

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN, TACNA

FACULTAD DE CIENCIAS

Escuela Académico Profesional de Biología- Microbiología

Evaluación antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de

***Rosmarinus officinalis* L. “romero” frente a bacterias**

patógenas Grampositivas y Gramnegativas.

TESIS

Presentada por:

Bach. Roberto Germán Rondón Pérez.

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA-PERÚ

2013

MIEMBROS DEL JURADO CALIFICADOR

Msc. Roberto Castellanos Cabrera
PRESIDENTE

Msc. Pablo Juan Franco Leon
SECRETARIO

Msc. Angela Verónica Choque Miranda
VOCAL

AGRADECIMIENTO

A Dios por llenar mi vida de dicha y bendiciones que a diario me ayudan a ser mejor cada día.

A mis maestros por su disposición y ayuda brindada por sus conocimientos para lograr una buena formación profesional.

A mi asesor Msc. César Julio Cáceda Quiroz, por su colaboración en el desarrollo del presente trabajo.

En general a todas y cada una de las personas que han formado o forman parte importante de mi vida, les agradezco por haberme brindado su apoyo y el ánimo para seguir adelante.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
DEL PROBLEMA	3
1.1. Planteamiento del problema	3
1.2. Objetivos	5
1.2.1. Objetivo general	5
1.2.2. Objetivos específicos	5
1.3. Hipótesis	6
1.4. Operacionalización de variables	6
CAPÍTULO II	
MARCO TEÓRICO	
2.1. Etnobotánica	7
2.2. Historia de <i>Rosmarinus officinalis</i>	8
2.2.1. Difusión y origen	8
2.2.2. Descripción botánica	9
2.2.3. Composición química	9
2.2.4. Clasificación científica	10
2.2.5. Propiedades medicinales y uso tradicional	11
2.3. Antimicrobianos de origen vegetal	13
2.3.1. Modo de acción de los antimicrobianos de origen natural.	14
2.3.2. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos	15
2.4. Aceites esenciales	16
2.4.1. Definición	16
2.4.2. Clasificación	17

2.4.3. Distribución y estado natural	18
2.4.4. Empleo de los aceites esenciales	19
2.4.1. Industria Alimentaria	19
2.4.4.2. Industria Farmacéutica	20
2.4.4.3. Industria de Cosméticos	20
2.4.4.4. Industria de productos de uso veterinario	20
2.4.5. Extracción de los aceites esenciales	21
2.4.5.1. Método de la expresión	21
2.4.5.2. Método de la destilación por arrastre con vapor de agua	21
2.4.5.3. Método de la extracción con solventes volátiles	22
2.4.5.4. Método de enflorado o enfleurage	22
2.4.5.5. Método de extracción con fluidos supercríticos	23
2.4.6. Paredes celulares bacterianas	23
2.4.6.1. Pared celular de las bacterias Grampositivas	24
2.4.6.2. Pared celular de las bacterias Gramnegativas	24
2.4.7. <i>Staphylococcus aureus</i>	25
2.4.7.1. Patogenia	26
2.4.7.2. Estructura antigénica	26
2.4.7.3. Proteína A	27
2.4.7.4. Toxinas estafilococicas	27
2.4.7.5. Enzimas estafilocócicas	28
2.4.7.5.1. Coagulasa	28
2.4.7.5.2. Catalasa	28
2.4.7.5.3. Hialuronidasa	29
2.4.7.5.4. Estafiloquinasas	29
2.4.7.5.5. Lipasas	29
2.4.7.5.6. Penicilinasas	30
2.4.7.6. Epidemiología	30

2.4.8. <i>Escherichia coli</i> .	31
2.4.8.1. Patogenia	32
2.4.8.2. Adhesinas	32
2.4.8.3. Exotoxinas	32
2.4.8.4. Gastroenteritis	33
2.4.8.5. Epidemiología	33
CAPÍTULO III	
MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1. Lugar de estudio	34
3.2. Tipo de estudio	34
3.3. Unidades de estudio	34
3.4. Materiales de laboratorio	35
3.5. Metodología	36
3.5.1. Recolección de <i>Rosmarinus officinalis</i>	36
3.5.2. Secado de <i>Rosmarinus officinalis</i>	37
3.5.3. Obtención del aceite esencial	37
3.5.4. Evaluación de actividad del aceite esencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>	38
3.5.5. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI): Método de la macro dilución en medio líquido	44
3.5.6. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)	48
3.5.7. Diseño experimental	50
3.5.8. Análisis estadístico	50
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS	51
CAPÍTULO V	
DISCUSIÓN	72
CONCLUSIONES	84

RECOMENDACIONES	85
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
FOTOGRAFÍAS	93
ANEXOS	100

RESUMEN

La diversidad vegetal peruana llega aproximadamente a unas 50,000 especies detectadas. Razones sobran para maximizar el aprovechamiento sostenible de nuestros recursos naturales, previamente validados científica y tecnológicamente con los respectivos estudios. El presente trabajo tuvo como objetivo, evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. "romero" frente a bacterias patógenas Grampositivas y Gramnegativas. La planta *Rosmarinus officinalis* se recolectó en el Distrito de Calana, durante el mes de agosto. Para la extracción del aceite esencial, se empleó las hojas y se realizó por arrastre a vapor. Las cepas utilizadas para este ensayo fueron: *Escherichia coli* ATCC 11225 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. La actividad antimicrobiana "*in vitro*" del aceite esencial de esta planta se puso de manifiesto utilizando el método de difusión del disco (Kirby Bauer), con cuatro repeticiones a diferentes concentraciones, obteniéndose de esta manera la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB). Los resultados para la difusión en disco fue para el caso de ***Escherichia coli* ATCC 11225** en el tratamiento T3 con una sensibilidad promedio de 11,5 mm; a partir de ello todo los demás tratamientos fueron sensibles. Para ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** fue en el tratamiento T2 con una sensibilidad

promedio de 11,0 mm y a partir de ello todos fueron sensibles. Los resultados del MIC fue en el caso de ***Escherichia coli* ATCC 11225** de 6,83 mg/ml, para ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** fue de 9,50 mg/ml. Además la CMB fue para ***Escherichia coli* ATCC 11225** de 7,12 mg/ml, para ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** fue de 10,09 mg/ml en la que hay una inhibición total del crecimiento bacteriano. Se concluye que el aceite esencial de ***Rosmarinus officinalis*** presentó compuestos bioactivos, principalmente monoterpenos, con efecto antimicrobiana *in vitro* frente a ***E. coli* ATCC11225** y ***S. aureus* ATCC 25923**.

Palabras Claves: Kirby - Bauer, CMI, CMB, *Escherichia coli* ATCC 11225, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

INTRODUCCIÓN

Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso de plantas en los sistemas de salud, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población utiliza, rutinariamente, la medicina tradicional para sus necesidades de atención primaria a la salud (OMS, 1979). La medicina tradicional en nuestro país es practicada por personas de todo nivel sociocultural, con un uso amplio y variado, basado en plantas medicinales, originalmente los únicos elementos curativos que conocía el hombre, que se han mantenido a través de la historia, sobre todo en zonas rurales remotas o entre minorías étnicas de la sociedad moderna, persistiendo como complemento del hombre pobre o como alternativa a la asistencia médica inaccesible. Sobre todo en centros de culturas aborígenes andino amazónicas supervivientes, donde la medicina moderna sigue siendo desconocida y donde las plantas aún proporcionan las únicas medicinas (Chávez, 1997).

El Perú es conocido como el tercer país megabiodiverso del mundo, siendo catalogado por algunos científicos como el primero o segundo, porque posee una extraordinaria riqueza biológica, fuente natural de

moléculas bioactivas. La diversidad vegetal peruana llega aproximadamente a unas 50 000 especies detectadas, mientras que todo el continente europeo posee 12 000 especies. Razones sobran para maximizar el aprovechamiento sostenible de nuestros recursos naturales, previamente validados científica y tecnológicamente con los respectivos estudios (Brack *et al*, 2002).

Así mismo, las infecciones bacterianas son un problema importante en la práctica médica, por su elevada frecuencia y complicaciones. Dentro de las cuales, las más habituales son *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

La importancia de este estudio radica en evaluar la actividad antimicrobiana de *Rosmarinus officinalis* “romero” con el objeto de validar científicamente las propiedades terapéuticas de esta planta principalmente la hoja; para revalorizar el uso de las plantas medicinales de nuestro medio, brindando un aporte técnico (científico) adecuado a la medicina tradicional. Demostrar el efecto antibacteriano, nos permitirá ofrecer una alternativa importante en el enfoque tradicional del tratamiento de heridas superficiales en la zona rural y promover el diseño del ensayo clínico derivado del presente estudio, luego de la demostración *in Vitro*.

