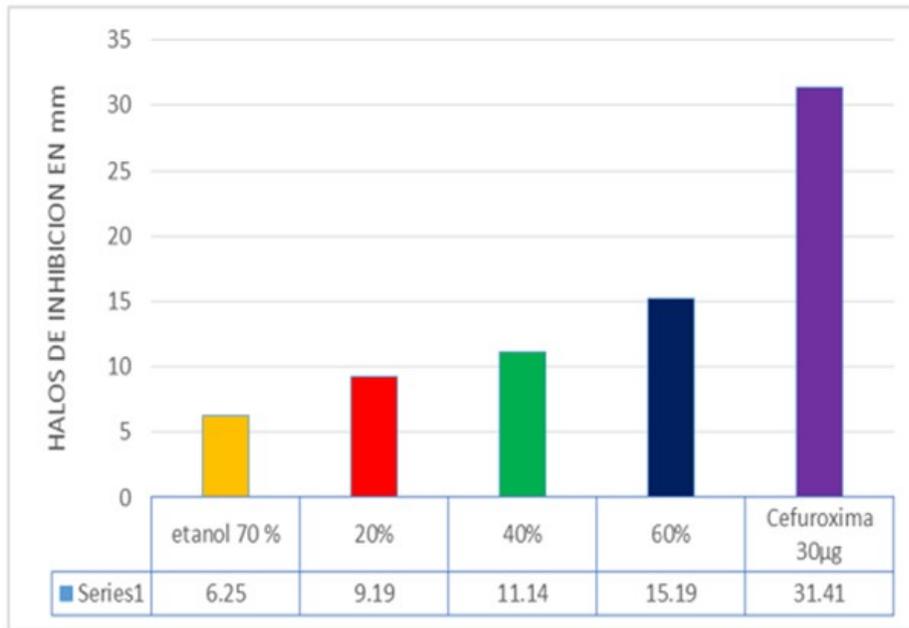
Tabla 8. Análisis de Prueba de Tukey para *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Actividad antibacteriana frente a <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615						
HSD Tukey ^a						
Antibacterianos	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
etanol 70 %	3	6.25				
20 %	3		9.19			
40 %	3			11.14		
60 %	3				15.19	
Cefuroxima 30µg	3					31.41
Sig.		.00	0.12	1.12	0.15	0.38

Fuente: Datos estadísticos

En la tabla 8. Se observa en la Prueba de Tukey, donde la concentración menor el etanol 70 % (6,25 mm), seguido de la concentración al 20 % forma un halo de inhibición (9,19 mm), mientras que la concentración al 40 % obtuvo (11,14 mm), así mismo la concentración al 60 % obtuvo (15,19 mm) como también Cefuroxima 30 µg que alcanzó un halo inhibitorio mayor de (31,41 mm).

DECISIÓN: Se tiene evidencia estadísticamente para afirmar que Cefuroxima 30µg presentó mayor efecto antibacteriano en comparación con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), en sus diferentes concentraciones que obtuvo menor formación de halos inhibitorios frente a cepa de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.



Fuente: Datos estadísticos

Gráfico N° 1. Promedio de los halos de inhibición en (mm) en relación a los grupos de ensayo del extracto hidroalcohólico frente a *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

INTERPRETACIÓN:

En el gráfico de columnas muestra la comparación entre los grupos de ensayo del estudio, se observa importante efecto antibacteriano del Cefuroxime 30 µg que formó halo de inhibición notablemente alto (31,41 mm) en relación con las concentraciones de 20 %, 40 % y 60 % del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), sobre las cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. Por consiguiente, asevera la prueba de Tukey.

Tabla 9. Análisis de varianza (ANOVA) para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

ANOVA					
Actividad antibacteriana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1033.685267	4	258.42	994.8719939	,000
Dentro de grupos	2.597533333	10	0.26		
Total	1036.2828	14			

Fuente: Datos estadísticos

En la tabla 9, se aprecia en la prueba de **ANOVA**, donde el valor de sig. es 0,00 entre los grupos de ensayo esto indica que existen diferencias significativas. (P-valor es menor que 0,05). Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (H_0), y se acepta la hipótesis (H_1).

DECISIÓN: En definitiva, existe evidencia estadística significativa para indicar que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Tabla 10. Comparación múltiple para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Comparaciones múltiples									
Q TEST	Variable dependiente: Actividad antibacteriana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923								
Group 1	Group 2	Mean	Std err	Q-Stat	Lower	Upper	P-Value	Mean-Crit	Cohen D
etanol 70 %	20%	3.61666667	0.29425235	12.2910376	2.24721624	4.9861171	0.00	1.36945043	7.09623385
etanol 70 %	40%	7.67666667	0.29425235	26.0887185	6.30721624	9.0461171	0.00	1.36945043	15.0623286
etanol 70 %	60%	10.17333333	0.29425235	34.5734992	8.8038829	11.5427838	0.00	1.36945043	19.9610191
etanol 70 %	Cefuroxima 30µg	24.2166667	0.29425235	82.2989751	22.8472162	25.5861171	0.00	1.36945043	47.5153354
20%	40%	4.06	0.29425235	13.7976809	2.69054957	5.42945043	0.00	1.36945043	7.96609477
20%	60%	6.55666667	0.29425235	22.2824617	5.18721624	7.9261171	0.00	1.36945043	12.8647852
20%	Cefuroxima 30µg	20.6	0.29425235	70.0079375	19.2305496	21.9694504	0.00	1.36945043	40.4191016
40%	60%	2.49666667	0.29425235	8.48478077	1.12721624	3.8661171	0.00	1.36945043	4.89869046
40%	Cefuroxima 30µg	16.54	0.29425235	56.2102566	15.1705496	17.9094504	0.00	1.36945043	32.4530068
60%	Cefuroxima 30µg	14.04333333	0.29425235	47.7254758	12.6738829	15.4127838	0.00	1.36945043	27.5543163

Fuente: Datos estadísticos

En la tabla 10. Se observa el análisis para comparaciones múltiples, donde muestra la Sig. (0,000) menor a 0,05, existen diferencias significativas en las diferentes concentraciones aplicadas 20 %, 40 % y 60 % del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero).

DECISIÓN: El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), presenta efecto antibacteriano in vitro en todas las concentraciones aplicadas frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de manera que, se acepta la segunda hipótesis específica de la investigación.

