



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**“EFECTO ANTIBACTERIANO *IN VITRO* DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Rosmarinus Officinalis*
L. (ROMERO) FRENTE *Salmonella Enterica* ATCC 51741 Y
Escherichia Coli ATCC 25922”**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO

AUTORES:

Bach. NARVAEZ MATENCIO, KATHERINE IVET

<https://orcid.org/0009-0005-1860-6160>

Bach. QUIROZ MODESTO, MARIA MILENA

<https://orcid.org/0009-0005-1341-8080>

ASESOR:

Mg. TOVAR TICSE, ROSMERY DIONICIA

<https://orcid.org/0000-0001-9520-5372>

LIMA – PERÚ

2023

DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

Yo, Narvaez Matencio Katherine Ivet, con DNI 70451033 en mi condición de autor(a) de la tesis presentada para optar el presentada para optar el TITULO PROFESIONAL de QUIMÍCO FARMACEUTICO de título “**Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico del Rosmarinus Officinalis L. (Romero) frente Salmonella Entérica ATCC 51741 y Escherichia Coli ATCC 25922**”, **AUTORIZO** a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para publicar de manera indefinida en el repositorio institucional, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula el Repositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

Indicar que dicho documento es **ORIGINAL** con un porcentaje de similitud **18%** y, que se han respetado los derechos de autor en la elaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregado la versión final del documento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

Conforme a lo indicado firmo el presente documento dando conformidad a lo expuesto.

Lima, 19 de Enero del 2024



Narvaez Matencio Katherine Ivet
DNI: 70451033

Firma del autor:



Mg. Tovar Ticse Rosmery Dionicia
DNI: 76967427

Firma del Asesor:

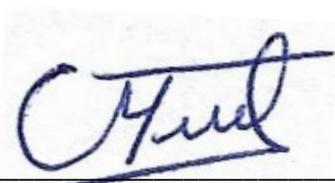
DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

Yo, Quiroz Modesto Maria Milena, con DNI 74422964 en mi condición de autor(a) de la tesis presentada para optar el presentada para optar el TITULO PROFESIONAL de QUIMÍCO FARMACEUTICO de título “**Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico del Rosmarinus Officinalis L. (Romero) frente Salmonella Entérica ATCC 51741 y Escherichia Coli ATCC 25922**”, **AUTORIZO** a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para publicar de manera indefinida en el repositorio institucional, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula el Repositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

Indicar que dicho documento es **ORIGINAL** con un porcentaje de similitud **18%** y, que se han respetado los derechos de autor en la elaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregado la versión final del documento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

Conforme a lo indicado firmo el presente documento dando conformidad a lo expuesto.

Lima, 19 de Enero del 2024



Quiroz Modesto Maria Milena
DNI: 74422964

Firma del autor:



Mg. Tovar Ticse Rosmery Dionicia
DNI: 76967427

Firma del Asesor:

EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE Rosmarinus Officinalis L. (ROMERO) FRENTE Salmonella Enterica ATCC 51741 Y Escherichia Coli ATCC 25922

INFORME DE ORIGINALIDAD

18%

INDICE DE SIMILITUD

19%

FUENTES DE INTERNET

8%

PUBLICACIONES

7%

TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.uma.edu.pe Fuente de Internet	10%
2	hdl.handle.net Fuente de Internet	6%
3	repositorio.uladech.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	www.ncbi.nlm.nih.gov Fuente de Internet	1%
5	Submitted to Universidad Maria Auxiliadora SAC Trabajo del estudiante	1%

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

Activo

DEDICATORIA

Mi firme creencia en Dios ilumina el camino en cada paso que doy, manifestando mi agradecimiento por su constante dirección. También quiero expresar mi gratitud por cuidar de mí y brindar bienestar a mis padres queridos, quienes son mi apoyo inquebrantable en todas las circunstancias. El cariño y respaldo que me brindan son inestimables, y me siento afortunada por contar con su presencia en mi vida.

Bach. Narvaez Matencio, Katherine Ivett

Quiero expresar mi sincero agradecimiento por la orientación que ilumina mi camino en cada etapa de mi vida diaria. Reconozco y valoro la protección que he recibido y las bendiciones de bienestar que han sido otorgadas a mis amados padres. El apoyo inquebrantable que siempre encuentro en ellos es un tesoro incalculable que aprecio profundamente. Me considero verdaderamente afortunada por contar con su amor y apoyo constante en mi vida.

Bach. Quiroz Modesto, Maria Milena

AGRADECIMIENTO

Queremos mostrar nuestra profunda gratitud a la Universidad María Auxiliadora por habernos proporcionado la educación que necesitábamos para nuestro desarrollo profesional y la consecución de nuestras metas académicas. También agradecemos a nuestros padres, familiares y amigos por su constante apoyo a lo largo de nuestro proceso de investigación. Además, extendemos nuestro agradecimiento a nuestra tutora, la Magíster Tovar Ticse, Rosmery Dionicia, por su dedicación y paciencia inquebrantables en cada etapa de nuestro proyecto de investigación."

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	8
II.1. Enfoque y diseño de investigación	8
II.2. Población, muestra y muestreo	8
II.3. Variable de investigación	9
II.4. Técnica e instrumento para la recolección de datos	9
II.5. Plan metodológico para la recolección de datos	10
II.6. Procesamiento del análisis estadístico	12
II.7. Aspectos éticos	12
III. RESULTADOS	13
IV. DISCUSIÓN	23
IV.1. Discusión de resultados	23
IV.2. Conclusiones	26
IV.3. Recomendaciones	27
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
ANEXOS	32
ANEXO A. Instrumentos de recolección de datos	33
ANEXO B. Matriz de consistencia	35
ANEXO C. Operacionalización de las variables	36
ANEXO D. Certificado Taxonómico	37
ANEXO E. Informe de análisis de laboratorio	38
ANEXO F. Certificado de Agar Mueller Hinton	39
ANEXO G. Certificado de análisis de Cepa Salmonella Enterica ATCC 51741	42
ANEXO H. Certificado de análisis de Cepa Escherichia coli ATCC 25922	44
ANEXO I. Evidencias fotográficas	46
ANEXO J. Porcentaje de rendimiento	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Analisis de solubilidad	13
Tabla 2. Promedio de las mediciones de los halos de inhibición.....	14
Tabla 3. Análisis descriptivos de la prueba microbiológica con <i>Salmonella Enterica</i> ATCC 51741.....	16
Tabla 4. Análisis descriptivos de la prueba microbiológica con <i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922.....	16
Tabla 5. Tamizaje fitoquímico.....	17
Tabla 6. Prueba de ANOVA frente <i>Salmonella Enterica</i> ATCC 51741	18
Tabla 7. Comparaciones múltiples frente <i>Salmonella Enterica</i> ATCC 51741.....	19
Tabla 8. Prueba de ANOVA frente <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	19
Tabla 9. Comparaciones múltiples frente <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	20
Tabla 10. Prueba de subconjuntos frente <i>Salmonella Enterica</i> ATCC 51741	21
Tabla 11. Prueba de subconjuntos frente <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	22
Tabla 12. Ensayo microbiológico.....	33
Tabla 13. Marcha Fitoquímica del extracto etanólico	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Muestra de tipo Hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (romero)	46
Figura 2. Selección y limpieza de la muestra	46
Figura 3. Lavado de la muestra.....	46
Figura 4. Procedimiento de secado de la muestra	47
Figura 5. Procedimiento de molienda de la muestra	47
Figura 6. Preparación del macerado del extracto etanólico	47
Figura 7. Procedimiento de filtración del macerado del extracto etanólico.....	48
Figura 8. Obtención de extracto seco.....	48
Figura 9. Añadiendo extracto seco al tubo de ensayo para prueba de solubilidad	49
Figura 10. Resultado de prueba de solubilidad	49
Figura 11. Adición de extracto a los tubos de ensayo	50
Figura 12. Resultado de la marcha fitoquímica	50
Figura 13. Agar Mueller Hinton.....	51
Figura 14. Autoclave para el uso en la prueba microbiológica	51
Figura 15. Placas preparadas	51
Figura 16. Activación de las cepas con Kwik-stik microbiologics	52
Figura 17. Cepas biológicas de tipo: <i>Salmonella enterica</i> y <i>Escherichia coli</i>	52
Figura 18. Preparación del inóculo de <i>E. Coli</i>	52
Figura 19. Preparación del inóculo de <i>S. enterica</i>	52
Figura 20. Rotulado de placas.....	53
Figura 21. Sembrado de placas para <i>S. enterica</i>	53
Figura 22. Sembrado de placas para <i>E. coli</i>	53
Figura 23. Efectuando pozos en agar con ayuda de un sacabocado.....	53
Figura 25. Placas con <i>E. coli</i>	54
Figura 24. Placas con <i>S. enterica</i>	54
Figura 26. Incubación de placas.....	54
Figura 27. Lectura de resultados <i>S. enterica</i>	54
Figura 28. Lectura de resultados <i>E. Coli</i>	55

RESUMEN

Objetivo: Determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (romero) frente *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Materiales y métodos: Enfoque cuantitativo, diseño experimental; población: 1 hectárea de plantaciones de *Rosmarinus Officinalis* L; muestra de 6 kg de hojas de *Rosmarinus Officinalis* L; por otro lado, se empleó 5 placas Petri inoculadas con *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*, respectivamente. Además, se empleó la marcha fitoquímica, difusión en agar en pozos, constituida por grupos al 30%, 50% y 80% frente ciprofloxacino 5ug.

Resultados: Las medias de los diámetros en concentraciones del 30%, 50% y 80% del extracto etanólico de las hojas de romero frente *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922 fueron más bajos que los registrados por el ciprofloxacino 5ug (35,4320 y 38,0080 mm). En la prueba de ANOVA fue ($p < 0,05$) en comparación con el conjunto de control. Además, se identificó la presencia de compuestos fenólicos, alcaloides, taninos, flavonoides; lactonas α , β -insaturadas, antocianinas y azúcares reductores.

Conclusión: El extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (romero) presentó efecto antibacteriano al 30%, 50% y 80% frente *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Palabras clave: Efecto antibacteriano, *Rosmarinus Officinalis* L, *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*.

ABSTRACT

Objective: Determine the in vitro antibacterial effect of the ethanolic extract of the leaves of *Rosmarinus Officinalis* L. (rosemary) against *Salmonella enterica* ATCC 51741 and *Escherichia coli* ATCC 25922.

Materials and methods: Quantitative approach, experimental design; population: one hectare of *Rosmarinus Officinalis* L plantations; 6 kg sample of *Rosmarinus Officinalis* L leaves; On the other hand, 5 Petri dishes inoculated with *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*, respectively, were used. In addition, phytochemical gait was used, diffusion on agar in wells, consisting of groups at 30%, 50% and 80% against ciprofloxacin 5ug.