CAPÍTULO I

DEL PROBLEMA

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente en el mundo moderno la población crece aceleradamente y con ella también las enfermedades como las producidas por bacterias, virus, hongos, etc. A pesar que existen muchos antibacterianos para el control o tratamiento, el uso irracional de éstos viene generando resistencia microbiana y otras secuelas. La biodiversidad vegetal ofrece alternativas antibacterianas y algunas especies con excelentes resultados, debido a sus constituyentes químicos.

El uso de las plantas medicinales y la medicina tradicional ha sido reconocido por la Organización Mundial de la Salud que reconoce su importancia en los sistemas de salud en muchos países en vías de desarrollo, instando a los estados y miembros a hacer estudios de las plantas medicinales utilizadas por los curanderos tradicionales y la población para determinar aquellos que tengan un efecto satisfactorio, de manera de incluirlas en la farmacopea nacional.

Entre estas plantas medicinales encontramos a *Rosmarinus officinalis* L. conocida popularmente como “romero”, es una especie originaria de la región mediterránea, rica fuente de metabolitos activos, esta planta es usada en la medicina tradicional por sus efectos digestivos, antiespasmódicos y carminativos y en su uso externo es antirreumático, cicatrizante y estimulante del cuero cabelludo.

Ciertamente las plantas poseen un enorme y desconocido reservorio de sustancias derivado de su sistema de defensa en contra de microorganismos, insectos y herbívoros. Sin embargo, poco se ha explorado sobre su actividad antimicrobiana, lo cual fue objetivo del presente estudio. Es por ello, el interés de conocer la actividad curativa de esta planta. Por lo tanto, asumimos que el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. presenta actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas Grampositivas y Gramnegativas para lo cual se planteó el siguiente problema.

¿Poseerá el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. acción antimicrobiana *in vitro* frente a bacterias patógenas Grampositivas y Gramnegativas?

1.2. OBJETIVOS:

1.2.1. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.* “romero” frente a bacterias patógenas Grampositivas y Gramnegativas.

1.2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer el aceite esencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis L* por el sistema de arrastre a vapor.
- Determinar el grado de sensibilidad *in vitro* que presenta el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L* frente a ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** y ***Escherichia coli* ATCC 11225** mediante la técnica de difusión en disco.
- Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L* frente a ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** y ***Escherichia coli* ATCC 11225**
- Determinar la Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L* frente a ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** y ***Escherichia coli* ATCC 11225**.

1.3. HIPÓTESIS

- El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” tiene actividad antimicrobiana *in vitro* frente a ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** y ***Escherichia coli* ATCC 11225**.

1.4. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES:

VARIABLE	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA
INDEPENDIENTE • Aceite esencial	Cuantitativa	Diámetro del halo de inhibición	Medido en mm.
	Cualitativa	Diámetro del halo de inhibición	Sensible (+), Muy sensible (++) , Sumamente sensible (+++).
DEPENDIENTE	Cepa <i>S. aureus</i> ATCC 25923	Crecimiento bacteriano de la cepa.	Turbidez / UFC
	Cepa <i>E. coli</i> ATCC 11225	Crecimiento bacteriano de la cepa.	Turbidez / UFC

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Etnobotánica.

Desde la antigüedad nuestros antepasados han utilizado las plantas como una forma de ayuda para poder calmar los dolores y malestares, y es así que aprovechando los conocimientos heredados de generaciones anteriores y de los indicios proporcionados por cierto grupos étnicos que asignan cualidades curativas, se distinguen centenares de plantas y se saben muchas de las propiedades de cada una, naciendo con ello las plantas medicinales que hasta hoy en día se siguen empleando (Barh, 1988).

En el caso del Perú, la gran biodiversidad botánica por un lado y los conocimientos incipientes de sus propiedades fitoquímicas por otro lado marcan una brecha considerable que requiere esfuerzos coordinados de diferentes sectores de la sociedad científica, con fines tanto académicas, como prácticos de aprovechar el potencial natural (Hernández, 2003).

2.2. Historia de *Rosmarinus officinalis*.

El “romero”, *Rosmarinus officinalis* L., es una planta aromática conocida y utilizada desde la antigüedad como condimento y con fines medicinales. Se asegura que los faraones egipcios hacían poner sobre su tumba un ramillete de romero para perfumar su viaje al país de los muertos. Griegos y romanos lo consideraban símbolo de la regeneración. Los árabes lo suponían capaz de repeler las plagas y formaba parte de sus jardines. En el Renacimiento se utilizaba para elaborar la famosa agua de la reina de Hungría y también se quemaba en los hospitales franceses para combatir las epidemias (Arteche *et al*, 1998).

2.2.1. Difusión y origen.

Es una especie difundida ampliamente en Europa (España, Italia); se puede comprobar las bondades en la culinaria y medicina. En el Perú a encontrado su adaptación en los valles interandinos de las regiones del sur de nuestro país. Se ha podido verificar que esta especie forma parte del que hacer familiar en el jardín de casa, bajo diferentes formas de cultivo. Esta especie se originó en los países de la cuenca del mediterráneo, sur de Europa y norte de África, donde crece en zonas costeras y rocosas de clima húmedo (Fernández, 2008).

2.2.2. Descripción botánica

El “romero” cuyo nombre científico es *Rosmarinus officinalis L.* pertenece a la familia de las Lamiáceas es una planta subarborescente, ascendente, muy ramificada, perenne, que puede crecer hasta 2 m; presenta hojas pequeñas y opuestas casi lineares y flores de color azul-violáceo pálido o blanquecino. Las partes aéreas de la planta poseen un olor aromático alcanforado y su sabor es pronunciado, algo amargo y astringente (García B, 1992).

En la región de Tacna, *Rosmarinus officinalis L.*, puede alcanzar hasta 2.50 m de altura, sus raíces son poco profundas y ramificadas, su tallo es semileñoso y sinuoso, bastante ramificado, sus hojas son lineales o lanceoladas, sésiles, opuestas, coriáceas de color verde oscuro o verde plumizo, sus flores labiadas son de color azul violáceo, lila o blanco, dispuestas en ramas axilares y no presentan semillas (Fernández, 2008).

2.2.3. Composición química.

Las hojas de “romero” contienen un 1,0-2,5% de aceite esencial que está constituido por monoterpenos como 1,8-cineol, alfa-pineno, alcanfor, alfa-terpineol, canfeno, borneol, acetato de bornilo, limoneno, linalol, mirceno, verbenona. También contiene sesquiterpenos como

beta cariofileno. Sin embargo, la composición del aceite esencial de romero puede variar significativamente, en función de distintos factores como la parte de la planta recolectada, el grado de desarrollo de la planta en el momento de la recolección o la procedencia geográfica, entre otros. En el área mediterránea se distinguen principalmente dos tipos de esencias de romero: los tipos Marruecos y Túnez, que tienen un elevado contenido de 1,8-cineol, y el tipo español, con menor contenido en 1,8-cineol (Bruneton, 2001).

2.2.4. Clasificación científica.

Gracias a los estudios taxonómicos las plantas han sido clasificadas, dando lugar al nombre científico basado en el género y la especie, definido por sus características más relevantes; este nombre científico es tomado de la lengua latina y su empleo ha sido generalizado a nivel mundial, de esta manera se ha visto favorecido el avance de la ciencia en cuanto al conocimiento de las plantas en beneficio de la humanidad (Cronquist, 1981).

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Rosmarinus*.

Especie: *Rosmarinus officinalis L.*

2.2.5. Propiedades medicinales y uso tradicional.

Rosmarinus officinalis, “romero”, es utilizado como digestivo, carminativo y antiespasmódico, y tiene propiedades coleréticas, colagogas y hepatoprotectoras. El efecto favorable que ejerce en la digestión se produce al actuar sobre varios niveles. En primer lugar, estimula la producción de los jugos gastrointestinales. Además relaja el músculo liso gastrointestinal, elimina posibles espasmos y favorece las secreciones. Al relajar las cardias, tiene un efecto carminativo y colagogo, gracias a la relajación del esfínter de Oddi. Por otro lado, el romero se utiliza como conservante y antioxidante natural en la industria de la alimentación. La planta se utiliza igualmente como condimento de alimentos y como ingrediente en la fabricación de licores, así como en la fabricación de jabones, desodorantes, cosméticos, perfumes, etc. (Arteche *et al*, 1998).