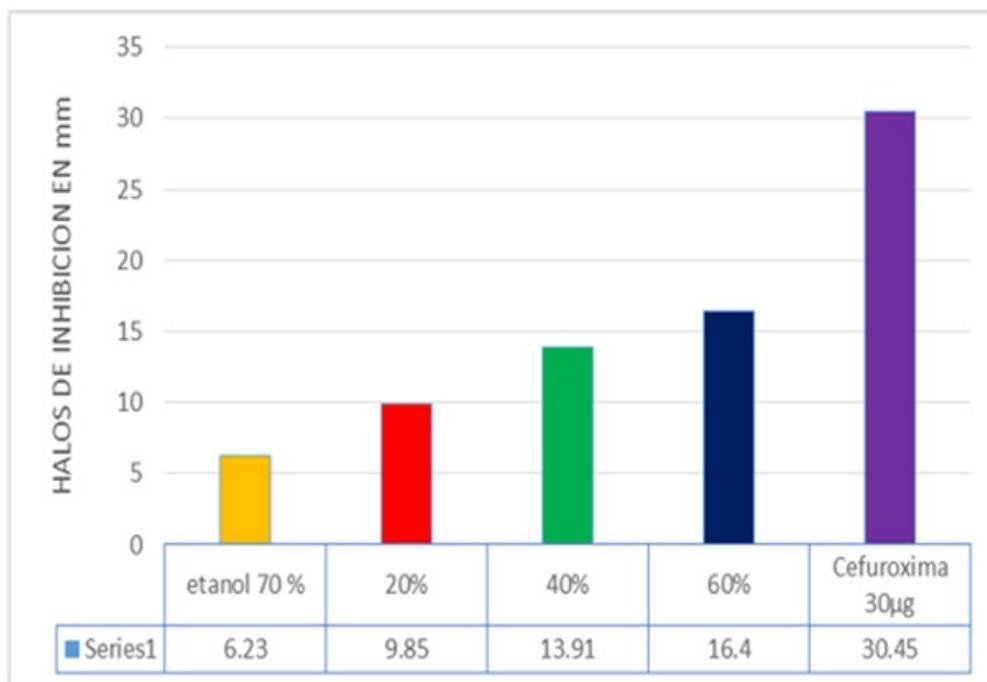
Tabla 11. Análisis de prueba de tukey para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Actividad antibacteriana frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923						
HSD Tukey						
Antibacterianos	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
etanol 70 %	3	6.23				
20%	3		9.85			
40%	3			13.91		
60%	3				16.40	
Cefuroxima 30µg	3					30.45
Sig.		,000	,022	1,270	1,300	,000

Fuente: Datos estadísticos

En la tabla 11. Se observa en la Prueba de Tukey, donde la concentración menor el etanol 70 % (6,23 mm), seguido de la concentración al 20 % forma un halo de inhibición (9,85 mm), mientras que la concentración al 40 % obtuvo (13,91 mm), así mismo la concentración al 60 % obtuvo (16,40 mm) como también Cefuroxima 30µg que alcanzó un halo inhibitorio mayor de (30,45 mm).

DECISIÓN: Se tiene evidencia estadísticamente para afirmar que Cefuroxima 30 µg presentó mayor efecto antibacteriano en comparación con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), en sus diferentes concentraciones que obtuvo menor formación de halos inhibitorios frente a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



Fuente: Datos estadísticos

Gráfico n° 2. Promedio de los halos de inhibición en (mm) en relación a los grupos de ensayo del extracto hidroalcohólico frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

INTERPRETACIÓN:

En el gráfico de columnas muestra la comparación entre los grupos de ensayo del estudio, se observa importante efecto antibacteriano del Cefuroxima 30 µg que formó halo de inhibición notablemente alto (30,45 mm) en relación con las concentraciones de 20 %, 40 % y 60 % del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Por consiguiente, asevera la prueba de Tukey.

Tabla 12. Escala Duraffourd del extracto hidroalcohólico de romero frente a las cepas

GRUPOS	<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
Cefuroxima 30µg	+++	+++
Etanol 70 %	-	-
20%	+	+
40 %	+	+
60 %	++	++

Fuente: Registro de recolección de datos

LEYENDA:

- Nula (-)
- Sensible (+)
- Muy sensible (++)
- Sumamente sensible (+++)

En la tabla 12. En el análisis cualitativo según la escala Duraffourd se observa la sensibilidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), a diferentes concentraciones de 20 %, 40 % presentan promedios de halos de inhibición como sensible (+); a sí mismo al 60 % como muy sensible(++) frente a cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, mientras que el control positivo Cefuroxima 30 µg presenta inhibición de crecimiento antibacteriano “Sumamente sensible” (+++).

IV. DISCUSIÓN

4.1 Discusión de resultados

En el análisis de la marcha fitoquímico nos permitió determinar los metabolitos secundarios principales, como se muestra en la Tabla 4, se puede apreciar en el extracto hidroalcohólico de las hojas de romero, la presencia de flavonoides, saponinas, alcaloides y antraquinonas. Los resultados que se obtuvieron, tienen semejanza al estudio donde encontraron metabolitos secundarios que realizó Rodríguez D, et al (2018)¹⁸.

Al evaluar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero); En distintas concentraciones, por el método de (Kirby-Bauer), se evidenció la susceptibilidad frente a cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Según la medición de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero)., al 20 %, 40 % y 60 %, posee efecto antibacteriano, esta descripción concuerda con el resultado obtenido de la investigación de Montero M, et al (2017)²², donde determinaron la eficacia antimicrobiana del extracto oleoso crudo de romero sobre *Escherichia coli* a concentraciones similares presentó capacidad inhibitoria sobre el crecimiento bacteriano.

En la tabla 6 se estima la prueba de análisis de varianza (ANOVA) donde se compara las medias de los grupos, datos obtenidos en los ensayos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. frente a *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 dicha prueba encontró p-valor menor al nivel de significancia alfa de 0,05. Por lo tanto, existe evidencia estadística significativa para indicar que el extracto presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente a cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, el resultado detallado presenta relación con el estudio realizado por García J. (2020)¹⁷, determinó la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. sobre *Streptococcus pyogenes*, los cuales se demostraron mediante las pruebas de análisis de varianza.

En la tabla 7 se efectuó la prueba de comparaciones múltiples analizando por grupos emparejados, para su determinación cuál de los grupos estudiados tienen diferencias significativas, se evidencia que en las comparaciones de Cefuroxima 30 µg con etanol 70 %, y las concentraciones al 20 %, 40 % y 60 % de extracto todos estos grupos presentan diferencia significativa, por lo que se acepta la hipótesis de la investigación, es decir, el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente a la cepa de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, teniendo en cuenta la diferencia significativa de la prueba de análisis de varianza, prueba de Tukey realizados en la investigación de Janampa E. (2018)¹⁹, donde determinó la efectividad *in vitro* del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L., frente a cepa de *Streptococcus mutans*.