Results: The mean diameters in concentrations of 30%, 50% and 80% of the ethanolic extract of rosemary leaves against *Salmonella enterica* ATCC 51741 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were lower than those recorded by Ciprofloxacin 5ug (35.4320 and 38.0080 mm). In the ANOVA test it was ($p < 0.05$) compared to the control set. In addition, the presence of phenolic compounds, alkaloids, tannins, flavonoids were identified; α , β -unsaturated lactones, anthocyanins and reducing sugars.

Conclusion: The ethanolic extract of the leaves of *Rosmarinus Officinalis* L. (rosemary) presented antibacterial effect at 30%, 50% and 80% against *Salmonella enterica* ATCC 51741 and *Escherichia coli* ATCC 25922.

Keywords: Antibacterial effect, *Rosmarinus Officinalis* L, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*.

I. INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana es un problema de salud pública global que ha llevado a la búsqueda constante de nuevas alternativas para combatir las infecciones bacterianas (1). En este contexto, se ha prestado una creciente atención a los compuestos naturales presentes en plantas medicinales como posibles agentes antibacterianos efectivos y seguros, uno de estos compuestos *Rosmarinus Officinalis L.*, el cual ha sido objeto de interés debido a sus posibles propiedades antimicrobianas (2).

Esta resistencia representa una amenaza significativa para la salud, afectando a un gran número de personas e implica una serie de factores interconectados, uno de los factores clave que contribuye a la resistencia a los antibióticos es el uso indiscriminado de estos medicamentos. (3) Este abuso crea presión selectiva sobre las bacterias, lo que las impulsa a desarrollar mecanismos de resistencia, la falta de políticas de uso racional de antibióticos y la prolongación innecesaria de tratamientos también juegan un papel importante en esta problemática.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha identificado un grave problema de salud pública relacionado con las diarreas e infecciones gastrointestinales, afecciones que implican una cifra alarmante de personas en todo el mundo, se estima que anualmente se producen 1.500 millones de casos de infecciones gastrointestinales a nivel global (4). De manera preocupante, se ha señalado que alrededor del 70% de estos casos tienen su origen en la ingesta de alimentos contaminados por diversos tipos de microorganismos (5). En los últimos años, ha aparecido una creciente amenaza para la salud pública, el cual se destaca la resistencia a los antibióticos, este fenómeno ha llevado a la aparición de diversos mecanismos que las bacterias utilizan para defenderse de los efectos de los antibióticos, estas adaptaciones han afectado la efectividad de una amplia gama de antibióticos, incluyendo betalactámicos como las penicilinas y las cefalosporinas.

En países como África, Europa y América del Norte, se observa un comportamiento epidemiológico diferenciado en relación con *Salmonella sp.* La incidencia de casos de *Salmonella sp.* fue del 4% en África, del 30.8% en Europa y del 65% en América del Norte, están relacionadas con factores diversos, incluyendo las prácticas de

higiene alimentaria, los sistemas de monitoreo de seguridad alimentaria y los patrones de consumo de alimentos contaminados de origen vegetal en cada región (6). En países como Argelia, Egipto, Jordania, Marruecos, Irak, Pakistán, Palestina, Arabia Saudita, Palestina y Emiratos Árabes Unidos, se han identificado diferentes porcentajes de *Salmonella Enteritidis* (30%), *Salmonella Typhimurium* (23.6%) y otros tipos de salmonelas (26.3%) (7). La incidencia de *Salmonella* se relacionó principalmente con el consumo de ensaladas y sándwiches. En Estados Unidos, se registran alrededor de 200 millones de episodios de gastroenteritis infecciosa cada año, este elevado número de casos resalta la importancia de abordar de manera efectiva las enfermedades transmitidas por alimentos (8). En Perú, la prevalencia tanto *Escherichia coli* como *Salmonella enterica* pueden desarrollar resistencia al ciprofloxacino, estas bacterias tienen la capacidad de desarrollar resistencia a varios tipos de antibióticos, incluyendo las fluoroquinolonas como el ciprofloxacino, debido a la presión selectiva ejercida por el uso inapropiado o excesivo de alguno de los medicamentos (9).

Las infecciones causadas por bacterias patógenas como *Salmonella Enterica* y *Escherichia Coli* representan un problema de salud importante en todo el mundo, con implicaciones significativas para la salud humana y animal. Estas bacterias son responsables de enfermedades gastrointestinales y otros trastornos infecciosos, y su resistencia a los antibióticos tradicionales complica su tratamiento. Las consecuencias de esta resistencia son profundas y preocupantes (10). Se estima que aproximadamente 700.000 personas mueren en todo el mundo cada año como resultado directo de infecciones resistentes a los antibióticos. A menos que se tomen medidas drásticas y efectivas, se proyecta que para el año 2050, el número de muertes relacionadas con la resistencia microbiana podría aumentar dramáticamente, alcanzando la impactante cifra de 10 millones de personas al año (11). Es por todo lo antes mencionado que la investigación pretende conocer las siguientes preguntas:

Problema general:

¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (Romero) frente *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922

Problema Específico:

- ¿Qué tipo de metabolitos secundarios responsables del efecto antibacteriano in vitro posee el extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (Romero)?
- ¿El extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (Romero) tiene efecto antibacteriano in vitro frente *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922 en la concentración del 30%, 50% y 80%?
- ¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (Romero) comparado con ciprofloxacino 5ug sobre *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922?

La actividad antibacteriana de un compuesto se refiere a su capacidad para detener la multiplicación de las bacterias. Los antimicrobianos, ya sean de origen sintético o natural, se emplean con propósitos terapéuticos para enfrentar diversas enfermedades infecciosas originadas por microorganismos perjudiciales, esta actividad antibacteriana de un compuesto se puede demostrar mediante la evaluación de su efecto inhibitor sobre un patógeno, que se manifiesta a través de la formación de halos de inhibición (12). Para evaluar la capacidad de una sustancia para inhibir el crecimiento microbiano, se emplean pruebas estandarizadas que permiten determinar la sensibilidad de los microorganismos a dicha sustancia. Entre los métodos más notables se destaca el enfoque basado en la difusión. Las plantas que muestran efectos antimicrobianos suelen albergar diversos tipos de fitoconstituyentes. La obtención de estos compuestos se efectúa a partir de la trituración de material vegetal, que puede incluir hojas, corteza, tallos, raíces, semillas o frutos. Estos materiales se someten a procedimientos de extracción que involucran el uso de solventes con el propósito de obtener una gama diversa de compuestos químicos (13).

El extracto etanólico, es una solución líquida que se obtiene mediante la extracción de compuestos químicos de una sustancia sólida o vegetal utilizando etanol como solvente. En las plantas y frutas, se encuentran una variedad de compuestos antioxidantes, entre los que se destacan los compuestos fenólicos, carotenoides, antocianinas y tocoferoles, sin embargo, es importante destacar que solo alrededor

del 20% de las plantas ha sido objeto de investigaciones farmacéuticas, lo que ha tenido un impacto positivo en el campo de la salud al contribuir al tratamiento de diversas enfermedades (14).

Rosmarinus Officinalis L. (Romero), es una planta aromática y medicinal que pertenece a la familia de las Lamiáceas, es originario de la región mediterránea, pero se cultiva en muchas partes del mundo debido a sus usos culinarios, medicinales y ornamentales. El romero es conocido por su fragante aroma y su sabor característico que se utiliza para realzar el sabor de diversos platos culinarios. Además de su uso en la cocina, el romero también tiene propiedades medicinales y se ha empleado históricamente en la fitoterapia para abordar una diversidad de afecciones, tales como trastornos gastrointestinales, cefaleas, trastornos circulatorios y procesos infecciosos (15).

En los antecedentes internacionales, **Altamirano, D** (2019) En Ecuador, evaluó el efecto bactericida de *Rosmarinus officinalis* contra *Enterococcus faecalis*. Los extractos se obtuvieron mediante maceración y se evaluaron usando la técnica de difusión en agar. Los resultados mostraron que *Rosmarinus officinalis* al 100% tuvo un halo de inhibición de 9,6 mm, mientras que el extracto de *Zingiber officinale* al 75% mostró el mayor efecto antibacteriano con un halo de 25 mm. En conclusión, estos extractos vegetales tienen potencial antibacteriano contra *Enterococcus faecalis* (16).

Duarte, L (2020), En Colombia, determinó la actividad antibacteriana de aceites esenciales de Anís (*Pimpinella anisum*) y Romero (*Rosmarinus officinalis*) contra *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*, mediante microdilución en placa, determinando la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y la Concentración Bactericida Mínima (CBM). Se encontró en los resultados que los aceites esenciales de Romero y Anís mostraron actividad antibacteriana contra *Porphyromonas gingivalis*, pero no contra *Streptococcus mutans*, concluyendo que la especie vegetal en investigación presentó alta eficacia (17)

Milyuhina A. et al (2021) En Rusia, demostraron la actividad antibacteriana de *Rosmarinus officinalis* L. contra cepas de bacterias grampositivas y gramnegativas. Los resultados mostraron una actividad antibacteriana significativamente más

potente contra *Escherichia coli*, el diámetro de la zona de inhibición fue de 17 mm. Se concluye que *Rosmarinus officinalis* L. ha demostrado potencial actividad antibacteriana (18).

Núñez, E (2019) En Ecuador, evaluó la actividad antimicrobiana de 11 especies vegetales frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Listeria monocytogenes* ATCC 19115, los resultados de la investigación indicaron que, *Croton lechleri* y *Eucalyptus globulus*, mostraron efectos antibacterianos significativos, *Croton lechleri* tuvo una concentración bactericida mínima, se concluye que *Croton lechleri* y *Eucalyptus globulus* Labil poseen propiedades antimicrobianas significativas frente a las cepas bacterianas estudiadas. (19)

En los antecedentes nacionales, **Quipuzco, E** (2019), En Chimbote, el estudio comparó la capacidad antibacteriana entre el extracto etanólico de *Rosmarinus Officinalis* y *Foeniculum vulgare* frente *Streptococcus mutans* ATCC 25175, la técnica fue de disco difusión, conocida como Método de Kirby-Bauer. Los resultados del extracto combinado de ambas plantas en concentraciones del 50% y 75%, evidenciaron los diámetros de 23.78 mm y 27.88 mm respectivamente. En conclusión, se determinó que el extracto de romero presentó el efecto antibacteriano frente *S. mutans*. (20)

Bustamante, M y Cabrera, E (2021) En Huancayo, determinaron la sensibilidad de *Escherichia coli* ante la acción antibacteriana del extracto de *Rosmarinus officinalis* y *Mentha spicata*, el método microbiológico fue de Kirby-Bauer, los resultados indicaron que el extracto al 100% demostró una alta sensibilidad frente a las cepas de *E. coli*. Se concluye que, este estudio demostró que el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* posee una alta sensibilidad contra las cepas de *Escherichia coli* (21).