En la medicina popular se utiliza las hojas, sobre todo, y a veces las flores. La infusión de hojas de romero se emplea en afecciones y dolores gastrointestinales, por su propiedad estomacal, antiespasmódica, carminativa y colagoga, facilitan la expulsión de la bilis retenida en la vesícula biliar; se estima también que se trata de un poderoso emenagogo, estimula o favorece el flujo menstrual. Esta misma preparación se utiliza como remedio para combatir la tos. Las hojas, cocidas y en vino, o el aceite de romero preparado en pomada, son empleadas contra los reumatismos articulares y para tratar afecciones traumáticas como contusiones, esguinces y heridas, además de eczemas y úlceras. Es una planta muy rica en principios activos y su acción se ejerce sobre casi todos los órganos. Su contenido en aceite esencial (pineno, canfeno, cíneol, borneol, alcanfor), le confiere una acción tónica y estimulante sobre el sistema nervioso, circulatorio y corazón; puesto que, se ha considerado tradicionalmente como un tónico general que favorece la circulación sanguínea, por lo que se emplea en casos de disminución de la irrigación periférica. Además, suele utilizarse también en casos de estrés, e incluso de depresión leve, gracias al efecto tonificante del sistema nervioso que se le atribuye. Para su uso externo es antineurálgico, antirreumático, cicatrizante y estimulante del cuero cabelludo.

2.3. Antimicrobianos de origen vegetal.

Las plantas, hierbas y especias, contienen un gran número de sustancias con propiedades que inhiben la actividad metabólica de bacterias, levaduras y mohos.

La mayoría de los compuestos con actividad antimicrobiana encontrados en especies vegetales, son compuestos fenólicos, terpenos, alcoholes alifáticos, aldehídos, cetonas, ácidos e isoflavonoides; los cuales en su mayoría son identificados como metabolitos secundarios, enzimas hidrolíticas (glucanasas, citinasas) y proteínas (Hernández, 2003).

Los compuestos utilizados como antimicrobianos atacan varios sitios dentro de las células microbianas y dependiendo de la concentración utilizada, pueden causar la inhibición o inactivación de los microorganismos (Araujo *et al*, 2008).

Los sitios de acción de los antimicrobianos en la célula microbiana, incluyen a la membrana celular, pared celular, enzimas metabólicas, síntesis de proteínas y el sistema genético, todos ellos estratégicos para la supervivencia de ciertos microorganismos (Conner, 1993).

Según Smid y Gorris (1999), citado por Hernández, 2003, los componentes activos de los aceites esenciales pueden variar en su composición, ya que éstos pueden verse afectados por ciertas variables como el genotipo de la planta, las diferentes metodologías de extracción, localización geográfica, así como las condiciones ambientales y agronómicas.

2.3.1. Modo de acción de los antimicrobianos de origen natural.

Conner (1993), sugirió que la actividad antimicrobiana de los compuestos vegetales se basa en el deterioro de varios sistemas enzimáticos, incluidos los involucrados en la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales. Una vez que el compuesto activo cruza la membrana celular, puede interactuar con las enzimas y con las proteínas causando un flujo contrario de protones a través de ella, afectando así la actividad celular.

Según Kabara (1991), citado por Nychas, 1995, menciona que los efectos de los compuestos fenólicos pueden ser de dos niveles, sobre la integridad de la pared celular y membrana citoplasmática así como sobre la respuesta fisiológica del microorganismo. Los compuestos fenólicos pueden desnaturalizar a las enzimas responsables del inicio de

la germinación de las esporas o interferir con el uso de aminoácidos necesarios para iniciar el proceso de germinación.

2.3.2. Pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos.

Para la evaluación de las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales se aplican los métodos convencionales de ensayo para antibióticos (Kalemba *et al*, 2003).

Existen dos técnicas básicas usadas para la evaluación de las actividades antimicrobiana de los aceites esenciales a saber: El método de difusión en agar y el método de las diluciones.

El estudio de susceptibilidad *in vitro* a antimicrobianos de los microorganismos patógenos, puede realizarse a través de diversos métodos, el de uso común por los laboratorios de microbiología es el de difusión en agar, estandarizado para microorganismos de crecimiento rápido. El método estandarizado y recomendado por el NCCLS se basa en el descrito originalmente por Bauer, que obtiene resultados cualitativos que correlacionan bien con los resultados cuantitativos obtenidos mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) (Cona, 2002).

2.4. Aceites esenciales.

2.4.1. Definición.

Los aceites esenciales son mezclas complejas de hidrocarburos, terpenos, alcoholes, compuestos carbonílicos, aldehídos aromáticos y fenoles y se encuentran en hojas, cáscaras o semillas de algunas plantas. La obtención de los aceites esenciales es realizada comúnmente por la tecnología llamada de destilación por arrastre con vapor, en sus diferentes modalidades. La pureza y el rendimiento del aceite esencial dependerán de la técnica que se utilice para el aislamiento.

Los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes que pueden ser: Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos),

- Monoterpenos,
- Sesquiterpenos y

- Fenilpropanos

En su gran mayoría son de olor agradable, aunque existen algunos de olor relativamente desagradable como por ejemplo los del ajo y la cebolla, los cuales contienen compuestos azufrados.

2.4.2. Clasificación.

Se clasifican con base en diferentes criterios: consistencia, origen y naturaleza química de los componentes mayoritarios. De acuerdo con su consistencia los aceites esenciales se clasifican en **esencias fluídas**, **bálsamos** y **oleorresinas**.

- Las **esencias fluídas** son líquidos volátiles a temperatura ambiente.
- Los **Bálsamos** son de consistencia más espesa, son poco volátiles propensos a sufrir reacciones de polimerización, son ejemplos el bálsamo de copaiba, el bálsamo del Perú, Benjuí, bálsamo de Tolú, Estoraque, etc.
- Las **Oleorresinas** tienen el aroma de las plantas en forma concentrada y son típicamente líquidos muy viscosos o sustancias semisólidas (caucho, gutapercha, chicle, balata, oleorresina de páprika, de pimienta negra, de clavel, etc.).

De acuerdo a su origen los aceites esenciales se clasifican como **naturales, artificiales y sintéticos.**

- Los **aceites esenciales naturales** se obtienen directamente de la planta y no sufren modificaciones físicas ni químicas posteriores, debido a su rendimiento tan bajo son muy costosas.
- Los **aceites esenciales artificiales** se obtienen a través de procesos de enriquecimiento de la misma esencia con uno o varios de sus componentes, por ejemplo, la mezcla de esencias de rosa, geranio y jazmín enriquecidas con linalool, o la esencia de anís enriquecida con anetol.
- Los **aceites esenciales sintéticos** como su nombre lo indica son los producidos por la combinación de sus componentes los cuales son la mayoría de las veces producidos por procesos de síntesis química. Estos son más económicos y por lo tanto son mucho más utilizados como aromatizantes y saborizantes (esencias de vainilla, limón, fresa, etc.) (Martínez, 2001).

2.4.3. Distribución y estado natural.

Los aceites esenciales se encuentran ampliamente distribuidos en unas 60 familias de plantas que incluyen las Compuestas, Labiadas,

Lauráceas, Mirtáceas, Pináceas, Rosáceas, Rutáceas, Umbelíferas, etc. Se les puede encontrar en diferentes partes de la planta: en las hojas (ajenjo, albahaca, buchú, cidrón, eucalipto, hierbabuena, limoncillo, mejorana, menta, pachulí, quenopodio, romero, salvia, toronjil, etc.), en las raíces (angélica, asaro, azafrán, cálamo, cúrcuma, galanga, jengibre, sándalo, sasafrás, valeriana, vetiver, etc.), en el pericarpio del fruto (limón, mandarina, naranja, etc.), en las semillas (anís, cardamomo, eneldo, hinojo, comino, etc.), en el tallo (canela, caparrapí, etc.), en las flores (arnica, lavanda, manzanilla, piretro, tomillo, clavo de olor, rosa, etc.) y en los frutos (alcaravea, cilantro, laurel, nuez moscada, perejil, pimienta, etc.) (González, 1984).