En la tabla 9 en la prueba de ANOVA, se aprecia donde el valor de sig. Salió 0,00 entre los grupos de datos obtenidos en los ensayos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 esto indica que existen diferencias significativas. (P-valor es menor que 0,05). Por consiguiente, incluye la evidencia estadística significativa para indicar que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero)., presenta efecto antibacteriano *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, considerando el resultado similar a la investigación de Rodríguez D, et al (2018)¹⁸., que se estimó en las pruebas de análisis de varianza.

En la tabla 12 mediante la Escala Duraffourd se estimó el comportamiento inhibitorio del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), a diferentes concentraciones sobre *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, así como los grupos control negativo y positivo, se aprecia como bacterias sensibles al extracto hidroalcohólico, sostiene un comportamiento creciente dependiente de la concentración del extracto por encima de halos de inhibición de 9,19 mm y debajo de 16,40 mm, sin embargo el Cefuroxima 30 µg mostró una diferencia notoria de su efecto con halo de inhibición de promedio 30,45 mm, mientras el etanol 70 % se mantuvo sobre la base de 6,24 mm de diámetro.

Solano X, et al (2018)²⁰, determinó según los resultados obtenidos en su investigación en la escala de Duraffourd determinaron el efecto antibacteriano del extracto acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis L.* frente a *Streptococcus mutans.*, donde presentaron halos de inhibición de 0 mm y de 11,93 mm respectivamente.

4.2 Conclusiones

Los estudios realizados en el presente trabajo nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

- En la evaluación del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), mediante la metodología de Kirby – Bauer, presenta halos inhibitorios demostrando su efectividad antibacteriana en las diferentes concentraciones frente a cepas *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Mediante el análisis fitoquímico cualitativo se identifican metabolitos secundarios del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), tal como flavonoides, saponinas, alcaloides y antraquinonas, responsables del efecto antibacteriano, existe posible efecto de sinergia entre los metabolitos secundarios debido a su interacción positiva.
- El extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), a concentración de 20 %, 40 % y 60 %, presenta efecto antibacteriano frente a cepa de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 obteniendo halos de inhibición de 9,19 mm, 11,14 mm y 15,19 mm y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 obtuvo halos de inhibición importantes de 9,85 mm, 13,91 mm y 16,40 mm respectivamente, cabe precisar a mayor concentración mostró mayor efecto antibacteriano.
- El efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero), en sus diferentes concentraciones no superó el efecto en comparación con Cefuroxima 30 µg que presentó halos inhibitorios notablemente altos como 30,457 mm a las dos cepas bacterianas empleadas en el estudio.

4.3 Recomendaciones

- Realizar estudios de comparación sobre el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* L., considerando muestras de distintos lugares de procedencia, así mismo de distintas partes de la planta utilizada, en comparación con la presente investigación.
- Se deben realizar investigaciones más profundas, separar y caracterizar los metabolitos secundarios encontrados en el extracto hidroalcohólico y así determinar qué sustancias brindan el efecto antibacteriano.
- Teniendo en cuenta la presencia de metabolitos secundarios como son flavonoides, saponinas y alcaloides en la especie *Rosmarinus officinalis* L. (romero), estas pueden utilizarse en investigaciones posteriores para la elaboración y fabricación de productos farmacológicos con fines terapéuticos e innovación tecnológica.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pachay-Solorzano J. Las infecciones bacterianas y su resistencia a los antibióticos. Hospital Oncológico “Dr. Julio Villacreses Colmena Solca”, Portoviejo. Rev. Universidad y Sociedad. 2018, [acceso: 20/10/21]; 10(5): 219-223. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2218-36202018000500219
2. Quispe M, Zerpa R. Necesidad de detectar mecanismo de resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas en *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* en varicela complicada. Rev. Perú Med Exp Salud Publica. 2013; [acceso: 20/10/21]; 30(4): 714-28. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v30n4/a31v30n4.pdf>
3. Luján R. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad. Rev. aspectos epidemiológicos y moleculares. 2013; [acceso: 20/10/21]; 74(1): 57-62. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832013000100011
4. Tamariz J, Agapito J, Horna G, Tapia E, Vicente W. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad aislados en tres hospitales de Lima-Perú. Rev. Med Hered 2010, [acceso: 21/10/21]; 21(1): 4-10. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v21n1/v21n1ao1.pdf>.
5. Tamariz-Ortiz J, et. al. Resistencia a clindamicina inducida por eritromicina en *Staphylococcus aureus* aislados de tres hospitales de Lima, Perú. Rev. Acta Méd peruana. 2009, [acceso: 21/11/21]; 26(1): 12-16. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172009000100006

6. Gallegos-Zurita M. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. An Fac Med 2016, [acceso: 21/10/21]; 77(4): 327-332. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832016000400002
7. Calachua O. Efecto antibacteriano *in vitro* de extractos *Ruta graveolens* en *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Tesis para optar al Título Profesional de Biólogo; Universidad Nacional San Agustín de Arequipa; 2019. Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/10433/Blcaoyof.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
8. Bussmann R, Sharon D. Plantas Medicinales de los andes y la amazonia. 1ed. Trujillo, Perú: Editorial Centro William L. Brown – Jardín Botánico de Missouri; Noviembre, 2015.
9. Bowen A, Tong S, Chatfield M y Carapetis J. La microbiología del impétigo en niños indígenas: asociaciones entre *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, sarna y portador nasal. BMC Infect Dis 14, 727 (2014). [acceso: 21/10/21]; Disponible en: <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0727-5>
10. Amy B, Dennis S. Principios y práctica de las enfermedades infecciosas de Mandell, Douglas y Bennett (octava edición), 2015. 8(4): 2285-22994. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00199-5>.
11. Taylor T y Chandrashekar U. *Staphylococcus aureus*. (2017). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28722898/>
12. Álvarez I y Ponce J. *Staphylococcus aureus*, evolución de un viejo patógeno [Internet]. Revista Cubana de Pediatría. 2012 [citado 25 de enero de 2020]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312012000400007

13. Malaquías G, Cerqueira G, Ferreira P, Pacheco A, et al. Uso en medicina popular, potencial terapéutico y toxicidad a nivel celular de las plantas *Rosmarinus officinalis L.*, *Salvia officinalis L.* y *Mentha piperita L.* (familia *Lamiaceae*). (2014) [citado 20/10/20]. Disponible en: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/9888>
14. Flores-Villa E, Sáenz-Galindo A, Castañeda-Facio A y Narro-Céspedes R. Romero (*Rosmarinus officinalis L.*): su origen, importancia y generalidades de sus metabolitos secundarios. *TIP* [online]. 2020, vol.23 [citado 2021-10-21], e20200266. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-888X2020000100212
15. Rodenas D, Rodríguez A. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de tallos de *Rosmarinus officinalis L.* (romero) en cultivos de “*Staphylococcus aureus*” estudio *in vitro*. [Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Universidad Inca Garcilaso De La Vega; Lima (2018): [acceso: 22/10/21]; Disponible en: <http://repositorio.uigv.edu.pe/>
16. Romero L. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (romero) y el digluconato de clorhexidina al 0,05 y 0,12 % más cloruro de cetilpiridinio 0,05 % sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 estudio comparativo in vitro. Tesis para optar al título de cirujano dentista. Universidad Privada Norbert Wiener. Lima (2019): [acceso: 19/10/21]; Disponible en: <http://repositorio.uwiener.edu.pe/xmlui/handle>
17. García J. Efecto antibacteriano del aceite esencial de *Rosmarinus Officinalis* (Romero) sobre *Streptococcus Pyogenes* ATCC 19615 comparado con amoxicilina in vitro. Tesis previo a obtener el título de Médico Cirujano, Universidad Cesar Vallejo, Trujillo (2020): [acceso: 21/10/21]; Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12692/45593>