Gonzales F y Mendoza M (2022) En Lima, evaluaron el efecto bactericida de *Rosmarinus officinalis* frente a *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*. Los resultados a concentraciones del 20%, 40%, y 60%, con halos de inhibición de 9,19 mm, 11,14 mm y 15,19 mm, respectivamente. Se concluye que *Rosmarinus officinalis* L., exhibe propiedades antibacterianas in vitro a variadas concentraciones cuando se enfrenta a las dos cepas bacterianas estudiadas (22).

La justificación teórica se basa en fundamentos teóricos sólidos relacionados con las propiedades antimicrobianas de las plantas medicinales. El Romero (*Rosmarinus Officinalis L.*) ha sido ampliamente estudiado por sus potenciales propiedades antibacterianas debido a su riqueza en compuestos fenólicos y terpenoides. La literatura científica proporciona evidencia de que ciertos componentes del romero pueden inhibir el crecimiento de bacterias patógenas. Esta investigación buscó contribuir al cuerpo de conocimientos existentes, validando científicamente las propiedades antibacterianas del romero en condiciones in vitro y evaluando su eficacia contra cepas específicas de *Salmonella Enterica* y *Escherichia Coli*.

En el ámbito práctico, esta investigación es relevante debido a la creciente preocupación por la resistencia antibiótica y la necesidad de encontrar alternativas naturales y efectivas para controlar las infecciones bacterianas, *Salmonella Enterica* y *Escherichia Coli* son patógenos significativos que causan enfermedades gastrointestinales en humanos.

En el ámbito metodológico, esta investigación se basó en un diseño experimental sólido que utiliza técnicas estandarizadas para evaluar el efecto antibacteriano. El uso de cepas bacterianas ATCC (*Salmonella E.* y *E. Coli*) garantiza la consistencia y la comparabilidad de los resultados, además, el uso de un extracto etanólico estandarizado de romero permite una evaluación precisa de su capacidad antimicrobiana.

Objetivo General:

- Determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis L.* (Romero) frente *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Objetivos específicos:

- Identificar los tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis L.* (Romero) responsables del efecto antibacteriano in vitro

- Determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis L.* (Romero) frente *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922 en la concentración del 30%, 50% y 80%
- Comparar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis L.* (Romero) con ciprofloxacino 5ug sobre *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922

Hipótesis general:

- El extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis L.* (Romero) presenta efecto antibacteriano in vitro frente *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922

Hipótesis secundarias:

- El extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis L.* (Romero) posee metabolitos secundarios responsables de actividad antibacteriana in vitro.
- El extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis L.* (Romero) presenta efecto antibacteriano in vitro frente *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922 en la concentración del 30%, 50% y 80%
- El efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis L.* (Romero) es significativamente mayor comparado con ciprofloxacino 5ug sobre *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Enfoque y diseño de investigación

Enfoque: cuantitativo, lo que significa que se empleó métodos numéricos y medidas objetivas para el análisis (23).

Diseño: experimental porque la variable independiente fue manipulada con el propósito de observar sus efectos (24).

Explicativo: Su objetivo principal fue interpretar las causas que subyacen en la investigación, buscando una comprensión profunda (25)

Prospectivo: Debido a que el diseño de esta investigación se planificó con anticipación antes de que los eventos ocurran (26).

Corte: transversal, porque los datos fueron recolectados en un momento determinado.

II.2. Población, muestra y muestreo

La población objeto de estudio se conformó mediante 1 hectárea de plantaciones de *Rosmarinus Officinalis* L. (Romero) que fueron recolectadas en la zona del distrito de La Unión, provincia de Dos de Mayo, departamento de Huánuco. Ubicado a una altitud de 3204 m. s. n. m.

En lo que respecta a la población microbiológica bajo investigación, estuvo compuesta por *Salmonella Enterica* ATCC 51741 y *Escherichia Coli* ATCC 25922.

Muestra vegetal de 6 kilogramos de hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (Romero).

Criterios de Inclusión

- Muestra recolectada directamente de la zona de producción
- Hojas en buen estado
- Hojas de forma y tamaño similar

Criterios de exclusión

- Tallo y raíz de *Rosmarinus Officinalis* L. (Romero).

- Hojas con plagas e insectos
- Hojas en estado de deterioro y descomposición

Se empleó un muestreo no probabilístico debido a que se consideró criterios de inclusión y exclusión.

II.3. Variable de investigación

Variable independiente: Extracto etanólico de hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (Romero)

Definición conceptual

Solución líquida obtenida de la maceración con etanol de hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (Romero) (27).

Definición operacional

La maceración con extracto etanólico se considera uno de los procedimientos más simples para extraer ciertos compuestos químicos orgánicos de las plantas, con el fin de evidenciar ciertos impactos en nuestro cuerpo.

Variable dependiente: Efecto antibacteriano in vitro frente a *Salmonella enterica* y *Escherichia Coli*.

Definición conceptual

Grupo de compuestos químicos que actúan sobre los microorganismos, matan o inhiben su crecimiento (28).

Definición operacional

Se empleó el método de Kirby-Bauer para evaluar la acción antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (Romero) sobre *Salmonella enterica* y *Escherichia Coli*.

II.4. Técnica e instrumento para la recolección de datos

Se empleó la técnica de adquisición de datos conocida como observación.

El instrumento fue la ficha de observación para el registro del tamizaje fitoquímico y difusión en agar.

II.5. Plan metodológico para la recolección de datos

Recolección y Preparación:

Inicialmente, se recolectó hojas de *Rosmarinus Officinalis L.* (Romero), se transportó siguiendo prácticas adecuadas para su conservación y se llevaron al Laboratorio Biológico y Análisis Clínico Santa Rosa EIRL.

Posteriormente, se procedió a transportar dicho recurso vegetal al Laboratorio Santa Rosa, en la que se realizó una minuciosa descripción taxonómica de la planta.

Se seleccionaron hojas verdes que estuvieron en buen estado y se procedió a lavarlas minuciosamente con agua, luego, se desinfectaron con hipoclorito de sodio. Las hojas se dejaron escurrir durante un período de 3 horas.

A continuación, se llevó a cabo el proceso de secado para reducir el contenido de agua en la muestra. Este paso fue esencial, ya que la humedad puede afectar negativamente la calidad de la planta recolectada. La disminución de la cantidad de agua en las hojas permitió que los catalizadores se vuelvan menos activos, lo que contribuye a la protección de la planta. El secado se realizó distribuyendo las hojas sobre bandejas de papel Kraft y exponiéndolas a una estufa con aire recirculante a una temperatura constante de 40°C durante 24 horas. Posteriormente, las hojas se sometieron a un proceso de trituración, que se realizó de forma manual y mecánica con un mortero.

Preparación del Extracto Etanólico:

Para obtener el extracto etanólico de *Rosmarinus Officinalis L.* (Romero), se aplicó el método de maceración. Después de triturar la muestra, se colocó en un recipiente con boca ancha y tapa hermética. Luego, se añadió el disolvente y se selló el recipiente, agitándolo enérgicamente, el contenido se dejó en reposo durante 7 días. Al finalizar este período, se filtró la muestra y se colocó en una bandeja plana, que luego se introdujo en una estufa a 45°C para evaporar el solvente y obtener el extracto seco.

Identificación de Metabolitos Secundarios:

Se llevó a cabo pruebas de identificación de metabolitos secundarios, a través del tamizaje fitoquímico. Se tomó una pequeña muestra del extracto y se expuso a reacciones de cambio de color y precipitación para detectar flavonoides, taninos, alcaloides, antraquinonas, terpenos y otros compuestos.

Actividad antibacteriana método Kirby Bauer:

Se aplicó el método de difusión en agar conocido como el método de Kirby-Bauer, se procedió a la elaboración del medio de cultivo siguiendo las especificaciones del fabricante. Luego, este medio se sometió a la esterilización en autoclave a una temperatura de 121°C durante 15 minutos. Posteriormente, se vertió el medio esterilizado en placas Petri asépticas, y luego se almacenó en refrigeración para su posterior uso.

Para llevar a cabo las pruebas, se activarán la *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*. Los inóculos se prepararán utilizando un asa de Kohle, tomando de 3 a 5 colonias de cada cepa, que se depositarán en un recipiente de ensayo conteniendo aproximadamente 5 ml de solución salina aséptica.

La mezcla se homogenizó hasta alcanzar la turbidez requerida, según la escala de McFarland, que equivale a 1×10^8 UFC/ml. Una vez preparado el inóculo, se procedió a sembrar las placas Petri mediante el método en estría. Posteriormente, se permitió que las placas sequen durante 4 a 6 minutos. Los pozos se impregnaron con 20 μ l de concentraciones del extracto a estudiar y se colocaron sobre las placas Petri. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas. Al finalizar este período, se evaluó la presencia de halos de inhibición alrededor de los pozos. Cada uno de los pozos se muestra de la siguiente manera:

- EEHRO - 30%
- EEHRO - 50%
- EEHRO - 80%
- Control dimetilsulfoxido
- Control ciprofloxacino de 5 μ g

*Extracto etanólico de hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (EEHRO)

Finalmente, se examinaron las placas para identificar halos de inhibición alrededor de los pozos, y la interpretación de los resultados se realizó midiendo los halos con un vernier.

II.6. Procesamiento del análisis estadístico

Con relación al procesamiento de los datos, se aplicó estadística descriptiva para analizar la información recopilada, la cual fue organizada en una hoja de cálculo en Excel. Se presentó tablas de frecuencia, medidas de dispersión, como la desviación estándar, y se llevarán a cabo análisis de varianza. Para las comparaciones entre los diferentes tratamientos, se empleará la prueba estadística de ANOVA.

II.7. Aspectos éticos

Los investigadores siguieron de manera estricta los principios éticos y las normas de conducta en el laboratorio, adhiriéndose a los protocolos de seguridad biológica, además de citar adecuadamente la literatura consultada.

III. RESULTADOS

III.1. Prueba de solubilidad

Tabla 1. Analisis de solubilidad

TUBO	SOLVENTE	RESULTADOS
N° 1	Éter de petróleo	-
N° 2	Diclorometano	+
N° 3	Cloroformo	+
N° 4	Butanol	+
N° 5	Etanol 96	+
N° 6	Etanol 70	+++
N° 7	Metanol	++
N° 8	Agua destilada	-
N° 9	Dimetilsulfoxido	+++

Leyenda:

- Insoluble: (-)
- Poco soluble: (+)
- Medianamente soluble: (++)
- Muy soluble: (+++)

La máxima solubilidad (+++) se registró en el solvente dimetilsulfóxido y etanol 70; le sigue el metanol con media solubilidad (++); y poca solubilidad (+) en diclorometano, cloroformo, butanol y etanol 96.

III.2. Contrastación de hipótesis general

Hipótesis estadística

H0: El extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (Romero) no presenta efecto antibacteriano in vitro frente *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

H1: El extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (Romero) presenta efecto antibacteriano in vitro frente *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Se efectuaron análisis estadísticos para verificar la hipótesis propuesta. Los resultados indicaron que los valores obtenidos en cada grupo de estudio se encontraban dentro de los límites de confianza, respaldando así la validez de la hipótesis en la investigación. De igual manera en la tabla 2, 3 y 4 se evidencia los resultados de los halos de inhibición del análisis microbiológico.