2.4.4. Empleo de los aceites esenciales.

2.4.4.1. Industria Alimentaria.

Se emplean para condimentar carnes preparadas, embutidos, sopas, helados, queso, etc. Los aceites más empleados por esta industria son el “Cilantro”, “Naranja” y “Menta”, entre otros. También son utilizados en la preparación de bebidas alcohólicas y no alcohólicas, especialmente refrescos. Con respecto a esta utilidad podemos citar las esencias extraídas del “naranja”, “limón”, “mentas” e “hinojo”, entre

otros. Estas esencias también se emplean en la producción de caramelos, chocolates y otras golosinas.

2.4.4.2. Industria Farmacéutica.

Se usan en cremas dentales (aceite de menta e hinojo), analgésicos e inhalantes para descongestionar las vías respiratorias (eucalipto). El eucaliptol es muy empleado en odontología. Son utilizados en la fabricación de neutralizantes de sabor desagradable de muchos medicamentos (naranjas y menta, entre otros).

2.4.4.3. Industria de Cosméticos.

Esta industria emplea los aceites esenciales en la producción de cosméticos, jabones, colonias, perfumes y maquillaje. En este campo se pueden citar los aceites de geranio, lavanda y rosas.

2.4.4.4. Industria de productos de uso veterinario.

Esta industria emplea el aceite esencial de *Chenopodium ambrosoides* muy apreciado por su contenido de ascaridol, vermífugo. (Van Ginkel, 2003).

2.4.5. Extracción de los aceites esenciales.

Los aceites esenciales se pueden extraer de las muestras vegetales mediante varios métodos como son: expresión, destilación con vapor de agua, extracción con solventes volátiles y enflorado o enfleurage y con flúidos supercríticos.

2.4.5.1. Método de la expresión.

En la expresión el material vegetal es exprimido para liberar el aceite y este es recolectado y filtrado. Este método es utilizado para el caso de las esencia de cítricos (Martínez, 2001).

2.4.5.2. Método de la destilación por arrastre con vapor de agua.

La muestra vegetal generalmente seca y cortada en trozos pequeños, es encerrada en una cámara inerte y sometida a una corriente de vapor de agua sobrecalentado, la esencia así arrastrada es posteriormente condensada, recolectada y separada de la fracción acuosa. Esta técnica es muy utilizada especialmente para esencias fluídas, especialmente las utilizadas para perfumería. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada (Martínez, 2001).

2.4.5.3. Método de la extracción con solventes volátiles.

La muestra seca y molida se pone en contacto con solventes tales como alcohol, cloroformo, etc. Estos solventes solubilizan la esencia pero también solubilizan y extraen otras sustancias tales como grasas y ceras, obteniéndose al final una esencia impura. Se utiliza a escala de laboratorio pues a nivel industrial resulta costoso por el valor comercial de los solventes, porque se obtienen esencias impurificadas con otras sustancias, y además por el riesgo de explosión e incendio característicos de muchos solventes orgánicos volátiles (Martínez, 2001).

2.4.5.4. Método de enflorado o enfleurage.

El material vegetal (generalmente flores) es puesto en contacto con un aceite vegetal. La esencia es solubilizada en el aceite vegetal que actúa como vehículo extractor. Se obtiene inicialmente una mezcla de aceite esencial y aceite vegetal la cual es separada posteriormente por otros medios físico-químicos. Esta técnica es empleada para la obtención de esencias florales (rosa, jazmín, azahar, etc.), pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor la hacen costosa (Martínez, 2001).

2.4.5.5. Método de extracción con fluidos supercríticos.

Es de desarrollo más reciente. El material vegetal cortado en trozos pequeños, licuado o molido, se empaca en una cámara de acero inoxidable y se hace circular a través de la muestra un líquido supercrítico (por ejemplo bióxido de carbono líquido), las esencias son así solubilizadas y arrastradas y el líquido supercrítico que actúa como solvente extractor y se elimina por descompresión progresiva hasta alcanzar la presión y temperatura ambiente, y finalmente se obtiene una esencia pura. Aunque presenta varias ventajas como rendimiento alto, es ecológicamente compatible, el solvente se elimina fácilmente e inclusive se puede reciclar, y las bajas temperaturas utilizadas para la extracción no cambian químicamente los componentes de la esencia, sin embargo el equipo requerido es relativamente costoso, ya que se requieren bombas de alta presión y sistemas de extracción también resistentes a las altas presiones (Martínez, 2001).

2.4.6. Paredes celulares bacterianas.

La pared celular bacteriana brinda rigidez estructural, confiere la forma a la célula y crea una barrera física contra el ambiente externo. El componente rígido de la pared celular de todas las bacterias está constituido por peptidoglicanos. Esta estructura está compuesta por un

esqueleto de residuos de carbohidratos formados por unidades alternadas de N - acetilglucosamina y ácido N – acetilmurámico unidos por enlaces β -1,4. Los tipos de aminoácidos encontrados y los grados de entrecruzamiento son componentes variables de la estructura del peptidoglicano (Koneman *et al*, 2004).

2.4.6.1. Pared celular de las bacterias Grampositivas.

La pared celular de las bacterias Grampositivas tiene un grosor de casi 80 nm y está compuesta principalmente de varias capas de peptidoglicano; de hecho, desde el 40% hasta más del 80% del peso seco de algunas paredes celulares grampositivas están constituidas por peptidoglicanos. Atrapadas dentro de esta matriz de peptidoglicanos se encuentra una variedad de proteínas, polisacáridos y moléculas únicas denominadas ácidos teicoicos. En algunos microorganismos, los ácidos teicoicos son antígenos y forman la base del agrupamiento antigénico (Madigan, 2004).

2.4.6.2. Pared celular de las bacterias Gramnegativas.

La pared celular de las bacterias Gramnegativas es más delgada que la de las bacterias grampositivas pero estructuralmente es más compleja. Por fuera de la membrana citoplasmática se encuentra el

espacio periplasmático, un compartimiento que contiene enzimas y que se encuentra entre la membrana citoplasmática y la porción exterior de la pared celular. Una capa de peptidoglicano de una sola unidad de espesor forma el borde externo del espacio periplásmico. La capa de peptidoglicano de las bacterias Gramnegativas es bastante laxa, es decir sólo alrededor de la mitad de las cadenas peptídicas que pueden unirse a residuos de ácido N-acetilmurámico están realmente entrecruzadas. Fuera de la delgada capa de peptidoglicano se encuentra la membrana externa (Madigan, 2004).

2.4.7. *Staphylococcus aureus*.

Es una bacteria Grampositiva esférica, aerobia y anaerobia facultativa que se agrupa en forma de racimos. No presenta movilidad ni tampoco forma esporas. Bioquímicamente produce la catalasa, la coagulasa y es capaz de fermentar varios azúcares, entre ellos el manitol, para producir ácido láctico, lo que lo diferencia de los demás estafilococos. El medio Agar Manitol Salado es útil en el aislamiento e identificación de este microorganismo. Se lo encuentra en el ambiente externo y en las narinas anteriores del 20 al 40% de los adultos. Otros sitios de colonización son los pliegues cutáneos, el periné y las axilas. Aunque este microorganismo suele formar parte de la microflora

humana normal, puede producir infecciones oportunistas importantes en las condiciones apropiadas. Por otro lado, *S. aureus* puede producir una variedad de procesos infecciosos que van desde infecciones cutáneas relativamente benignas hasta enfermedades sistémicas potencialmente fatales. También hay cepas de *S. aureus* que pueden producir intoxicaciones alimentarias debido a la elaboración de exotoxinas durante su desarrollo en alimentos contaminados (Sánchez, 1997).

2.4.7.1. Patogenia

La patología de las infecciones estafilocócicas dependen de la producción de proteínas de la superficie que intervienen en la adhesión de las bacterias a los tejidos del organismo anfitrión y la fabricación de proteínas extracelulares como toxinas específicas y enzimas hidrolíticas.

2.4.7.2. Estructura antigénica.

En la estructura de la pared celular, los estafilococos contienen polisacáridos y proteínas antigénicas y también otras sustancias importantes. El peptidoglucano es importante en la patogenia de la infección: induce la producción de interleucina – 1 (pirógeno endógeno) y de anticuerpos opsonicos en los monocitos; y pueden atraer químicamente a los leucocitos polimorfonucleares, poseen actividad

parecida a endotoxina, y activa al complemento. Algunas cepas de *S. aureus* poseen cápsulas que inhiben la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares, a menos que se encuentren presentes anticuerpos específicos (Murray et al, 2006).