18. Rodenas D y Rodríguez A. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de tallos de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) en cultivos de "*Staphylococcus aureus*" estudio in vitro. Tesis previo a obtener el título de Químico Farmacéutico, Universidad Inca Garcilaso De La Vega, Lima(2018): [acceso: 22/10/21]; Disponible en: <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/2632>
19. Janampa E. Efectividad *in vitro* del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* romero frente al *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Tesis previa a optar el título de Cirujano Dentista, Universidad Federico Villareal, Lima (2018): [acceso: 22/10/21]; Disponible en: <http://repositorio.unfv.edu.pe/handle/UNFV/2564>
20. Solano X, Moya T y Zambrano M. Inhibición del *Streptococcus mutans*, mediante el uso de extracto acuoso y oleoso de *Rosmarinus officinalis* "romero". Revista odontología, 18(2), 29-34. (2018): [acceso: 20/10/21]; Disponible en: <https://revistadigital.uce.edu.ec/index.php/odontologia/article/view/1334>
21. Bone K. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo con extracto acuoso de *Rosmarinus officinalis* L. frente a *Enterococcus faecalis*. Tesis previa a optar al título de cirujano dentista. Quito: UCE, 2018. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/16694>
22. Montero M, Martínez J, Avilés D, Valle E, Pazmiño N. Efecto antimicrobiano del extracto crudo oleoso de *Rosmarinus officinalis* L. sobre la cepa de *Escherichia coli*. J. Selva Andina Biosph. [Internet]. 2017 [citado: 22/11/21]; 5(2): 168-175. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-38592017000200012&lng=es
23. Loarte A. Efecto Antibacteriano del *Rosmarinus Officinalis* L. en la disminución del *Streptococcus Mutans*, Adolescentes entre los 12 Y 15 Años de edad, Cerro de Pasco del 2018. Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión. Lima (2019): [acceso: 22/10/21]; Disponible en: <http://repositorio.undac.edu.pe/handle/undac/1803>

24. Herrera M. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana, metodología de laboratorio. Rev. Méd. Hosp. Nac. Niños (Costa Rica). 1999. [acceso: 18/03/21]; 34(1): 33-41. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-854619
25. Montero M, Lorena D, Avilés P, Pazmiño V, Erazo Á. Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus*. Rev Inv Vet Perú. (2018); 29(4): 1543-1547. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe › pdf › rivep>
26. Vilchez-Cáceda H, Cervantes-Ganoza L. Evaluación del efecto antibacteriano sinérgico de rifamicina en propóleos sobre bacterias gram positivas. Revista Cubana de Medicina Militar [Internet]. 2021 [citado: 21/10/21]; 50 (3). Disponible en: <http://www.revmedmilitar.sld.cu/index.php/mil/article/view/1336/1026>
27. Remigio K, Reyes A. Efecto diurético comparativo del extracto hidroalcohólico de cola de caballo (*Equisetum giganteum*) y furosemida en ratas albinas (*Holtzman*). Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico. Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Lima (2018): [acceso: 23/10/21]; Disponible en: http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/2956/008599_Tesis%20REMIGIO%20CARHUAMACA%20KARINA-%20REYES%20VILLANUEVA%20ASTRID.pdf?sequence=3&isAllowed=y
28. Carpio M. Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Desmodium molliculum* (kunth) DC. (manayupa) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. [Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad María Auxiliadora; 2020. [acceso: 05/04/21]. Disponible en: <http://repositorio.uma.edu.pe/bitstream/handle/>

29. Béjar E. Efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de hojas de *Jungia paniculata* (dc.) A. Gray “mático serrano” en un modelo de daño gástrico en ratas inducido por etanol 70%. [Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Bioquímica]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2016. [acceso: 25/10/21]. Disponible en: <https://fi-admin.bvsalud.org › view › ympcw>
30. Huansha A, Villón E. Actividad cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Peperomia congona sodiro* (congona) en ratas albinas. Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico. Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Lima (2018): [acceso: 01/11/21]; Disponible en: http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/3519/008599_Tesis%20VILLON%20CHAVEZ%20ELSA-%20HUANSHA%20PEREZ%20%20ANA.pdf?sequence=3&isAllowed=y
31. Ochoa L, Sarmiento A. Estudio fitoquímico de la especie vegetal *Bucquetia glutinosa* (l. f.) dc. (*melastomataceae*) y evaluación de su actividad biológica. Trabajo de grado para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales - U.D.C.A. Vicerrectoría de Investigaciones Facultad de Ciencias. Bogotá D.C. (2018): [acceso: 29/10/21]; Disponible en: <https://repository.udca.edu.co/bitstream/handle/11158/996/TESIS%202018-05-22.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
32. Lock O. Investigación fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. 2ed. Lima: Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú PUCP; 1994.
33. Sánchez R, Ruíz A, Ruíz C, Aguirre L, Salazar A. Actividad antioxidante y marcha fitoquímica de los capítulos de *Tagetes Filifolia* Lag. “pacha anís”. Rev. Horiz. Med. Lima (2017): [acceso: 25/10/21]; 17(1): 18-24. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/hm/v17n1/a04v17n1.pdf>
34. Philip F. Wheat. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology Journal of Antimicrobial Chemotherapy (2001) 48, Suppl. S, 1–4 43.