Tabla 2. Promedio de las mediciones de los halos de inhibición

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm				
	DMSO	30%	50%	80%	Ciprofloxacino 5 µg
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 51741	6	8.79	9.61	10.50	35.42
	6	8.80	9.56	10.36	35.40
	6	8.82	9.61	10.52	35.43
	6	8.81	9.64	10.54	35.49
	6	9.79	9.61	10.50	35.42
Media	6	9.00	9.61	10.50	35.43
Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm				
	DMSO	30%	50%	80%	Ciprofloxacino 5 µg
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6	8.83	10.36	11.28	38.05
	6	8.80	10.39	11.25	37.99
	6	8.84	10.36	11.26	38.03
	6	8.81	10.37	11.28	37.96
	6	8.80	10.35	11.26	38.01
Media	6	8.81	10.36	11.26	38.01

Se pudo observar que para *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922, el DMSO no presentó halos de inhibición, con una media de 6.00 y una desviación estándar de 0.00000, que corresponde al diámetro del pozo de 6.00 mm.

Se evidenció que las concentraciones del extracto etanólico de las hojas de romero al 30%, 50% y 80% evidenciaron baja sensibilidad antibacteriana frente *Salmonella enterica* ATCC 51741 con una media de (9,0020; 9,6060 y 10,4840 mm) respectivamente. Por otro lado, la cepa se mostró sumamente sensible frente al control ciprofloxacino 5ug con una media de 35,4320 mm.

Así mismo, se obtuvo que las concentraciones del extracto etanólico de las hojas de romero al 30%, 50% y 80% evidenciaron baja sensibilidad antibacteriana frente *Escherichia coli* ATCC 25922 con una media de (8,8160; 10,3660 y 11,2660 mm) respectivamente. Por otro lado, la cepa se mostró sumamente sensible frente al control ciprofloxacino 5ug con una media de 38,0080 mm.

Decisión: Por tal motivo, se acepta la hipótesis alterna H1.

Tabla 3. Análisis descriptivos de la prueba microbiológica con *Salmonella Enterica* ATCC 51741

95% de intervalo de confianza para la media									
		N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Límite inferior	Límite superior	Mínimo	Máximo
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 51741	DMSO	5	6,0000	0,00000	0,00000	6,0000	6,0000	6,00	6,00
	Ext. 30%	5	9,0020	0,44065	0,19706	8,4549	9,5491	8,79	9,79
	Ext. 50%	5	9,6060	0,02881	0,01288	9,5702	9,6100	9,56	9,64
	Ext. 80%	5	10,4840	0,07127	0,03187	10,3955	10,5725	10,36	10,54
	Ciprofloxacino 5ug	5	35,4320	0,03421	0,01530	35,3895	35,4745	35,40	35,49

Tabla 4. Análisis descriptivos de la prueba microbiológica con *Escherichia Coli* ATCC 25922

95% de intervalo de confianza para la media									
		N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Límite inferior	Límite superior	Mínimo	Máximo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	DMSO	5	6,0000	0,00000	0,00000	6,0000	6,0000	6,00	6,00
	Ext. 30%	5	8,8160	0,01817	0,00812	8,7934	8,8386	8,80	8,84
	Ext. 50%	5	10,3660	0,01517	0,00678	10,3472	10,3848	10,35	10,39
	Ext. 80%	5	11,2660	0,01342	0,00600	11,2493	11,2827	11,25	11,28
	Ciprofloxacino 5ug	5	38,0080	0,03493	0,01562	37,9646	38,0514	37,96	38,05

III.3. Contrastación de hipótesis específicas

a) Hipótesis Específica N° 01

H0: El extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (Romero) no posee metabolitos secundarios responsables de actividad antibacteriana in vitro.

H1: El extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (Romero) posee metabolitos secundarios responsables de actividad antibacteriana in vitro.

Tabla 5. Tamizaje fitoquímico

TUBO	ENSAYOS	METABOLITO	RESULTADO
N° 1	Borntrager	Antraquinonas	+
N° 2	Cloruro férrico	Compuestos fenólicos	+++
N° 3	Liebermann-Burchard	Terpenos y esteroides	+
N° 4	Dragendorff	Alcaloides	+++
N° 5	Mayer	Alcaloides	+++
N° 6	Wagner	Alcaloides	+++
N° 7	Baljet	Lactonas α , β -insaturadas	++
N° 8	Gelatina	Taninos	+++
N° 9	Gelatina-sal	Taninos	+
N° 10	NaOH 10%	Antocianinas	++
N° 11	Benedict	Azúcares reductores	++
N° 12	Fehling A y B	Azúcares reductores	++
N° 13	Espuma	Saponinas	-
N° 14	Shinoda	Flavonoides	+++

Se llevó a cabo el análisis fitoquímico siguiendo el protocolo establecido por Olga Lock. A través de este procedimiento, se examinó la existencia de distintos fitoconstituyentes en el extracto etanólico obtenido de las hojas de romero. Se observó la presencia de compuestos fenólicos, alcaloides, taninos y flavonoides (+++). Además, se detectó lactonas α , β -insaturadas, antocianinas y azúcares reductores (++).

Decisión: Por tal motivo, se acepta la hipótesis alterna H1.

b) Hipótesis Específica N° 02

H0: El extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (Romero) no presenta efecto antibacteriano in vitro frente *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922 en la concentración del 30%, 50% y 80%.

H1: El extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (Romero) presenta efecto antibacteriano in vitro frente *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922 en la concentración del 30%, 50% y 80%.

Tabla 6. Prueba de ANOVA frente *Salmonella Enterica* ATCC 51741

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<i>Salmonella Enterica</i> ATCC 51741	Entre grupos	2899,626	4	724,907	18010,100	0,000
	Dentro de grupos	0,805	20	0,040		
	Total	2900,431	24			

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias entre los distintos tratamientos al comparar sus promedios. Al examinar la tabla 6, se reconoció un hallazgo con un valor de $p < 0.05$ (significativo), lo que señala que hay disparidades significativas entre los enfoques utilizados con respecto a *Salmonella Enterica* ATCC 51741. Con el propósito de identificar las diferencias significativas entre los distintos medios, se llevó a cabo un análisis POST HOC empleando el procedimiento de Tukey.

Tabla 7. Comparaciones múltiples frente *Salmonella Enterica* ATCC 51741

Comparaciones múltiples						
(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Ciprofloxacino 5ug	DMSO	29,43200*	0,12689	0,000	29,0523	29,8117
	30 %	26,43000*	0,12689	0,000	26,0503	26,8097
	50 %	25,82600*	0,12689	0,000	25,4463	26,2057
	80 %	24,94800*	0,12689	0,000	24,5683	25,3277
DMSO	Ciprofloxacino 5ug	-29,43200*	0,12689	0,000	-29,8117	-29,0523
	30 %	-3,00200*	0,12689	0,000	-3,3817	-2,6223
	50 %	-3,60600*	0,12689	0,000	-3,9857	-3,2263
	80 %	-4,48400*	0,12689	0,000	-4,8637	-4,1043

Se pudo observar que $p < 0.05$ en comparaciones entre el ciprofloxacino 5ug y los grupos de experimentación al 30%, 50% y 80%, el cual manifiesta que el ciprofloxacino 5ug muestra un efecto inhibitorio significativamente mayor que los experimentales en todas las concentraciones frente *Salmonella Enterica* ATCC 51741.

Además, se observa que $p < 0.05$ entre (DMSO) y los grupos experimentales, lo cual evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, siendo a favor de los grupos en experimentación.

Tabla 8. Prueba de ANOVA frente *Escherichia coli* ATCC 25922

ANOVA						
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Entre grupos	3419,837	4	854,959	2181018,638	0,000
	Dentro de grupos	0,008	20	0,000		
	Total	3419,845	24			

Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existen diferencias entre los distintos tratamientos al comparar sus promedios. Al revisar la tabla 8, se

apreció un resultado con un valor de $p < 0.05$ (significativo), lo que demuestra la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos aplicados con relación a *Escherichia coli* ATCC 25922. Con el propósito de identificar las diferencias significativas entre los distintos medios, se llevó a cabo un análisis POST HOC empleando el procedimiento de Tukey.

Tabla 9. Comparaciones múltiples frente *Escherichia coli* ATCC 25922

Comparaciones múltiples						
(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Ciprofloxacino 5ug	DMSO	32,00800*	0,01252	0,000	31,9705	32,0455
	30 %	29,19200*	0,01252	0,000	29,1545	29,2295
	50 %	27,64200*	0,01252	0,000	27,6045	27,6795
	80 %	26,74200*	0,01252	0,000	26,7045	26,7795
DMSO	Ciprofloxacino 5ug	-32,00800*	0,01252	0,000	-32,0455	-31,9705
	30 %	-2,81600*	0,01252	0,000	-2,8535	-2,7785
	50 %	-4,36600*	0,01252	0,000	-4,4035	-4,3285
	80 %	-5,26600*	0,01252	0,000	-5,3035	-5,2285

Se pudo observar que $p < 0.05$ en comparaciones entre el ciprofloxacino 5ug y los grupos de experimentación al 30%, 50% y 80%, el cual manifiesta que el ciprofloxacino 5ug muestra un efecto inhibitorio significativamente mayor que los experimentales en todas las concentraciones frente *Escherichia coli* ATCC 25922. Además, se observa que $p < 0.05$ entre (DMSO) y los grupos experimentales, lo cual evidencia que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos a favor de los grupos en experimentación.

Decisión: Por tal motivo, se acepta la hipótesis alterna H1.

c) Hipótesis Específica N° 03

H0: El efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (Romero) no es significativamente mayor comparado con ciprofloxacino 5ug sobre *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

H1: El efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (Romero) es significativamente mayor comparado con ciprofloxacino 5ug sobre *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Se puede apreciar que, para *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922, las medias de los diámetros de inhibición a diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (romero) son menores en comparación a los logrados por el ciprofloxacino 5ug. Esto muestra que el agente antibacteriano utilizado como referencia positiva presenta una media de inhibición más amplia (35,4320 y 38,0080 mm) respectivamente frente a los grupos de experimentación.

Tabla 10. Prueba de subconjuntos frente *Salmonella Enterica* ATCC 51741

HSD Tukey ^a						
Grupo	N	1	2	3	4	5
DMSO	5	6,0000				
30 %	5		9,0020			
50 %	5			9,6060		
80 %	5				10,4840	
Ciprofloxacino 5ug	5					35,4320

Tabla 11. Prueba de subconjuntos frente *Escherichia coli* ATCC 25922

HSD Tukey ^a						
Grupo_	N	1	2	3	4	5
DMSO	5	6,0000				
30 %	5		8,8160			
50 %	5			10,3660		
80 %	5				11,2660	
Ciprofloxacino 5ug	5					38,0080

Decisión: Por tal motivo, se acepta la hipótesis nula (H0).