2.4.7.3. Proteína A.

La pared celular de *S. aureus* contiene esta peculiar proteína que tiene la capacidad de unirse a la región Fc de la molécula de inmunoglobulina G (IgG). La proteína A se encuentra unida al peptidoglucano de la pared celular y también puede ser segregada al medio durante el desarrollo. La proteína A funciona como un factor de virulencia al interferir en la opsonización y la ingestión de los microorganismos por parte de los leucocitos polimorfonucleares, activar el complemento y estimular reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediato y retardado. La proteína A es inmunogénica y en los individuos con infecciones graves producidas por *S. aureus* se encuentran anticuerpos dirigidos contra ella. (Koneman, 2004).

2.4.7.4. Toxinas estafilocócicas.

S. aureus produce un gran número de factores de virulencia, entre los que figuran cinco toxinas citolíticas (alfa, beta, delta, gamma y

leucocidina de Panton-Valentine P-V), dos toxinas exfoliativas (A y B), ocho enterotoxinas (A a E, G a I) y la toxina – 1 del síndrome del shock tóxico (TSST - 1) (García *et al*, 1996).

2.4.7.5. Enzimas estafilocócicas.

2.4.7.5.1. Coagulasa.

Las cepas de *S. aureus* poseen dos formas de coagulasa: ligada y libre. La coagulasa que se une a la pared del estafilococo puede convertir directamente el fibrinógeno en fibrina insoluble para formar la agregación de los estafilococos. La coagulasa puede provocar la formación de una capa de fibrina alrededor del absceso estafilocócico, de forma que la infección quede localizada y los microorganismos estén protegidos de la fagocitosis.

2.4.7.5.2. Catalasa.

Los estafilococos producen catalasa que convierte el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. La prueba de la catalasa puede diferenciar los estafilococos, que son positivos, de los estreptococos, que son negativos.

2.4.7.5.3. Hialuronidasa.

Descompone el ácido hialurónico, un polisacárido presente en el tejido conjuntivo, colaborando en la invasión hística. La enzima favorece la diseminación de *S. aureus* en los tejidos. Más del 90% de las cepas de *S. aureus* es capaz de producir esta enzima.

2.4.7.5.4. Estafiloquinasas.

Son enzimas que descomponen las mallas de fibrina, contribuyendo a la capacidad invasora del microorganismo. Son sustancias termolábiles. La cual puede disolver los coágulos de fibrina.

2.4.7.5.5. Lipasas.

Todas las cepas de *S. aureus* y más del 30% de las cepas de *Staphylococcus coagulasa* negativos producen diferentes lipasas. Como indica su nombre, estas enzimas hidrolizan los lípidos, una función esencial para garantizar la supervivencia de los estafilococos en las zonas sebáceas del organismo. Se cree que la presencia de estas enzimas es necesaria para que los estafilococos puedan invadir los tejidos cutáneos y subcutáneos, y para el desarrollo de infecciones (forúnculos, carbunco).

2.4.7.5.6. Penicilinasa.

Más del 90% de los estafilococos aislados fueron sensibles a la penicilina en 1941, el año en que el antibiótico se usó en clínica por primera vez. Los microorganismos desarrollaron con rapidez resistencia a la penicilina por su producción de penicilinasa (β -lactamasa); la amplia distribución de esta enzima se aseguró por la presencia en plásmidos transmisibles (García *et al*, 1996).

2.4.7.6. Epidemiología.

S. aureus es un microorganismo que coloniza de manera habitual casi al 30% de las personas en varias partes del cuerpo humano. Se encuentra en mayor número en la nariz y zonas nasofaríngeas, piel u algunas veces en los genitales externos, y raramente en el colon y vagina. La proporción de colonización aumenta sin embargo de manera importante en el medio hospitalario. Tanto los enfermos hospitalizados como el personal sanitario presentan una alta colonización por este microorganismo, que incluye en muchos casos a cepas resistentes a uno o varios antimicrobianos. Asimismo, ciertos grupos de diabéticos dependientes de insulina, enfermos con diálisis crónica y drogodependientes pueden presentar una colonización mayor que las personas sanas. De las personas portadoras pueden pasar fácilmente a

objetos o a otras personas. Su resistencia a las condiciones adversas hacen de esta bacteria uno de los más importantes patógenos en la microbiología clínica, ya que pueden causar brotes epidémicos, sobre todo en hospitales (infecciones nosocomiales). (Granados, 1996).

2.4.8. *Escherichia coli*.

Es una bacteria Gramnegativa con morfología bacilar de tamaño $0.5 \mu \times 3 \mu$ por lo general móvil, no esporulado, oxidasa negativo, aerobio y anerobio facultativo. Bioquímicamente producen ácido y gas a partir de la fermentación de la glucosa, lactosa, y otros azúcares. *E. coli* es la especie bacteriana más recuperada en los laboratorios clínicos y ha sido incriminada en enfermedades infecciosas que involucran virtualmente todos los tejidos humanos y sistemas de órganos. *E. coli* es uno de los organismos comunes involucrados en sepsis gramnegativa y en shock inducido por endotoxinas. Las infecciones del tracto urinario y de las heridas, la neumonía en pacientes hospitalizados inmunosuprimidos y las meningitis en los neonatos son otras formas comunes de infección causada por *E. coli* (Koneman *et al*, 2004).

2.4.8.1. Patogenia.

E. coli posee una amplia variedad de factores de virulencia. Además de los factores generales que comparten todos los miembros de la familia Enterobacteriaceae, las cepas de *Escherichia* responsables de enfermedades como las IUA y la gastroenteritis poseen unos factores de virulencia especializados. Estas dos categorías generales son las adhesinas y las exotoxinas (Jawetz, 1996).

2.4.8.2. Adhesinas.

E. coli es capaz de permanecer en el aparato urinario o en el aparato digestivo como consecuencia de su capacidad de adherencia a las células en estas localizaciones para evitar ser eliminado por el efecto de arrastre de la orina que se expulsa con la micción o por la motilidad intestinal.

2.4.8.3. Exotoxinas.

E. coli produce también un espectro variado de exotoxinas. Estas incluyen las toxinas Shiga, las toxinas Termoestables y las toxinas termolábiles. Por otra, parte las hemolisina se consideran importantes en la patogenia de la enfermedad producida por *E. coli* uropatógeno (García *et al*, 1996).

2.4.8.4. Gastroenteritis.

Las cepas de *E. coli* que provocan gastroenteritis se subdividen en los cinco principales grupos siguientes: *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enterotoxigena (ECET), *E. coli* enterohemorrágica (ECEH), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI) y *E. coli* enteroagregativa (ECEA).

2.4.8.5. Epidemiología.

Un gran número de células de *E. coli* están presentes en el aparato digestivo, y estas bacterias son una causa frecuente de septicemia, meningitis neonatal, infecciones del aparato urinario y gastroenteritis. Por ejemplo, *E. coli* son: 1) los bacilos gramnegativos que se aíslan con una frecuencia mayor en los pacientes con septicemia; 2) responsables de producir más del 80% de las IUA adquiridas en la comunidad, así como la mayoría de las infecciones nosocomiales, y 3) causa importante de gastroenteritis en los países en vías de desarrollo. La mayoría de las infecciones son endógenas, es decir *E. coli* que forma parte de la flora bacteriana normal del paciente son capaces de producir una infección cuando las defensas se encuentran alteradas (Restrepo *et al*, 1996).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1. Lugar de estudio.

Se realizó en el Laboratorio de Microbiología y Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann -Tacna.

3.2. Tipo de estudio.

Es una investigación cuasi experimental prospectivo.

3.3. Unidades de estudio.

3.3.1. Material Biológico.

El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.* fue obtenido en el Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann -Tacna.

3.3.2. Material Microbiológico.

Se trabajó con una bacteria Grampositiva; *Staphylococcus aureus ATCC 25923* y una bacteria Gramnegativa, *Escherichia coli ATTC 11225*,

proporcionado por el Hospital Hipólito Unanue de Tacna.