35. Erna T. Condiciones para un buen estudio de susceptibilidad mediante test de difusión en agar. *Rev. chil. infectol.* (2002): [citado 2021-10-24], 19(2): 77-81. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071610182002019200001&script=sci_abstract&tlng=es
36. Mendoza E. Estudio comparativo del efecto antifúngico del extracto etanólico de propóleos de la sierra y costa liberteña sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, Trujillo – 2018. Tesis para optar al título profesional de cirujano dentista. Universidad Católica de los Ángeles. Chimbote (2019): [acceso: 30/10/21]; Disponible en: <http://repositorio.uladech.edu.pe/handle/123456789/10968>
37. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Serie de normas técnicas N° 30. Ministerio de Salud del Perú. Lima 2002. [acceso: 16/03/21]; Disponible en: https://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/documentos/nacionales/manua_l_sensibilidad.pdf
38. Bellido M. Efecto antibacteriano *in vitro* de la miel de abeja "*Apis mellifera*" del centro apicultor "Rinconada Alta" del distrito de Lurín frente a la cepa de *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. Tesis previa a obtener el título de Químico Farmacéutico, Universidad Inca Garcilaso de la Vega, Lima (2018): [acceso: 28/10/21]; Disponible en: <http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle>
39. Medina K. Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de hojas de *Smallanthus sonchifolius* "Yacon" sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. [Tesis para optar el título profesional de: Médico Cirujano]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2018. [acceso: 20/10/21]. Disponible en: [https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/15400/Medina%20Marreros K.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/15400/Medina%20Marreros%20K.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

40. Contento M. Estadística con aplicaciones en R. Bogotá Colombia Editorial Utadeo: 2019.
https://www.utadeo.edu.co/sites/tadeo/files/node/publication/field_attached_file/libro_estadistica_con_aplicaciones_en_r_def_ago_11.pdf
41. Mazzanti M. Declaración de Helsinki, principios y valores bioéticos en juego en la investigación médica con seres humanos. Rev. Colombiana de Bioética. 2011. [acceso: 30/03/21]; 6(1): 125-144. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/pdf/1892/189219032009.pdf>
42. Carpio M. Actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de hojas y tallos de *Desmodium molliculum* (MANAYUPA) frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. [Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad María Auxiliadora; 2020. [acceso: 05/04/21]. Disponible en:
<http://repositorio.uma.edu.pe/bitstream/handle/>
43. Qureshi M, Stecher G, Bonn G. Cuantificación de compuestos polifenólicos y flavonoides en *Achillea millefolium* y *Equisetum arvense*. Revista de ciencias farmacéuticas de Pakistán. 2016. [acceso: 10/03/21]; 29(5): 1519-1523. Disponible en:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27731806/>
44. Echavarria A, De Armas H, Matute L, Jaramillo C, Rojas L, Benítez R. Evaluación de la capacidad antioxidante y metabolitos secundarios de extractos de dieciséis plantas medicinales. Rev. Ciencia Unemi. 2016. [acceso: 30/03/21]; 9(20): 29-35. Disponible en:
<http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/344/297>
45. Más D, Martínez Y, Rodríguez R, Pupo G, Rosabal O, Olmo C. Análisis preliminar de los metabolitos secundarios de polvos mixtos de hojas de plantas medicinales. Rev. Cubana Plant Med. 2017. [acceso: 30/03/21]; 22(1): 1-9. Disponible en:
<http://scielo.sld.cu/pdf/pla/v22n1/pla05117.pdf>

46. Marcelo G, Rosadio R, Chero A, Díaz G, Ciprian A, Maturrano L. Identificación de *Salmonella Enteritidis* y *Salmonella Typhimurium* en cuyes mediante la técnica de PCR múltiple. Rev. Inv. Vet. 2017. [acceso: 11/03/21]; 8(2): 411-417. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v28n2/a20v28n2.pdf>
47. Mejía J, Carrasco E, Miguel J, Flores S. Conocimiento, aceptación y uso de medicina tradicional peruana y de medicina alternativa/complementaria en 66 usuarios de consulta externa en Lima Metropolitana. REV PERU MED INTEGRATIVA. 2017;2(1):47-57. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.26722/rpmi.2017.21.44>
48. Paiba J, Pérez K. Actividad antibacteriana de un jarabe elaborado con extracto hidroalcohólico de las partes aéreas de *Equisetum giganteum* L. (cola de caballo) frente a cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. [Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico]. Lima: Universidad Inca Garcilaso De La Vega; 2019. [acceso: 17/03/21]. Disponible en: <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/4943>
49. Cadena P, Rendón M, Aguilar Á, Salinas E, De la Cruz F, San German J. Métodos cuantitativos, métodos cualitativos o su combinación en la investigación: un acercamiento en las ciencias sociales. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 2017. [acceso: 11/03/21]; 8(7): 1603-1617. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v8n7/2007-0934-remexca-8-07-1603.pdf>
50. Bernal M, Guzmán M. El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-Bauer. biomédica 1 [acceso: 18/05/2021]; 4(3-4): 112-21. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1891>
51. Abel Díaz C. Diseño estadístico de experimentos. 2ed. página 48. Colombia: Editorial Universidad de Antioquia; 2009.

52. Calsin Y. Actividad antimicrobiana *in vitro* de aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans* Uropatógenos. Perú-2017. Tesis para obtener el título profesional de Lic. en Biología. Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 2017. [acceso: 18/07/21]; Disponible en: [http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/5321/Calsin Huayta Yu dith Mariela.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/5321/Calsin_Huayta_Yu_dith_Mariela.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
53. Lava J, García C. Efecto antidepresivo del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* (Romero) en ratones albinos. Perú-2022. [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2022. [acceso: 18/03/22]; Disponible en: <https://hdl.handle.net/20.500.12672/17722>

ANEXOS

ANEXO A. Instrumentos de recolección de datos

Tabla 1. Solubilidades del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero)

SOLVENTES	RESULTADOS
Acetato de etilo	
Etanol	
Metanol	
N-butanol	
N-hexano	
Agua destilada	

Fuente: Registro de recolección de datos

LEYENDA:

(-) Insoluble

(+) Poco soluble

(++) Soluble

(+++) Muy soluble

**Tabla 3. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO**

GRUPOS		CEPAS							
		<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615				<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923			
		Halos de inhibición (mm)							
		N			X	N			X
		1	2	3		1	2	3	
Etanol 70%									
Concentración del extracto hidroalcohólico (%)	20								
	40								
	60								
Cefuroxima 30 µg									

N: número de ensayos microbiológicos

X: promedio

ANEXO B: Matriz de consistencia

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis
Problema General	Objetivo General	Hipótesis General
¿Tendrá efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero) frente a <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923?	Evaluar el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero) frente a <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero) presenta efecto antibacteriano <i>in vitro</i> frente a <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.
Problemas Específicos	Objetivos Específicos	Hipótesis Específicas
¿Qué metabolitos secundarios tiene el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero)?	Detectar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero), mediante análisis fitoquímico cualitativo.	El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero) tiene metabolitos secundarios.
¿Cuál es la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero) que posee efecto antibacteriano <i>in vitro</i> frente a <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923?	Precisar la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero) que posee efecto antibacteriano <i>in vitro</i> frente a <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	Existe una concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero) que posee efecto antibacteriano <i>in vitro</i> frente a <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.
¿Cuál es el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero) en comparación con cefuroxima 30 µg frente a <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923?	Determinar el efecto antibacteriano <i>in vitro</i> del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero) en comparación con cefuroxima 30 µg frente a <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero) tiene efecto antibacteriano en comparación con cefuroxima 30 µg frente a <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.