IV. DISCUSIÓN

IV.1. Discusión de resultados

La resistencia a los tratamientos por parte de *Salmonella Enterica* ATCC 51741 y *Escherichia Coli* ATCC 25922 constituye un desafío de alcance mundial en el ámbito de la microbiología y la salud pública. Estas bacterias patógenas han adquirido capacidad de resistencia a terapias convencionales, como antibióticos y agentes antimicrobianos. Este fenómeno se ve influido por factores como la exposición prolongada a estos tratamientos y la presión selectiva inducida por su uso descontrolado. Esta problemática complica la gestión de infecciones causadas por estas bacterias, generando un significativo obstáculo en la lucha contra las enfermedades infecciosas en todo el mundo.

De acuerdo con el objetivo general, se identificó que el extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. presentó efecto antibacteriano en las concentraciones de (30%, 50% y 80%) frente *Salmonella Enterica* ATCC 51741 con halos de (9,0020; 9,6060 y 10,4840 mm); y frente *Escherichia Coli* ATCC 25922 con halos de (8,8160; 10,3660 y 11,2660 mm) en las concentraciones del (30%, 50% y 80%). Semejante al estudio de **Milyuhina A. et al** (2021), quienes al analizar el efecto bactericida de *Rosmarinus officinalis* L. frente bacterias grampositivas y gramnegativas, encontraron que a una disolución de 1:0, el extracto manifestó un halo de 17 mm inhibiendo el crecimiento de la cepa *Escherichia coli* (18). La concordancia en los resultados se debe a las propiedades antibacterianas inherentes de *Rosmarinus officinalis* L., respaldadas por su composición química rica en compuestos bioactivos. Ambos estudios evaluaron el mismo extracto y concentraciones similares, empleando cepas bacterianas estándar, lo que contribuye a la consistencia de los resultados. Así mismo coincide con el estudio de **Quipuzco, E** (2019), quien al evaluar la capacidad antibacteriana del extracto etanólico de *Rosmarinus Officinalis* frente una bacteria ATCC de referencia, obtuvo que en concentraciones del 50% y 75%, estos presentaron halos de 23.78 mm y 27.88 mm respectivamente, inhibiendo el crecimiento de la bacteria (20). La coincidencia en los resultados se debe a la uniformidad en las concentraciones, cepas bacterianas de referencia, controles y técnicas de medición utilizados en ambos estudios, minimizando variables que puedan afectar los resultados.

Respecto al objetivo específico 1, en el tamizaje fitoquímico, se obtuvo compuestos fenólicos, alcaloides, taninos, flavonoides, lactonas α , β -insaturadas, antocianinas y azúcares reductores. El mismo que coincide con el estudio de **Gonzales F y Mendoza M** (2022), quienes al evaluar el tamizaje fitoquímico de hojas de romero encontraron metabolitos secundarios: flavonoides, saponinas, alcaloides y antraquinonas (22). La coincidencia se debe a la aplicabilidad de métodos de análisis estandarizados en ambos estudios y la composición química típica de *Rosmarinus Officinalis* L, que resulta en la detección constante de los mismos compuestos.

Respecto al objetivo específico 2, se identificó que el extracto etanólico de las hojas de romero presentó actividad bactericida concentraciones del 30%, 50% y 80% frente *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Resultados que son semejantes a los obtenidos por **Altamirano, D** (2019), quien al evaluar la actividad antibacteriana del extracto de *Rosmarinus officinalis* frente una bacteria ATCC de referencia, obtuvo que la concentración del 100% manifestó un halo de 9,6 mm frente la cepa (16). La actividad antibacteriana se debe a la presencia de compuestos activos en el extracto etanólico de *Rosmarinus Officinalis* L., que pueden interferir con las funciones bacterianas, lo que resulta en la inhibición del crecimiento bacteriano en diversas concentraciones. De igual manera coincide con el estudio de **Bustamante, M y Cabrera, E** (2021), quienes al evaluar la sensibilidad de las cepas de *Escherichia coli* frente al extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus officinalis*, obtuvieron que la concentración del 100% manifestó alta sensibilidad frente la cepa (21). El efecto inhibitor a una concentración particular del extracto se debe a la acción de los compuestos bioactivos presentes, como los fenoles y flavonoides, que interfieren en procesos bacterianos vitales, como la membrana celular y la replicación del ADN. Resultando en la inhibición del crecimiento bacteriano.

Respecto al objetivo específico 3, se evidenció que las medias de los halos en concentraciones de (30%, 50% y 80%) del extracto etanólico de las hojas de romero frente *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922 fueron menores en comparación a los logrados por el ciprofloxacino 5 μ g. El cual exhibió un diámetro de inhibición mayor con (35,4320 y 38,0080 mm). El mismo que coincide con el estudio de **Gonzales F y Mendoza M** (2022), quienes al evaluar la

actividad antibacteriana de las hojas de romero frente a bacterias ATCC, obtuvieron que las concentraciones del 20%, 40%, y 60% mostraron halos de (9,19 mm, 11,14 mm y 15,19 mm), respectivamente, sin embargo, fueron menores al efecto inhibitor de cefuroxima 30 µg el cual manifestó un halo de 30,45 mm (22). La superioridad del control positivo en la inhibición bacteriana en comparación con los extractos podría deberse a la concentración más alta de agentes antimicrobianos en los controles, así como a la mayor potencia y especificidad de los antibióticos sintéticos utilizados.

La actividad antibacteriana de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) es un tema de gran relevancia en la actualidad, ya que esta planta medicinal ha demostrado poseer propiedades que pueden desempeñar un papel significativo en la lucha contra las infecciones bacterianas, lo que sugiere su potencial utilidad en la prevención y tratamiento de enfermedades causadas por bacterias patógenas. Además, dado el creciente problema de resistencia a los antibióticos, el uso de productos naturales como el romero podría representar una alternativa prometedora en la búsqueda de soluciones efectivas y sostenibles en el ámbito de la salud. La investigación continua en este campo es esencial para aprovechar al máximo las propiedades antibacterianas de *Rosmarinus officinalis* y avanzar en la comprensión de su potencial terapéutico.

IV.2. Conclusiones

- Se concluye que el extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (romero) presentó efecto antibacteriano in vitro frente *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922
- Los análisis fitoquímicos desarrollados demuestran abundante presencia (+++), de compuestos fenólicos, alcaloides, taninos y flavonoides; seguido de lactonas α , β -insaturadas, antocianinas y azúcares reductores
- Todas las concentraciones (30%, 50% y 80%) del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (romero) presentaron efecto antibacteriano frente *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Se concluye que las medias de las concentraciones del (30%, 50% y 80%) del extracto etanólico de las hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. (romero) frente *Salmonella enterica* ATCC 51741 y *Escherichia coli* ATCC 25922 fueron menores a ciprofloxacino 5ug (35,4320 y 38,0080 mm) respectivamente.

IV.3. Recomendaciones

- Se sugiere ampliar el alcance de la investigación para evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Rosmarinus Officinalis L.* en un espectro más amplio de cepas bacterianas patógenas. Esto permitiría obtener una comprensión más completa de su potencial antimicrobiano.
- Se recomienda realizar pruebas in vivo para validar los hallazgos in vitro. Estudios en modelos animales pueden proporcionar información valiosa sobre la eficacia y la seguridad del extracto de romero como agente antibacteriano.
- Se recomienda llevar a cabo pruebas de toxicidad para evaluar la seguridad del extracto de romero en células humanas y determinar posibles efectos adversos.
- Se sugiere investigar los posibles mecanismos de acción involucrados en la actividad antibacteriana del extracto de romero. Esto podría incluir la evaluación de su impacto en la integridad de la membrana celular bacteriana o la interferencia con procesos metabólicos.
- Es importante destacar la importancia de continuar la investigación en el área de propiedades antibacterianas de extractos naturales como el romero. Este estudio proporciona una base sólida, no obstante, existen numerosas oportunidades para explorar aún más las aplicaciones terapéuticas y los mecanismos subyacentes de estos extractos en la lucha contra infecciones bacterianas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Organización Mundial de la Salud (OMS). Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. OMS. 2023. Available from: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance#>
2. Organización Panamericana de la Salud. Situación de las plantas medicinales en Perú. Lima; 2019.
3. Giono S, Santos J, Morfín M, Torres F, Alcántar M. Resistencia antimicrobiana. Importancia y esfuerzos por contenerla. *Gac Med Mex*. 2020;156(2):172–80.
4. Organización Mundial de la Salud (OMS). La OMS lanza una iniciativa mundial para reducir a la mitad los errores relacionados con la medicación en cinco años [Internet]. OMS. 2017AD. Available from: <https://www.who.int/es/news/item/29-03-2017-who-launches-global-effort-to-halve-medication-related-errors-in-5-years>
5. OPS. Salmonella: En la mira de las entidades de vigilancia [Internet]. Organización Panamericana de la Salud. 2022. Available from: [https://www.paho.org/es/noticias/4-11-2022-salmonella-mira-entidades-vigilancia#:~:text=4 Nov 2022 — Según la,RAM\) que se expande rápidamente.](https://www.paho.org/es/noticias/4-11-2022-salmonella-mira-entidades-vigilancia#:~:text=4 Nov 2022 — Según la,RAM) que se expande rápidamente.)
6. Berrocal M, Ruiz D, Gutierrez M, Olivares J. Comportamiento epidemiológico de *Salmonella* sp. en alimentos de origen vegetal por región intercontinental. *Rev Mex ciencias Agric*. 2023;1(1).
7. Statista Research Department. Ranking de los países europeos con mayor número de casos de salmonelosis en 2022 [Internet]. 2023. Available from: <https://es.statista.com/estadisticas/627400/numero-de-casos-de-salmonelosis-en-europa-por-pais/>
8. Clinic M. Gastroenteritis vírica (gripe estomacal) [Internet]. Mayo Clinic Family Health Book. 2023. Available from: <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/viral-gastroenteritis/symptoms-causes/syc-20378847>

9. Paredes et al. Prevalencia y resistencia a los antimicrobianos de *Escherichia coli* y *Salmonella* spp. en los alimentos para animales en Colombia [Internet]. Organización Panamericana de la Salud. 2018. Available from: <https://www.paho.org/journal/es/articulos/prevalencia-resistencia-antimicrobianos-escherichia-coli-salmonella-spp-alimentos-para>
10. Centro para el control y la prevención de enfermedades. La *Salmonella* y los alimentos [Internet]. 2023. Available from: <https://www.cdc.gov/foodsafety/es/communication/salmonella-and-food-sp.html#:~:text=La enfermedad causada por la Salmonella puede ser grave.&text=Incluyen diarrea que puede tener,ser hospitalizadas o tomar antibióticos.>
11. Mayo Clinic Healthy book. Infección por salmonela [Internet]. Mayo Clinic. 2023. Available from: <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/salmonella/symptoms-causes/syc-20355329>
12. Palpa D, Fernandez C. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Muehlenbeckia tamnifolia* (kunth) Meisner (GUANO) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. 2020.
13. Luque, V. Mendiguete M. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la cáscara de *Citrus limetta* risso (lima) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 [Internet]. [Tesis de bachiller] Universidad Interamericana; 2021. Available from: <http://repositorio.unid.edu.pe/handle/unid/73?show=full>
14. Gonzalez A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas [Internet]. Tesis de pregrado[Universidad Nacional de Colombia]; 2015. Available from: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_2469_C.pdf
15. Flores E, Saénz A, Castañeda A, Narro R. Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): su origen, importancia y generalidades de sus metabolitos secundarios. *Rev Espec en Ciencias Químico-Biológicas*. 2020;23(1):1–17.
16. Altamirano D. Actividad Antibacteriana de extractos vegetales de *Rosmarinus*