3.4. Materiales de laboratorio.

3.4.1. Material de vidrio.

- Balones de vidrio de 500 y 1000 ml
- Micro pipetas de 0.5 – 10 µl, 20 – 200 µl
y 100 – 1000 µl
- Probetas de 10 y 50 ml
- Tubos de ensayo de 13 x 150 mm
- Placas Petri de de 15 x 100 mm
- Vaso precipitado de 50, 100 y 250 ml
- Matraces de 50 y 100 ml

3.4.2. Medios de Cultivo.

- Agar Nutritivo
- Agar Müeller Hinton
- Caldo Mueller Hinton
- Caldo Cerebro Infusión Corazón (BHI)

3.4.3. Reactivos.

- Dimetilsulfóxido
- Alcohol de 70 °

- Agua destilada

3.4.4. Equipos y otros.

- Equipo de destilación a escala industrial
- Balanza analítica
- Autoclave
- Incubadora
- Cámara cuenta colonia
- Refrigeradora
- Asa bacteriológica
- Pinzas
- Mechero Bunsen
- Gradilla
- Cámara fotográfica digital

3.5. Metodología.

3.5.1. Recolección de *Rosmarinus officinalis L.*

La planta *Rosmarinus officinalis L.* se recolectó en el Distrito de Calana (Región Tacna), durante el mes de agosto del 2012. Para ello, se verificó que las hojas no presenten síntomas de envejecimiento, las plantas

recolectadas se envolvieron en papel Kraft para su conservación hasta su procesamiento.

3.5.2. Secado de *Rosmarinus officinalis*.

Para el secado de la muestra se empleó una habitación de 3 m² por un periodo de 8 a 10 días, la cual cumplió con los siguientes requisitos: buena circulación de corrientes de aire, poca luz, temperatura de 25-28° C y baja humedad. La muestra que se recolectó se extendió de forma homogénea y uniforme sobre una plataforma horizontal de madera para evitar la humedad entre ellas y permanentemente se removió para conseguir un buen secado homogéneo.

3.5.3. Obtención del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.*

Técnica: Arrastre de vapor (Lock de Ugaz, O. 1994) y Martínez M, Alejandro (2001).

Para la extracción del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.* se colocó aproximadamente 4000 gramos de muestra (hojas) en un destilador de Acero Semi-Industrial y luego por arrastre a vapor se

logro la obtención de la muestra de aceite esencial de romero. El producto se recogió en frasco y se almacenó a temperatura ambiente y en oscuridad hasta el momento de su utilización.

3.5.4. Evaluación de la actividad del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.*

Técnica: Método de difusión de disco o Kirby Bauer (Koneman y col, 2004) y Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Difusión (2002).

La actividad antimicrobiana del aceite esencial se evaluó por el método de difusión en disco. Para evaluar la sensibilidad de estos microorganismos al aceite esencial se empleó el método de difusión radial en el medio Müller-Hinton según recomendaciones del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) utilizando para ello discos embebidos con el aceite esencial a volúmenes de 2.5 µl, 5.0 µl, 7.5 µl, 10.0 µl, 12.5 µl, 15.0 µl, 17.5 µl y 20.0 µl respectivamente. Esta técnica estandarizada por la NCCLS está basada en

el conocido método de Kirby Bauer. Este método de difusión se basa en que el compuesto a estudiar se difundiera por el medio agarizado produciendo un gradiente de concentración, entonces si el compuesto es efectivo contra el microorganismo probado se formará una zona de inhibición alrededor del disco embebido en el compuesto. El tamaño de la zona de inhibición proporciona indicios de la relativa actividad de la sustancia.

A. Determinación de la concentración del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.*

Probeta de 10 ml vacía = 16,2959 g.

Probeta de 10 ml con aceite = 17,1868 g.

Masa = 17,1868 g. - 16,2959 g. = 0,8909 g.

Volumen = 1 ml

D: densidad

m: masa

v: volumen

D = m / v

$$D = 0,8909 \text{ gr} / 1 \text{ ml} = 0,8909 \text{ gr/ml}$$

$$D = 0,8909 \text{ mg} / \mu\text{l}$$

$$cc = 0,8909 \longrightarrow 1 \mu\text{l}$$

$$X \longrightarrow 2,5 \mu\text{l}$$

$$X = 2,22725 \text{ mg} / \mu\text{l}$$

TRATAMIENTO (T)	VOLUMEN (μl)	CONCENTRACION ($\text{mg}/\mu\text{l}$)
T1	2,5	2,23
T2	5,0	4,45
T3	7,5	6,68
T4	10,0	8,91
T5	12,5	11,14
T6	15,0	13,36
T7	17,5	15,59
T8	20,0	17,82

Con el objeto de conocer entre cuales de estas concentraciones pudiese estar el MIC (Concentración Mínima Inhibitoria); las placas Petri con muestras se incubaron a 37 ° C por un periodo de 24 horas. Posteriormente se observó la presencia del halo que se formó y se anotó el tamaño del halo en la zona de inhibición.

B. Estandarización de la población microbiana de estudio:

Preparación del inóculo para *Escherichia coli* ATCC 11225 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

En la estandarización de la población microbiana, se utilizó a partir de cinco colonias de las bacterias en estudio bien aisladas de un cultivo puro de agar nutritivo. Con un asa bacteriológica se transfirieron las colonias a un tubo que contenga 5 ml de Caldo BHI, homogenizando las colonias hasta lograr turbidez, se incubó el inóculo a 37 ° C por 4 horas posteriormente el inóculo se estandarizó por turbidez con el tubo 0.5 de la escala de Mac Farland cuya población bacteriana fue de 1.5×10^8 ufc /ml.

C. Preparación de los discos de sensibilidad con las diferentes concentraciones del Aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L.

En esta etapa se preparó discos de sensibilidad 6 mm de diámetro de papel Wathman N ° 42 previamente esterilizados, los discos de sensibilidad fueron embebidos con una micro pipeta de rango variable con volúmenes de 2.5 µl, 5.0 µl, 7.5 µl, 10.0 µl, 12.5 µl, 15.0 µl, 17.5 µl y 20.0 µl de aceite esencial respectivamente, teniendo un total de 64 discos que correspondieron a 4 repeticiones.

D. Prueba de susceptibilidad: Método de difusión en disco de susceptibilidad (Kirby - Bauer).

De la suspensión bacteriana de concentración de 1.5×10^8 ufc /ml que se estandarizo, con la ayuda de una micro pipeta se tomaron 100 µl del inóculo bacteriano, los cuales se colocaron en las placas con agar Müeller Hinton procediendo a diseminar con una asa Digraslky, realizando un estriado homogéneo sobre toda la superficie de la placa. Luego, se dejó secar durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, usando una pinza estéril se tomó

los discos impregnados con el aceite esencial y se colocaron sobre la superficie de las placas con agar Müller Hinton, haciendo una ligera presión para asegurar el contacto con el medio. Las placas fueron incubadas a 37 ° C durante 24 horas para observar la presencia y el tamaño de los halos de inhibición. Por otro lado, la lectura se realizó midiendo los halos de inhibición sobre el crecimiento del microorganismo alrededor del diámetro del disco. Para interpretar los resultados se tomó como referencia las pautas dadas por **Duraffourd, 1983**; que considera la actividad de los aceites como:

- Sensibilidad límite para un diámetro entre 9 a 14 mm
- Sensibilidad Media para un diámetro comprendido entre 15 a 19 mm
- Sumamente sensible para un diámetro superior o igual a 20 mm.

3.5.5. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria

(CMI): Método de la macro dilución en medio líquido.

Técnica: (Granados y Villaverde, 1996).

A. Preparación de la solución madre.

Se preparó una solución madre de 10000 µl; la cual contenía 400 µl de aceite esencial en 800 µl de DMSO (Dimetilsulfóxido), para 8800 µl de Caldo Müeller Hinton. La concentración final se obtuvo de la siguiente forma. En primer lugar se determinó la densidad del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.*

$$D = m / V$$

$$D = 0,8909 \text{ gr} / 1 \text{ ml} = 0,8909 \text{ gr/ml}$$

$$D = 0,8909 \text{ mg} / \mu\text{l}$$

$$m = D \times V$$

$$m = 0,8909 \text{ gr/ml} \times 1 \text{ ml}$$

$$m = 0,8909 \text{ gr}$$

Entonces, en 1 ml de aceite esencial existe una concentración de 0.8909 gr de aceite esencial de romero.

Sin embargo, para la solución madre sólo se trabajó con miligramos de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.*

$$1 \text{ gr.} \longrightarrow 1000 \text{ mg.}$$

$$0.8909 \text{ gr} \longrightarrow X$$

$$X = 890.9 \text{ mg}$$

Entonces, en 1 ml o en 1000 μl hay una concentración de 890.9 mg de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.*

Para la solución madre, se llevó a 400 μl de aceite esencial lográndose determinar lo siguiente:

$$890.9 \text{ mgr} \longrightarrow 1000 \mu\text{l}$$

$$X \longrightarrow 400 \mu\text{l}$$

$$X = 356,36 \text{ mg}$$

Por tanto, en 400 μl de aceite esencial existe una concentración de 356,36 mg de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*.