ANEXO C. Operacionalización de las variables

VARIABLES	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	N° ITEM	VALOR FINAL	CRITERIOS
VARIABLE INDEPENDIENTE Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero)	Cualitativo	Usando alcohol de 70 ° y plantas, se pueden usar como insecticidas, fungicidas, desinfectantes y repelentes de insectos dependiendo de las plantas utilizadas para el brebaje; El alcohol puede extraer las propiedades de los vegetales.	El extracto hidroalcohólico es una forma práctica de concentrar y obtener los principios activos sintetizados por las plantas. Los extractos hidroalcohólicos ayudan a extraer sustancias que tienen determinados efectos en nuestro organismo	Tamizaje fitoquímico	Presencia de metabolitos secundarios	5	++++ Abundante +++ Moderado ++ Leve + Escaso - Ausente	Rango de presencia o ausencia
				Diluciones del extracto hidroalcohólico	Concentraciones específicas	3	60 % 40 % 20 %	Concentración final después de la dilución
VARIABLE DEPENDIENTES Efecto antibacteriano	Cuantitativo	Grupo de compuestos químicos que actúan sobre los microorganismos, matan o inhiben su crecimiento y provocan diversas enfermedades provocadas por bacterias, virus, hongos o parásitos.	La actividad antibacteriana. El método Kirby Bauer nos ayudará a evaluar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero) frente a bacterias.	Inhibición del crecimiento bacteriano	Halo de inhibición (mm)	2	- Crecimiento - Sin crecimiento	Evidencia de inhibición de crecimiento

ANEXO D. Resolución de aprobación proyecto de tesis UMA



UNIVERSIDAD MARÍA AUXILIADORA

RESOLUCION N° 043-2022-FCSA-UMA

Lima, 31 de enero del 2022

EL DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD MARÍA AUXILIADORA

Visto: El informe de conformidad N°017-UDI-UMA/2022 Mg. Eduardo Percy Matta Solis del Proyecto de Tesis presentado por los Bachilleres en Farmacia y Bioquímica, **MARGOT MENDOZA SALAS y FRAN DANY GONZALES SUYO.**

CONSIDERANDO:

Que, mediante el expediente presentado **MARGOT MENDOZA SALAS y FRAN DANY GONZALES SUYO**, egresado de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica solicita la aprobación del Proyecto de Tesis "**EFFECTO ANTIBACTERIANO in vitro DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE Rosmarinus officinalis L. (ROMERO) FRENTE A Streptococcus pyogenes ATCC 19615 Y Staphylococcus aureus ATCC 25923**".

Que, el mencionado documento cuenta con la aprobación del **Mg. Eduardo Matta Solis**, quien ha revisado el Proyecto de Tesis realizando las observaciones, correcciones y aprobación correspondiente, emiten el Dictamen favorable y su inscripción correspondiente;

Que, en tal sentido se inscribe el presente Proyecto de Tesis al libro de Inscripción de Proyecto de Tesis en la Oficina de Grados y Títulos;

Que, con tal motivo es menester dictar la resolución correspondiente;

Estando el Dictamen de la Comisión Revisora del Proyecto de Tesis en concordancia con las disposiciones reglamentarias vigentes, y en uso de las atribuciones a este Decanato, por la Ley Universitaria 30220, y el Estatuto de la Universidad;

RESUELVE:

PRIMERO. - APROBAR el Proyecto de Tesis: "**EFFECTO ANTIBACTERIANO in vitro DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE Rosmarinus officinalis L. (ROMERO) FRENTE A Streptococcus pyogenes ATCC 19615 Y Staphylococcus aureus ATCC 25923**", presentado por los Bachilleres de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica.

SEGUNDO. - DEJAR ESTABLECIDO que los bachilleres están en condiciones de continuar con el trámite respectivo para optar el Título Profesional, debiendo sujetarse a las disposiciones contenidas en el Reglamento de Grados y títulos, teniendo en cuenta los plazos aprobados.

REGÍSTRESE, COMUNÍQUESE Y ARCHÍVESE



Dr. Jhonnell Samaniego Joaquin
Decano de la Facultad de Ciencias de la Salud
Universidad María Auxiliadora

Av. Canto Bello 431, San Juan de Laurigancho
Telfi 389 1212
www.umaperu.edu.pe

ANEXO E. Certificación botánica de *Rosmarinus officinalis* L.

"Madre de Dios Capital de la Biodiversidad del Perú"
"Año de la Consolidación de la Soberanía Nacional"

CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECIMENES VEGETALES

El que suscribe, Dr. HERNANDO HUGO DUEÑAS LINARES, Especialista Nacional en Identificación Taxonómica de especies de flora silvestre, mediante Resolución Directoral N° 054-2017-SERFOR/DGGSPFFS-DGSPF, con Código de Licencia LC-ES-2017-009; del Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre-SERFOR.

CERTIFICA, que los especímenes (05) presentados por las Srtas. BACHILLERES MENDOZA SALAS, MARGOT y GONZALES SUYO, FRANDANY, de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, de la Universidad María Auxiliadora; para su identificación y/o determinación, para efectos del proyecto de tesis "EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Rosmarinus officinalis* L. (ROMERO) FRENTE A *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 Y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923"

Corresponden a los siguientes taxa aceptados oficialmente:

NOMBRE CIENTÍFICO	NOMBRE COMÚN	FAMILIA
<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	"Romero"	LAMIACEAE

De acuerdo a la descripción de sus características vegetativas y reproductivas, las que están registrada para la Flora de Perú: Departamento de Madre de Dios; en el Catálogo de Angiospermas y Gimnospermas del Perú de Lois Brako and James L. Zarucchi (1993), al APG IV (Angiosperm Phylogenetic Group, 2016) y en el Taxonomic Name Resolution Service V5.0 (2022). Se expide el presente certificado a solicitud de la interesada para los fines que considere conveniente. Se anexa al presente Certificado de Identificación los datos correspondientes a la especie en formato Excel.

Puerto Maldonado, 11 de febrero de 2022

Dr. Hugo Dueñas Linares
ESPECIALISTA EN IDENTIFICACIÓN
TAXONÓMICA DE FLORA SILVESTRE
Código LIC-ES-2017-009

Jr. Cajamarca 1328, Puerto Maldonado-Madre de Dios-Perú
Email: huduli_hugo@yahoo.es Cel: 956-740299

ANEXO F. Certificado del laboratorio T.I.P.I.N SRL.