- officinalis, *Zingiber officinale* y *Cinnamomum zeylanicum* contra el *Enterococcus faecalis*. Tesis de pregrado [Universidad Nacional de Chimborazo]; 2019.
17. Duarte L. Determinación de la actividad antibacteriana y fitotoxicidad de los aceites esenciales de Anís (*Pimpinella anisum*) y Romero (*Rosmarinus officinalis*). Tesis de pregrado [Universidad Santo Tomás, Bucaramanga]; 2020.
 18. Milyuhina A, Zabodalova L, Kyzdarbek U, Romazyayeva I, Klyuchko N. In vitro antibacterial and antioxidant activity of *Rosmarinus officinalis*. E3S Web Conf. 2021;1(1):1–5.
 19. Núñez E. “Evaluación del efecto antibacteriano de los extractos de plantas medicinales del Ecuador.” Tesis pregrado [Universidad Técnica de Ambato]; 2019.
 20. Quipuzco E. Comparación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos hidroetanólicos de *Rosmarinus Officinalis* (Romero) y *Foeniculum Vulgare* (Hinojo) frente a Cepas de *Streptococcus Mutans* ATCC 25175. Tesis pregrado [Universidad Uladech Católica]; 2019.
 21. Bustamante M, Cabrera E. Efecto Antibacteriano in vitro de los extractos etanolicos de *Rosmarinus officinalis* (Romero) y *Mentha spicata* (Hierba Buena) sobre *Escherichia coli*”. Tesis pregrado [Universidad Roosevelt]; 2021.
 22. Gonzales F, Mendoza M. 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. Universidad María Auxiliadora; 2022.
 23. Hernandez R, Mendoza C. Metodología de la Investigación. Ciudad de México: Mc Graw Hill; 2018. 714 p.
 24. Baena G. Metodología de la Investigación. 3 ed. Grupo Editorial Patria; 2017. 141 p.

25. OPS/OMS. Educación en inocuidad de alimentos: Clasificación de la investigación [Internet]. 2023. Available from: https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10484:educacion-inocuidad-alimentos-clasificacion-de-investigacion&Itemid=41279&lang=es
26. Corona L, Fonseca M. Acerca del carácter retrospectivo o prospectivo en la investigación científica [Internet]. Medisur. 2021. Available from: <http://medisur.sld.cu/index.php/medisur/article/view/4501>
27. Maravi I, Palomino K. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de la semilla de Persea americana (palta) en cepas de Staphylococcus aureus ATCC 25923. Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2019.
28. Nakamura Y, Takahashi H, Takaya A, Inoue Y, Saito N. HHS Public Access. Sci Transl Med. 2021;12(551).

ANEXOS

ANEXO A. Instrumentos de recolección de datos

Tabla 12. Ensayo microbiológico

Salmonella Enterica ATCC 51741					
N°	Etanol	Ciprofloxacino 5 ug	Ext 30 %	Ext 50 %	Ext 80%
1					
2					
3					
4					
5					
Escherichia Coli ATCC 25922					
1					
2					
3					
4					
5					

Tabla 13. Marcha Fitoquímica del extracto etanólico

Metabolitos secundarios	Reactivos	Resultado
Quinonas	Borntrager	
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	
Flavonoides	Shinoda	
Antocianinas	Naoh 10%	
Taninos	Gelatina	
Taninos	Gelatina Sal	
Alcaloides	Dragendorff	
Alcaloides	Wagner	
Alcaloides	Mayer	
Triterpenos y Esteroides	Liebermann Burchard	
Lactonas α, β insaturadas	Baljet	
Azucares Reductores	Benedict	
Azucares Reductores	Fehling	
Saponinas	Espuma	

ANEXO B. Matriz de consistencia

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis
Problema General	Objetivo General	Hipótesis General
¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. (Romero) frente <i>Salmonella enterica</i> ATCC 51741 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922?	Determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. (Romero) frente <i>Salmonella enterica</i> ATCC 51741 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	El extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. (Romero) presenta efecto antibacteriano in vitro frente <i>Salmonella enterica</i> ATCC 51741 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
Problemas Específicos	Objetivos Específicos	Hipótesis Específicas
¿Qué tipo de metabolitos secundarios responsables del efecto antibacteriano in vitro posee el extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. (Romero)?	Identificar los tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. (Romero) responsables del efecto antibacteriano in vitro	El extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. (Romero) posee metabolitos secundarios responsables de actividad antibacteriana in vitro.
¿El extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. (Romero) tiene efecto antibacteriano in vitro frente <i>Salmonella enterica</i> ATCC 51741 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en la concentración del 30%, 50% y 80%?	Determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. (Romero) frente <i>Salmonella enterica</i> ATCC 51741 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en la concentración del 30%, 50% y 80%	El extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. (Romero) presenta efecto antibacteriano in vitro frente <i>Salmonella enterica</i> ATCC 51741 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en la concentración del 30%, 50% y 80%
¿Cuál es el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. (Romero) comparado con ciprofloxacino 5ug sobre <i>Salmonella enterica</i> ATCC 51741 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922?	Comparar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. (Romero) con ciprofloxacino 5ug sobre <i>Salmonella enterica</i> ATCC 51741 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	El efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. (Romero) es significativamente mayor comparado con ciprofloxacino 5ug sobre <i>Salmonella enterica</i> ATCC 51741 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922

ANEXO C. Operacionalización de las variables

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN	Nº DE ÍTEMS	VALOR
<p>VARIABLE INDEPENDIENTE</p> <p>Extracto etanólico de las hojas de <i>Rosmarinus Officinalis</i> L. (Romero)</p>	Fitoquímica	Marcha fitoquímica	Ordinal	13	<p>(-) Ausente (+) Leve (++) Moderado (+++) Abundante</p>
<p>VARIABLE DEPENDIENTE</p> <p>Efecto antibacteriano in vitro sobre <i>Salmonella enterica</i> ATCC 51741 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p>	<p>Microbiológico</p> <p>(Método de difusión en agar)</p>	Medición de diámetro inhibición (mm)	Razón	10	<p><8 mm: nulo (-) 8 – 14 mm: Sensibilidad baja o límite (+) 14 – 20 mm: Sensibilidad media (++) >20 mm: Sumamente sensible (+++)</p>

ANEXO D. Certificado Taxonómico

José R. Campos de la Cruz
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. 3796
Cel: 963689079
Email: jocamde@gmail.com



CERTIFICACION DE IDENTIFICACION BOTANICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO. CBP 3796 – INSCRITO EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIONES DE IDENTIFICACION TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA – RESOLUCIÓN DIRECTORAL Nº 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:

Que, los Bachilleres NARVAEZ MATENCIO, KATHERINE IVET y QUIROZ MODESTO, MARIA MILENA tesistas de la Universidad María Auxiliadora, Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica, con fines de investigación para desarrollar el proyecto de tesis titulado: EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Rosmarinus officinalis* L. (ROMERO) FRENTE *Salmonella Enterica* ATCC 51741 Y *Escherichia Coli* ATCC 25922, han solicitado la identificación y certificación botánica de una planta procedente del departamento de Huánuco, provincia de 2 de Mayo, distrito de La Unión, donde es cultivada con el nombre vulgar de “romero”, la muestra ha sido identificada como *Rosmarinus officinalis* L. Según la base de datos W³Tropicos del Missouri Botanical Garden, que siguen el sistema moderno de clasificación de las angiospermas (APG), publicado en 1998 por el Grupo para la Filogenia de las Angiospermas, revisado por APG II (2003), APG III (2009), actualizado por APG IV (2016), el sistema APG evita el uso de la nomenclatura taxonómica clásica por arriba de orden. Chase & Reveal en APG III (2009) consideran a todas las plantas verdes en la Clase Equisetopsida. Teniendo en cuenta los datos de W³Tropicos, APG III y APG IV, para la especie identificada se adapta las siguientes categorías taxonómicas y clados:

Reino: Plantae
División: Angiospermas
Clase: Equisetopsida
Subclase: Magnoliidae
Superorden: Asteranae
Orden: Lamiales
Familia: Lamiaceae
Género: *Rosmarinus*
Especie: *Rosmarinus officinalis* L.

Nombre vulgar: Romero

Se expide la presente certificación para fines de investigación científica.

Lima, 24 de octubre del 2023



Jr. Sánchez Silva 156 – Piso 2–Urb. Santa Luzmila –Lima 07 -Lima

ANEXO E. Informe de análisis de laboratorio



"Año de la unidad, la paz y el desarrollo"

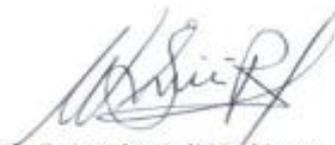
Informe de Resultados

Solicitado por: Narvaez Matencio, Katherine Ivet
Quiroz Modesto, Maria Milena
Muestra: Extracto hidroalcoholico de las hojas de *Rosmarinus officinalis* l.
Fecha de ensayo: 21-10-2023

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm				
	80%	50%	30%	Ciprofloxacino 5 µg	DMSO
<i>Salmonella enterica</i> ATCC 51741	10.50	9.61	8.79	35.42	6
	10.36	9.56	8.80	35.40	6
	10.52	9.61	8.82	35.43	6
	10.54	9.64	8.81	35.49	6
	10.50	9.61	9.79	35.42	6
	80%	50%	30%	Ciprofloxacino 5 µg	DMSO
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	11.28	10.36	8.83	38.05	6
	11.25	10.39	8.80	37.99	6
	11.26	10.36	8.84	38.03	6
	11.28	10.37	8.81	37.96	6
	11.26	10.35	8.80	38.01	6

*Tamaño de pozo: 6mm, por lo que al reportarse 6 mm es indicativo que no existe formación halo de inhibición

*Concentración del inoculo: 1.5×10^8 UFC/mL



Dr. T.M. Walter A. Siri Rodriguez
CTMP. 10808

ANEXO F. Certificado de Agar Mueller Hinton



Page 1 of 3

CERTIFICATE OF ANALYSIS

PRODUCT CM0337B
MUELLER HINTON AGAR 500g

LOT NUMBER 3681362

EXPIRY DATE 2028.06.05

DATE OF MANUFACTURE 2023.06.07

Delivery/Customer information

Date Printed
 2023.06.30

Delivery No.