Para la solución madre: Esta concentración se diluyó en 10000 μl de solución total.

$$356,36 \text{ mgr} \longrightarrow 10000 \mu\text{l}$$

$$X \longrightarrow 1000 \mu\text{l}$$

$$X = 35,636 \text{ mg.}$$

Entonces, en 1 ml o 1000 μ l tiene una concentración de 35,636 mgr/ μ l de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. Pero en 500 μ l de solución madre se tuvo:

$$\begin{array}{l} 35,636 \text{ mg} \quad \longrightarrow \quad 1000 \mu\text{l} \\ X \quad \longrightarrow \quad 500 \mu\text{l} \end{array}$$

$$X = 17,818 \text{ mg.}$$

Finalmente, en 500 μ l se tiene una concentración de 17,818 mgr de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, pero ésta se diluyó en un tubo con 3000 μ l de Caldo Müeller Hinton alcanzándose una concentración final de 5,93 mg / μ l.

B. Preparación del MIC (Concentración Mínima Inhibitoria) para *Escherichia coli* ATTC 11225 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Se utilizó el método de la Macro dilución en tubos con medio Caldo Müeller Hinton, preparando diluciones del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. a diferentes concentraciones, después de lo cual se agregó una suspensión bacteriana constante de acuerdo al estándar de

turbidez de 0,5 de Mc Farland. Se prepararon 15 tubos de 15 X 125 mm a los cuales se les agregó lo siguiente:

Tratamiento	V. Solución Madre	Caldo Müeller Hinton	Vol. Total de la solución	Conc. en 1 ml o 1000 µl	Conc. final de la solución
T1	500 µl	2500 µl	3000 µl	17,818mg/µl	5,93 mg/µl
T2	525 µl	2475 µl	3000 µl	18,708mg/µl	6,23 mg/µl
T3	550 µl	2450 µl	3000 µl	19,599mg/µl	6,53 mg/µl
T4	575 µl	2425 µl	3000 µl	20,491mg/µl	6,83 mg/µl
T5	600 µl	2400 µl	3000 µl	21,382mg/µl	7,12 mg/µl
T6	625 µl	2375 µl	3000 µl	22,272mg/µl	7,42 mg/µl
T7	650 µl	2350 µl	3000 µl	23,163mg/µl	7,72 mg/µl
T8	675 µl	2325 µl	3000 µl	24,054mg/µl	8,01 mg/µl
T9	700 µl	2300 µl	3000 µl	24,945mg/µl	8,31 mg/µl
T10	725 µl	2275 µl	3000 µl	25,836mg/µl	8,61 mg/µl
T11	750 µl	2250 µl	3000 µl	26,727mg/µl	8,90 mg/µl
T12	775 µl	2225 µl	3000 µl	27,617mg/µl	9,20 mg/µl
T13	800 µl	2200 µl	3000 µl	28,508mg/µl	9,50 mg/µl
T14	825 µl	2175 µl	3000 µl	29,399mg/µl	9,79 mg/µl
T15	850 µl	2150 µl	3000 µl	30,290mg/µl	10,09mg/µl

3.5.6. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

A. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para *Escherichia coli* ATCC 11225.

Técnica: (Granados y Villaverde, 1996).

Una vez obtenido la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) por el método de la macro dilución en medio líquido se procedió a realizar la obtención de la Concentración Mínima Bactericida (CMB), tomando los tres tubos en donde no se presentó turbidez.

Se procedió a tomar 100 µl de los tubos 4, 5 y 6 para sembrar en placas con Agar Müeller Hinton, con la ayuda de un asa Digraslky se diseminó y se incubo a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se procedió a contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes para cada concentración del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. y así ubicar el correspondiente CMB (≤ 1 ufc/placa).

B. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Una vez obtenido la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) por el método de la macro dilución en medio líquido se procedió a realizar la obtención de la Concentración Mínima Bactericida (CMB), tomando los tres tubos en donde no se presentó turbidez.

Se procedió a tomar 100 µl de los tubos 13, 14 y 15 para sembrar en placas con Agar Müeller Hinton, con la ayuda de un asa Digraslky se diseminó y se incubo a 37°C durante 24 horas. Posteriormente, se procedió a contar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) presentes para cada concentración del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. y así ubicar el correspondiente CMB (≤ 1 ufc/placa).

5.5.7. Diseño experimental.

Para la ejecución del experimento se utilizó el diseño experimental de bloques completamente al azar con 08 tratamientos (concentraciones) y 04 repeticiones (halos), haciendo un total de 32 unidades experimentales.

5.5.8. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó el método ANOVA, usando la prueba F a un nivel de significancia de 0,01 y 0,05 y para establecer si existe relación entre las variables se utilizaron la prueba de regresión lineal simple al 0,05 y 0.01 finalmente para establecer las diferencias significativas entre los tratamientos se utilizaron la prueba de Tukey al 0,05. Todos los datos fueron procesados a través del software estadístico STATGRAPHICS VERSIÓN 5.1. Los tratamientos a base de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* se expresaron en términos de mg/ml, mientras que los promedios de los halos de inhibición o de sensibilidad se expresaron en milímetros (mm).

CAPÍTULO IV

RESULTADO

Se realizó el estudio *in vitro* en dos especies bacterianas: una bacteria Grampositiva; ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** y una bacteria Gramnegativa, ***Escherichia coli* ATTC 11225**, proporcionado por el Hospital Hipólito Unanue de Tacna, demostrándose la sensibilidad de las bacterias mencionadas frente al aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L, trabajándose con ocho tratamientos y cuatro repeticiones.

Los resultados obtenidos en las diferentes pruebas realizadas han sido agrupados en cuadros y figuras para una mejor interpretación de los resultados que se detallan a continuación. Se utilizó el diseño completamente aleatorizado, debido a que este es un diseño de simple distribución al azar siendo útil para métodos y técnicas de laboratorio.

Cuadro 01: Evaluación antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de ***Rosmarinus officinalis L.*** “romero” frente a ***Escherichia coli* ATCC 11225** por el método de difusión en disco kirby-Bauer.

Tratamiento	Aceite esencial		Ø Halo de inhibición (mm)				Promedio de halos (mm)
			Repeticiones				
	Volumen	Conc.(mg/ ml)	I	II	III	IV	
T1	2,5 µl	2,23	8,0	8,0	7,0	7,0	7,5
T2	5,0 µl	4,45	9,0	9,0	10,0	10,0	9,5
T3	7,5 µl	6,68	11,0	11,0	12,0	12,0	11,5
T4	10,0 µl	8,91	14,0	16,0	17,0	18,0	16,25
T5	12,5 µl	11,14	23,0	26,0	27,0	30,0	26,5
T6	15,0 µl	13,36	20,0	30,0	49,0	53,0	38,0
T7	17,5 µl	15,59	48,0	48,0	52,0	52,0	50,0
T8	20,0 µl	17,82	No hubo crecimiento bacteriano				

Fuente: Elaboración propia.

En el Cuadro 01 se observa el efecto antibacteriano de las 7 concentraciones probadas que se evidencian con halos de inhibición entre 7.5 y 50 mm de diámetro. Siendo la concentración de 15,59 mg/ml

la que generó el halo de mayor tamaño. Sin embargo, en el tratamiento T8 a la concentración de 17,82 mg/ml se evidenció la inhibición total del crecimiento bacteriano.

Cuadro 02: Determinación del grado de sensibilidad de *Escherichia coli* ATCC 11225 a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.* “romero” según Duraffourd (1983).

Aceite esencial			Grado de sensibilidad		
N °	Volumen	Conc.(mg/ml)	Sensibilidad límite entre 9 a 14 mm (sensible = +)	Sensibilidad media entre 15 a 19 mm (muy sensible = ++)	Sumamente sensible de 20 mm a más (s.s. = +++)
T1	2,5 µl	2,23			
T2	5,0 µl	4,45			
T3	7,5 µl	6,68	11,5		
T4	10,0 µl	8,91		16,25	
T5	12,5 µl	11,14			26,5
T6	15,0 µl	13,36			38,0
T7	17,5 µl	15,59			50,0
T8	20,0 µl	17,82	-	-	-

Fuente: Elaboración propia.