TECNOLOGÍA E INGENIERÍA
DE PROCESOS INDUSTRIALES
T.I.P.I.N SRL.

Asesoría en ingeniería de Procesos
Pedidos y solicitud de asesoría al :
Cel. 974417999. E-Mail: yacopy1@yahoo.es

CERTIFICADO

El Representante de la empresa TECNOLOGIA E INGENIERIA DE PROCESOS INDUSTRIALES SRL, con RUC: 20527703191, ubicado en CORONEL LATORRE L1. 26 INT, ASOC PATA PATA, SAN JERONIMO- CUSCO

CERTIFICA:

Que, Los Bachilleres, Mendoza Salas, Margot y Gonzales Suyo, Fran Dany Tesis: EFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE LAS HOJAS DE *Rosmarinus officinalis* L. (ROMERO) FRENTE A *Streptococcus pyogenes*. DE LA UNIVERSIDAD MARÍA AUXILIADORA, DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD, ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA.

Realizaron métodos de análisis CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA, en las instalaciones del laboratorio especializado de la empresa en el siguiente periodo 16 de febrero del 2022 al 19 de febrero del 2022.

Donde desarrollaron las siguientes actividades:

- Operaciones básicas de laboratorio.
- Proceso de obtención del extracto de la muestra objeto de estudio.
- Índice Afrosimétrico.
- Determinación del ph.
- Prueba de Solubilidad.
- Marcha Fitoquímica.

Se le otorga el presente certificado para fines de sustentación de tesis.

San Jerónimo, 19 de febrero del 2022.


TECNOLOGÍA E INGENIERÍA DE
PROCESOS INDUSTRIALES S.R.L.
Qco. Julio Ramos Yaco
COP. 263
CORONEL LATORRE T.I.P.I.N. S.R.L.

ANEXO G. Constancia del laboratorio LAASA LAB



LAASA LAB
Servicios en análisis de aguas, alimentos y monitoreo ambiental

CONSTANCIA DE PRACTICAS

La que suscribe, Blga. María del Carmen Yáñez Mujica, Gerente del Laboratorio LAASA Lab. EIRL., hace constar que:

Los Bachilleres de la ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD DE LA UNIVERSIDAD MARIA AUXILIADORA; Bach. MENDOZA SALAS, MARGOT y Bach. GONZALES SUYO, FRAN DANY, realizaron Ensayos Microbiológicos del Efecto Antibacteriano In Vitro del Extracto Hidroalcohólico de las Hojas de Rosmarinus officinalis L. (Romero) frente a *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, en nuestras instalaciones con el Método de Difusión en Agar según Kirby Bauer y Col Modificado, desde el 19 de febrero hasta el 05 de marzo del 2022.

Se expide la presente constancia a petición de los interesados, para los fines correspondientes.

Cusco, 05 de marzo del 2022.


Blga. María del Carmen Yáñez Mujica
C. B. P. 8298
GERENTE
L. A. A. S. A. LAB. E. I. R. L.

ANEXO H. Certificación de la cepa *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Streptococcus pyogenes (group A) Catalog Number: 0385 Lot Number: 385-220** Reference Number: ATCC® 19615™* Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2023/5/31 Release Information: Quality Control Technologist: Alexandra D Quevi Release Date: 2021/6/18
---	--

Performance	
Macroscopic Features: Two colony types, both are circular, convex, entire edge; one is medium & beta hemolytic, other is small and alpha hemolytic, turning to beta as culture ages.	Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram positive cocci	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase(3% Hydrogen Peroxide): negative Bacitracin differential: Sensitive
	 Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.
 Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.
 (1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 – 1.69		(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Run Creation Date/Time: 2021-06-15T15:41:31.121 adq
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
E11 (+++) (A)	385-220	Streptococcus pyogenes	2.60

Comments:

Species canis / dysgalactiae / pyogenes of the genus Streptococcus have very similar patterns: Therefore distinguishing their species is difficult.

Certificación de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Catalog Number: 0360 Lot Number: 360-536** Reference Number: ATCC® 25923™* Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2023/6/30 Release Information: Quality Control Technologist: Kalina E Larsen Release Date: 2021/8/3
---	---

Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 mm (1) Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): 26 - 37 mm (1) Oxacillin (1 mcg - Disk Susceptibility): 18 - 24 mm <div style="text-align: right;"> Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE </div>

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.



Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 – 1.69		(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Run Creation Date/Time: 2021-07-08T13:56:41.594 kel

Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
A8 (+++) (A)	360-536	Staphylococcus aureus	2.34

Comments:

n/a



Gen Lab del Perú S.A.C
Jr. Capac Yupanqui N°. 2434
Lince - Lima - Perú
Central Telefónica
(51-1) 203-7500, (51-1) 203-7501
Email : ventas@genlabperu.com
Web Site : www.genlabperu.com

RUC N°:20501262260
**FACTURA
ELECTRONICA
F001-011076**

Page 1 of 1

Fecha emisión : 11/01/2022 Orden Compra: GL-21/051328
Fecha Vcto : 11/01/2022 Guía de Remisión : 0020039399
Cliente: LABORATORIO DE ANALISIS DE AGUAS ALIMENTOS Y SERVICIOS AMBIENTALES E.I.R.L. N° Pedido : 029499
Dirección: AV. JOSE GABRIEL COSIO NRO. 403 INT. A URB. MAGISTERIAL (FRENTE A PARQUE TREBOL)
CUSCO - CUSCO - CUSCO - Peru
Tipo Mov. : VTA LOCAL/APLIC. ANTICIPO Anticipo: F002-001990 RUC: 20607268526
Lugar de destino : AV. JOSE GABRIEL COSIO 403 A URB. MAGISTERIO - CUSCO

Código	Descripcion	Cant	U/M	Precio Unit.	Dcto	Sub-Total
H05683-A	KWIK-STIK Streptococcus pyogenes derived from ATCC® 19615™	1	UND	335.4800	0.00	335.48
H05584-A	KWIK-STIK Staphylococcus aureus subsp. aureus derived from ATCC® 25923™	1	UND	283.1100	0.00	283.11



CONTADO				
Cuotas	Forma Pago	Importe	Fecha Venc.	
1	Contado	S/ 0.00	11/01/2022	
	Retención (3%)	S/ 0.00		
	Detracción			
	Penalidad			
	Monto Pendiente de Pago	S/ 0.00		

Sub-Total	618.59
Anticipo	618.59
Op. Gravada S/	0.00
IGV 18%	0.00
Importe Total S/	0.00

MONTO ES IGUAL A CERO. SOLES

Representación impresa de la Factura Electrónica
Consulte : <http://cpe.genlabperu.com>

Observaciones de SUNAT :

La FACTURA numero 20501262260-01-F001-011076, ha sido aceptada

Despues de Vencido el plazo de cancelacion, se recargará el interes legal correspondiente.