Customer
 Customer Order Number

Physical Characteristics	Results	Specification
Appearance	Straw powder	Straw powder
Colour on reconstitution	Straw 2-3	Straw 2-3
pH (25°C)	7.3	7.2 - 7.4
Clarity	Clear	Clear

Microbiological Performance

Antibiotic susceptibility tests are performed in accordance with, and meet the acceptance limits of, the current ISO/TS 16782. Performance is assessed using EUCAST methodology.

Staphylococcus aureus ATCC®25923 WDCM00034

Incubation at 35 ± 1°C for 16-20 hours in ambient air

	Zone Size (mm)	Limits (mm)
Erythromycin E15	29	22 - 30
Tetracycline TE30	27	24 - 30
Ciprofloxacin CIP5	26	22 - 30
Amoxicillin-clavulanate AMC30	34	28 - 36
Ampicillin-sulbactam SAM20	35	29 - 37
Linezolid LZD30	25	25 - 32
Cefoxitin FOX30	29	23 - 29
Gentamicin CN10	26	19 - 27
Penicillin P10	35	26 - 37

Staphylococcus aureus ATCC®29213 WDCM00131

Incubation at 35 ± 1°C for 16-20 hours in ambient air

	Zone Size (mm)	Limits (mm)
Penicillin P1	15	12 - 18
Cefoxitin FOX30	28	24 - 30
Ciprofloxacin CIP5	22	21 - 27
Erythromycin E15	25	23 - 29
Gentamicin CN10	22	19 - 25
Linezolid LZD10	22	21 - 27
Tetracycline TE30	26	23 - 31



Tested by the Quality Control Laboratory
OXOID LIMITED
 Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG24 8PW, England
oxoid@thermofisher.com www.oxoid.com

FDA Reg No. 8010095

Certificate No. FM 02214

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

PRODUCT CM0337B
LOT NUMBER 3681362
MUELLER HINTON AGAR 500g

Staphylococcus aureus ATCC®43300 WDCM00211
 Incubation at 35 ± 1°C for 24 hours in ambient air

	Zone Size (mm)	Limits (mm)
Cefoxitin FOX30	11	<21

Staphylococcus aureus NCTC12493 WDCM00212
 Incubation at 35 ± 1°C for 24 hours in ambient air

Cefoxitin FOX30	20	14 - 20
-----------------	----	---------

Escherichia coli ATCC®25922 WDCM00013

Incubation at 35 ± 1°C for 16-20 hours in ambient air

Ampicillin AMP10	16	15 - 22
Chloramphenicol C30	24	21 - 27
Gentamicin CN10	20	19 - 26
Trimethoprim-sulfamethoxazole SXT25	29	23 - 29
Amoxicillin-clavulanate AMC30	20	18 - 24
Ciprofloxacin CIP5	33	30 - 40
Sulfisoxazole SF300	21	15 - 23
Tetracycline TE30	22	18 - 25
Cefotaxime CTX5	28	25 - 31
Tigecycline TGC15	22	20 - 27

Escherichia coli ATCC®35218

Incubation at 35 ± 1°C for 16-20 hours in ambient air

Amoxicillin-clavulanate AMC30	20	17 - 22
-------------------------------	----	---------

Pseudomonas aeruginosa ATCC®27853 WDCM00025

Incubation at 35 ± 1°C for 16-20 hours in ambient air

Gentamicin CN10	19	16 - 21
Imipenem IPM10	22	20 - 28
Aztreonam ATM30	24	23 - 29
Ciprofloxacin CIP5	25	25 - 33
Tobramycin TOB10	23	19 - 25
Ceftazidime CAZ10	24	21 - 27
Piperacillin-tazobactam TZP36	25	23 - 29

Enterococcus faecalis ATCC®33186 WDCM00210

Incubation at 35 ± 1°C for 16-20 hours in ambient air

Trimethoprim-sulfamethoxazole SXT25	25	20 -
-------------------------------------	----	------

Enterococcus faecalis ATCC®29212 WDCM00087

Incubation at 35 ± 1°C for 16-20 hours in ambient air

Ampicillin AMP2	18	15 - 21
Imipenem IPM10	26	24 - 30
Linezolid LZD10	22	19 - 25
Nitrofurantoin F100	22	18 - 24



Tested by the Quality Control Laboratory
 OXOID LIMITED

Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG24 8PW, England
 oxoid@thermofisher.com www.oxid.com

FDA Reg No. 8010095

Certificate No. FM 09214

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

PRODUCT CM0337B
MUELLER HINTON AGAR 500g
LOT NUMBER 3681362

Trimethoprim W5	30	24 - 32
Trimethoprim-sulfamethoxazole SXT25	31	26 - 34
Vancomycin VA5	13	10 - 16

***Streptococcus pneumoniae* ATCC®49619**

Enriched with 5% v/v horse blood and 20mg/L β-NAD

Incubation at 35 ± 1°C for 18-20 hours in 5% CO₂

	Zone Size (mm)	Limits (mm)
Vancomycin VA5	21	<23

***Haemophilus influenzae* ATCC®49247**

Enriched with 5% v/v horse blood and 20mg/L β-NAD

Incubation at 35 ± 1°C for 18-20 hours in 5% CO₂

Ampicillin AMP2	10	6 - 12
-----------------	----	--------

***Haemophilus influenzae* ATCC®49766**

Enriched with 5% v/v horse blood and 20mg/L β-NAD

Incubation at 35 ± 1°C for 18-20 hours in 5% CO₂

Cefixime CFM5	31	29 - 35
---------------	----	---------

Control Medium: Mueller-Hinton Agar

Refer to product specification for full details.

The information given is believed to be correct, all results reported in this certificate relate only to the product and lot stated in this certificate of analysis. However, both the information and the product are offered without warranty for any application other than that specified in the current Oxoid Manual. This certificate shall not be reproduced except in full, without written approval of the Quality Control Laboratory, Oxoid Limited, Basingstoke.

The results reported were obtained at the time of release.

Lot Accepted. 2023.06.16

.....
Carissa Courtney
Director Quality, EMEA

ATCC is a registered trade mark of the American Type Culture Collection.

NCTC and National Collection of Type Cultures are registered trade marks of the Health Protection Agency.



Tested by the Quality Control Laboratory
OXOID LIMITED
Wade Road, Basingstoke, Hampshire RG24 8PW, England
oxid@thermofisher.com www.oxid.com

FDA Reg No. 8010095

Certificate No. FM 09914

ANEXO G. Certificado de análisis de Cepa *Salmonella Enterica* ATCC 51741



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Salmonella enterica subsp. enterica Catalog Number: 0501 Lot Number: 501-20** Reference Number: ATCC® 51741™* Passage from Reference: 2	Expiration Date: 2023/12/31 Release Information: Quality Control Technologist: Madison C Vogt Release Date: 2022/1/18
---	--

Performance	
Macroscopic Features: Large, raised, entire to erose edge, gray, rough. Microscopic Features: Gram negative straight rod with rounded ends.	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative Hektoen Enteric Agar: good growth, green colonies  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	No Organism Identification Possible	(-)	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: 2022-01-12T09:03:12.865 MCV

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

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
C5 (+++) (A)	501-20	Salmonella sp	2.23

Comments:

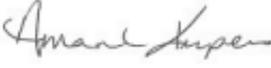
Salmonella can only be identified on genus level.

ANEXO H. Certificado de análisis de Cepa *Escherichia coli* ATCC 25922



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p>SPECIFICATIONS:</p> <p>Product Name: Escherichia coli</p> <p>Catalog Number: 0335</p> <p>Lot Number: 335-550**</p> <p>Reference Number: ATCC® 25922™*</p> <p>Passage from Reference: 2</p> <p>Expiration Date: 2024/08/31</p>	<p>RELEASE INFORMATION:</p> <p>Quality Control Technologist: Jacob A Lohman</p> <p>Release Date: 2022/09/23</p>
---	--

Performance	
<p>Macroscopic Features:</p> <p>2 colony types, both are gray & beta hemolytic: one is circular to irregular, convex, slightly erose edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge & rough</p> <p>Microscopic Features:</p> <p>Gram negative straight rod</p>	<p>Medium:</p> <p>SBAP</p> <p>Method:</p> <p>Gram Stain (1)</p>
<p>ID System: MALDI-TOF (1)</p> <p>See attached ID System results document.</p>	
<p>Other Features/ Challenges: Results</p> <p>(1) Oxidase (Kovacs): negative</p> <p>Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive</p> <p>(1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 15 - 22 mm</p> <p>(1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm</p> <p>(1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm</p>	
 Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE	
<p>**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.</p> <p><u>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</u></p> <p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p> <p>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.</p>	
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;">  TESTING CERT #2655.01 </div> <div style="text-align: center;">  </div> </div>	
<p>(*) 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.</p>	
 REFERENCE MATERIAL PRODUCER CERT #2655.02	

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	No Organism Identification Possible	(-)	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 highconfidence 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: 2022-09-19T09:16:39.647 JAL

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

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
A3 (+++) (A)	335-550	Escherichia coli	2.27

Comments:

closely related to Shigella / Escherichia fergusonii and not definitely distinguishable at the moment

ANEXO I. Evidencias fotográficas



Figura 1. Muestra de tipo Hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero)



Figura 2. Selección y limpieza de la muestra



Figura 3. Lavado de la muestra



Figura 4. Procedimiento de secado de la muestra



Figura 5. Procedimiento de molienda de la muestra



Figura 6. Preparación del macerado del extracto etanólico



Figura 7. Procedimiento de filtración del macerado del extracto etanólico

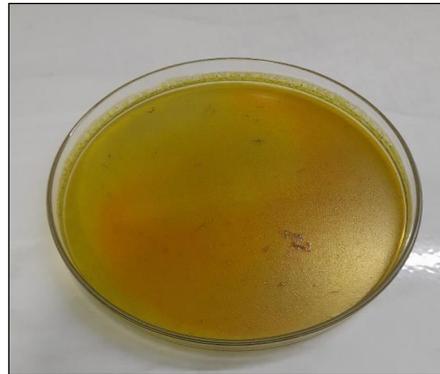


Figura 8. Obtención de extracto seco

PRUEBA DE SOLUBILIDAD



Figura 9. Añadiendo extracto seco al tubo de ensayo para prueba de solubilidad

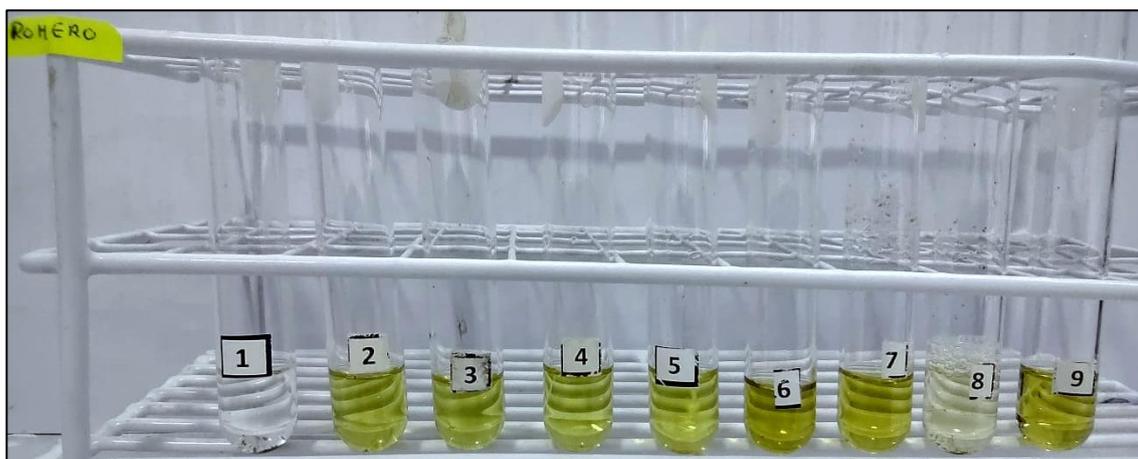


Figura 10. Resultado de prueba de solubilidad

MARCHA FITOQUÍMICA



Figura 11. Adición de extracto a los tubos de ensayo

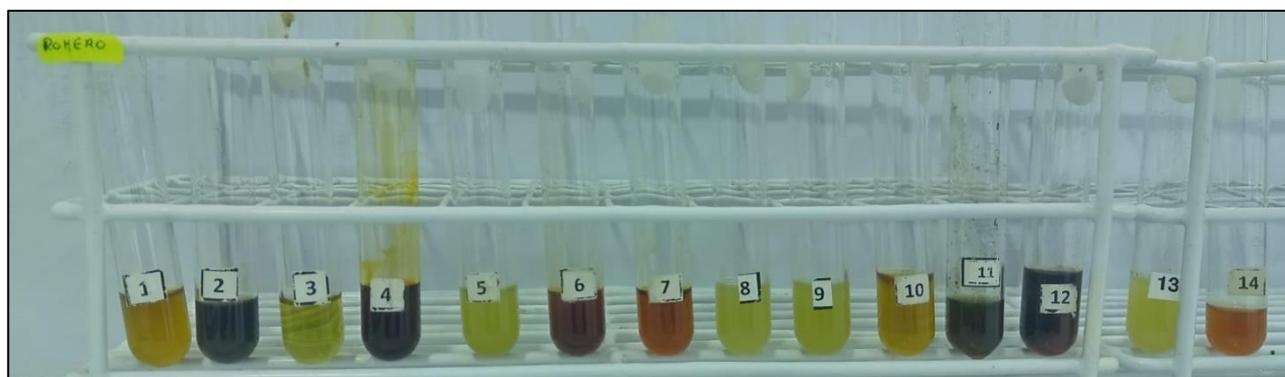


Figura 12. Resultado de la marcha fitoquímica

ENSAYO MICROBIOLÓGICO

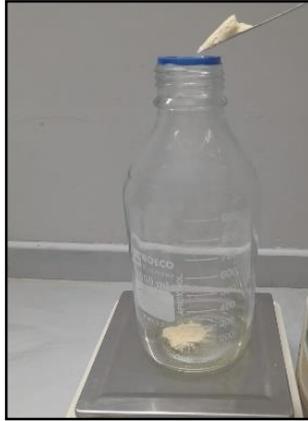


Figura 13. Agar Mueller Hinton



Figura 14. Autoclave para el uso en la prueba microbiológica

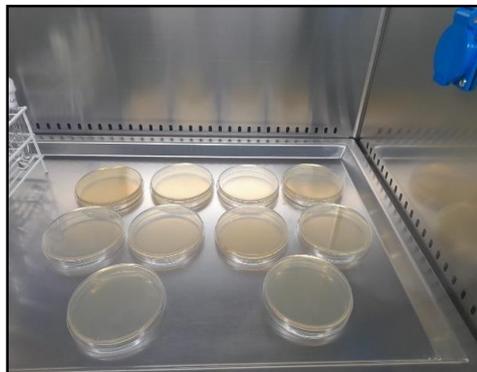


Figura 15. Placas preparadas



Figura 16. Activación de las cepas con Kwik-stik microbiologics



Figura 17. Cepas biológicas de tipo: *Salmonella enterica* y *Escherichia coli*



Figura 18. Preparación del inóculo de *E. Coli*

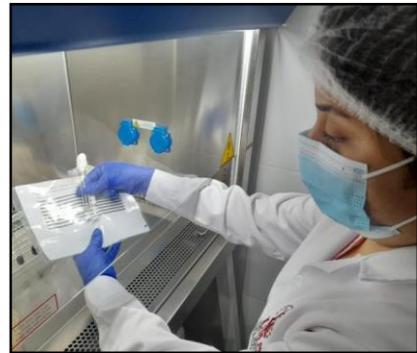


Figura 19. Preparación del inóculo de *S. enterica*



Figura 20. Rotulado de placas



Figura 22. Sembrado de placas para *E. coli*



Figura 21. Sembrado de placas para *S. enterica*



Figura 23. Efectuando pozos en agar con ayuda de un sacabocado

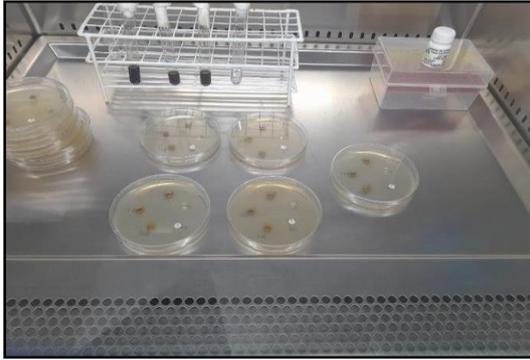


Figura 25. Placas con *S. enterica*

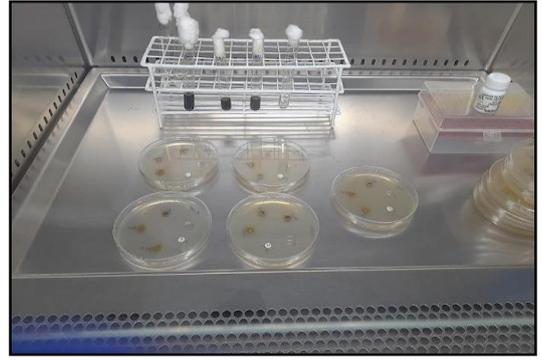


Figura 24. Placas con *E. coli*



Figura 26. Incubación de placas

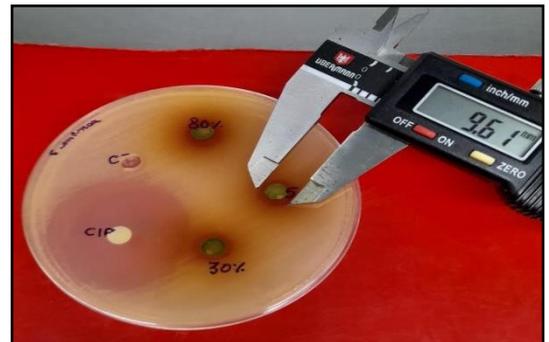
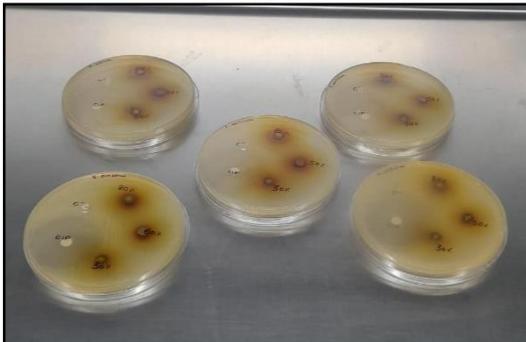


Figura 27. Lectura de resultados *S. enterica*

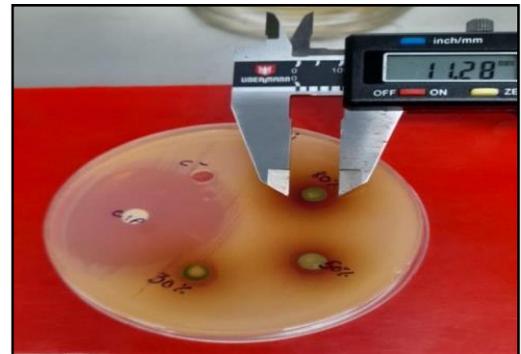
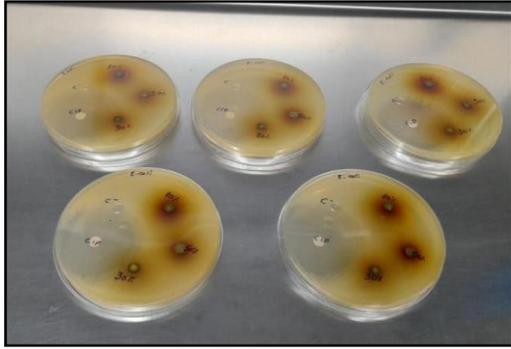


Figura 28. Lectura de resultados *E. Coli*

ANEXO J. Porcentaje de rendimiento

Determinación del porcentaje de rendimiento

Tenemos la cantidad de producto obtenido en la extracción química.

$$\%E = \frac{Pf}{Pi} \times 100$$

Dónde: %E = porcentaje de rendimiento

Pf = peso final (extracto seco)

Pi = peso inicial (muestra molida)

Fuente: Efecto de los extractos secos clorofórmico y de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* (Ruiz & Pavón) mashua sobre los parámetros seminales y toxicidad aguda

<http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v48n1/0034-7418-rccqf-48-01-94.pdf>

Extracción por maceración

$$\%E = \frac{6.4 \text{ g}}{170 \text{ g}} \times 100 = 3.8\%$$

Pf= 6.4 g. extracto seco obtenido

Pi = 170 g muestra molida

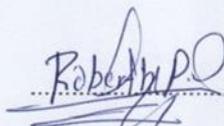
ANEXO K. Carta de autorización para recolección de muestra

CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA LA RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

Yo, Robertth L. Pinzon Peña con DNI: 41700556 en
calidad de responsable de la Parcela Guellaycenche ubicado en el
distrito de la Unión, provincia Z de Mayo y departamento
de Huánuco.

Autorizo a los estudiantes de la **Universidad María Auxiliadora**, de la Escuela Profesional de FARMACIA Y BIOQUÍMICA, **Bach. Narvaez Matencio, Katherine Ivet** y **Bach. Quiroz Modesto, María Milena**, con título de proyecto de investigación, "EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Rosmarinus Officinalis* L. (ROMERO) FRENTE *Salmonella Enterica* ATCC 51741 Y *Escherichia Coli* ATCC 25922", para que puedan recolectar la muestra correspondiente.

Lima, 01 de setiembre del 2023


.....
Firma