Sírvanse Realizar el Depósito Respectivo a las Sigüientes Ctas Bancarias:

BCP Soles 193-1440607-0-84 BBVA Soles 0011-0139-0100024183-34

ANEXO I. Evidencias fotográficas del trabajo de campo

**Obtención de la muestra de las partes aéreas de *Rosmarinus officinalis* L.
(romero)**



**Fotografía n° 1, 2 y 3 lavado, trituración y el pesado de la muestra de
Rosmarinus officinalis L. (romero)**



**Fotografía n° 4, 5 y 6 maceración, filtrado de la solución y preparación
para la deshidratación.**



Fotografía n° 7, 8 evaporación de la solución en estufa y obtención del extracto seco (melcocha)



Fotografía n° 9, 10 preparación de las concentraciones del extracto hidroalcohólico al 20 %, 40 % y 60 %

**Materiales y reacciones del proceso de la solubilidad del extracto de
Rosmarinus officinalis L. (romero)**



Fotografía n° 11 reactivos para la prueba de solubilidad



Fotografía n° 12 resultados obtenidos del proceso de solubilidad

Resultados del tamizaje fitoquímica del extracto hidroalcohólico
***Rosmarinus officinalis* L. (romero)**

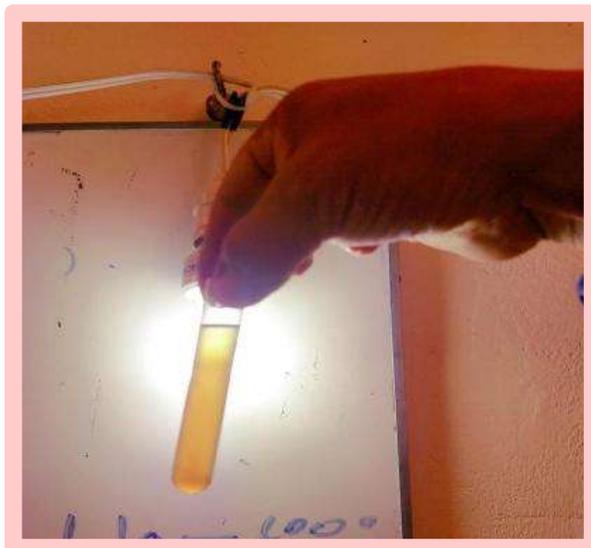


Fotografía n° 13
SAPONINAS-ESPUMA (+++)

Fotografía n° 14
FLAVONOIDES-Rvo. FeCL₃ (+++)
(Presenta cambio verde oscuro-negro)



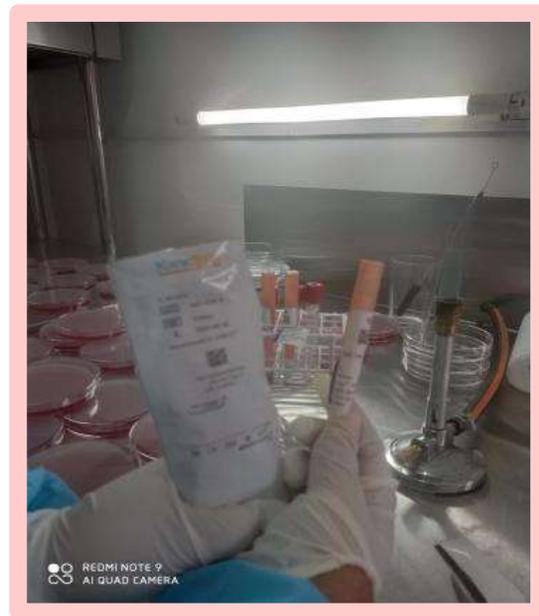
Fotografía n° 15
ALCALOIDES-Rvo. Meyer (++)
(Presenta precipitado)



Proceso de ensayo microbiológico, análisis de sensibilidad sobre los cultivos para determinar el efecto antibacteriano.



Fotografía n° 16 material requerido disponible en mesa de trabajo previamente desinfectado



Fotografía n° 17, 18 kwik-stik contenidos con los pallets de cepas liofilizadas

ENSAYO MICROBIOLÓGICO

	<p>Fotografía n° 19 y 20</p> <p>Se procede a hidratar la Ceba con la adición de solución hidratante que viene en el tubo cepa al tubo de cepa liofilizada a través del hisopo del mismo tubo de cepa. Se espera 15 minutos que se hidrate la cepa.</p>
	<p>Fotografía n° 21 y 22</p> <p>Se requiere de 6 placas por cada concentración de extracto (20 %; 40 % y 60 %), de Agar Mueller Hinton Agar, que se rotula cada una de las placas a ser utilizadas, con los datos completos como son el número de ensayo, concentración del extracto, N° de placa; la fecha de realización del ensayo y nombre de los tesisistas.</p>
	<p>Fotografía n° 23</p> <p>Completado el tiempo de hidratación de la cepa, se hace una dilución de la cepa en dos tubos con agua destilada esterilizada y se incuba por 15 minutos a 37° C.</p>



Fotografía n° 24 y 25

Completado el tiempo de dilución de cepa con un hisopo esterilizado se siembra en las placas de Mueller Hinton Agar y Agar Sangre, mediante la metodología de agotamiento en superficie, se incuba por 15 minutos.



Fotografía n° 26 y 27

Con la ayuda de la micro pipeta se vierte un volumen 20 μ L de cada concentración de extracto en una placa donde se sumerge los discos para ser embebidos con el extracto hidroalcohólico a diferentes concentraciones y con ayuda de la pinza puntiaguda esterilizada se coloca los discos de difusión, 5 discos en cada placa.



Fotografía n° 28 y 29

Después de 15 minutos las placas que se han dejado reposar en la mesa de trabajo, se colocan invertidas en la incubadora que está a 37°C, por 24 horas.



Fotografía n° 30, 31, 32 y 33

Se realizaron las lecturas de resultados a las 24 horas de incubación a 37°C.

Se utilizó el Vernier digitalizado, instrumento que permite la lectura precisa de halos de inhibición.

Los resultados obtenidos quedaron registrados en los Formatos de Lectura, que se plantearon en base a las necesidades del trabajo.



Fotografía n° 34, 35, 36 y 37

Se procedió a realizar la Prueba comparativa de formación de halo de inhibición entre el Extracto Hidroalcohólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. con el Disco de Cefuroxima de 30 µg, con un disco de difusión con alcohol de 70% y Discos con cada una de las concentraciones del extracto 20%,40 y 60%.



Fotografía n° 38, 39 y 40

Realizamos observación microscópica de la cepa, realizamos coloración de Gram y observación al microscopio.