En el Cuadro 02, según **Duraffourd (1983)**, se reporta la sensibilidad a partir del tratamiento T3 con un halo promedio de 11,5 mm a la concentración de 6,68 mg/ml, hasta el tratamiento T7. En cambio, no se reporto señales de sensibilidad para el T8.

Cuadro 03: Análisis de varianza para comparar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.* a través de la variación de los promedios de los halos de inhibición frente a *Escherichia coli* ATCC 11225 entre los diferentes tratamientos.

Fuentes de variabilidad	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Significación	
					0,05	0,01
TRATAMIENTO (Concentraciones)	6	6264,5	1044,08	33,250	2,66	4,01**
BLOQUE (Halos)	3	221,536	73,8452	2,352	3,16	5,09 ns
ERROR	18	565,214	31,4008			
TOTAL	27	7051,25				

* * Diferencias altamente significativas **ns:** No significativo

El análisis de varianza, utilizado para Fc fue de 0,05 y 0,01% de probabilidad, de promedios de halos de inhibición, indica que no existen diferencias estadísticas a nivel halos, es decir fueron uniformes, sin embargo para los tratamientos se encontraron diferencias estadísticas

altamente significativas, por lo que deducimos que existe suficiente evidencia estadística para señalar que los diferentes tratamientos influyeron directamente sobre la variable en estudio, con un nivel de confianza del 99%.

Cuadro 04: Análisis de varianza de regresión lineal simple para el tamaño de los halos de inhibición entre las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.* frente a *Escherichia coli* ATCC 11225.

Fuentes de variabilidad	SC	G L	CM	F calculado	Significación	
					0,05	0,01
Regresión	1421,390	1	1421,390	49,10	6,608	16,258 **
Error	144,736	5	28,9472			
Total	1566,13	6				

* * Diferencias altamente significativas

1. Formular la Hipótesis:

H₀: No existe relación entre la concentración de aceite esencial y el tamaño de los halos.

H₁: Si existe relación entre la concentración de aceite esencial y el tamaño de los halos.

2. Nivel de significancia: $\alpha = 0,05; 0,01$

3. Estadístico de prueba: $F_c = 49,10$

4. Decisión: $F_c > \alpha = 0,05; 0,01$ Por lo tanto se rechaza la hipótesis H_0 .

5. Conclusión: Se concluye que la relación es altamente significativa entre la concentración del aceite esencial y el tamaño de los halos, es decir están relacionados linealmente con un nivel de confianza del 99%.

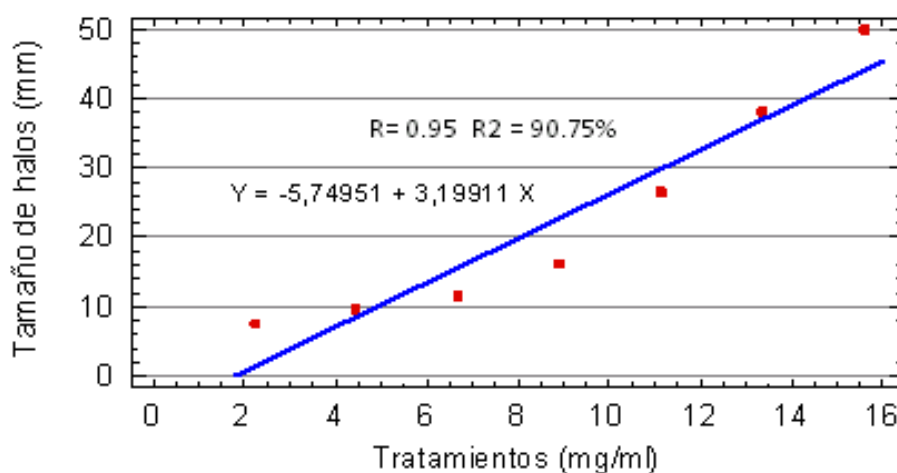


Gráfico 01: Análisis de correlación y regresión lineal simple entre el tamaño de los halos y la concentración de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.* en estudio frente a *Escherichia coli* ATCC 11225.

El gráfico 01, nos muestra que existe una alta correlación entre las variables estudio, la ecuación señala que por cada unidad (mg/ml) de concentración del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* el crecimiento de los halos se incrementa en 3,19911mm. El coeficiente de Pearsón de 0,95 indica una alta correlación entre las variables, el coeficiente de determinación fue de R= 90,75 este valor indica que la regresión explica que el 90,75% del crecimiento de los halos está determinada por las concentraciones de aceite esencial.

Cuadro 05: Prueba de significación de Tukey para los promedios de los halos de inhibición de los diferentes tratamientos del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.* frente a *Escherichia coli* ATCC 11225.

Orden de mérito	Tratamientos (mg/ml)	Promedio de halos (mm)	Significancia (α 0,05)
1	T ₇ :	50,0	a
2	T ₆ :	38,0	b
3	T ₅ :	26,5	c
4	T ₄ :	16,25	d
5	T ₃ :	11,5	d e
6	T ₂ :	9,5	d e
7	T ₁ :	7,5	e

La prueba de significación de Tukey registra los promedios de los diferentes tratamientos del aceite esencial, cabe destacar que el mayor promedio lo tiene el tratamiento T₇ seguido del tratamiento T₆, T₅ y T₄ que son estadísticamente diferentes. Sin embargo a partir del tratamiento T₃ hasta el tratamiento T₁ son estadísticamente homogéneos pero diferentes en sus promedios.

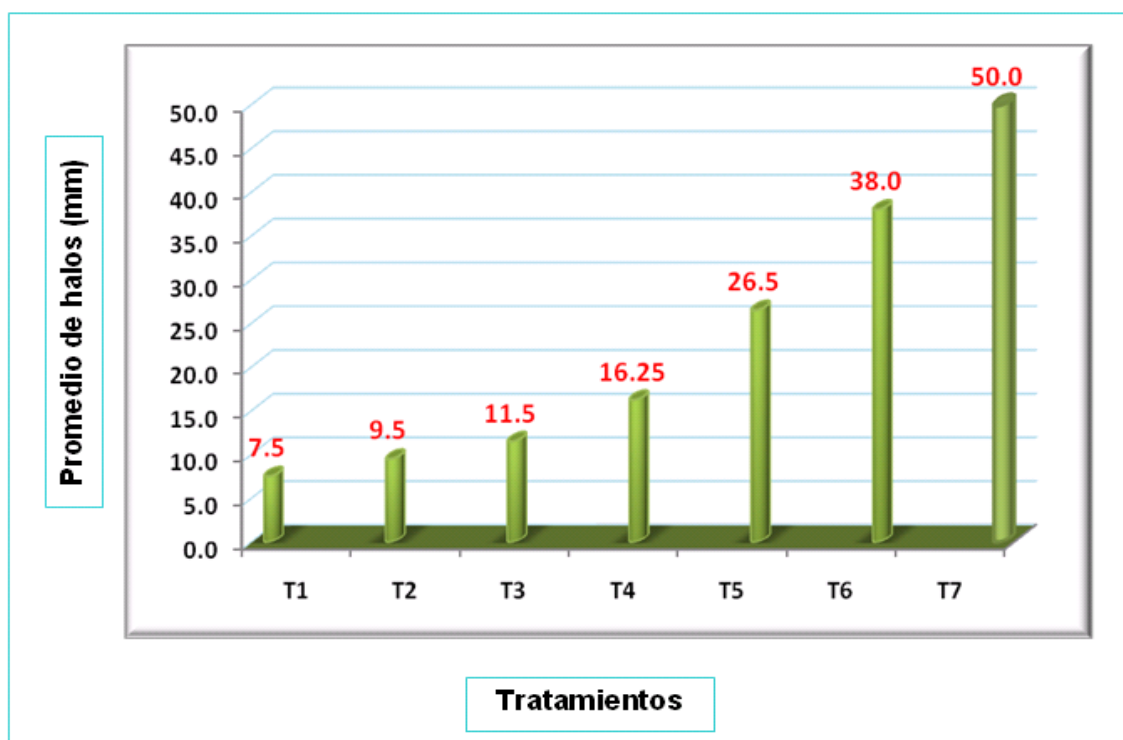


Figura 01: Promedio de cada uno de los halos y los tratamientos del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.* en estudio frente a *Escherichia coli* ATCC 11225.

En la Figura 01, se observa los promedios de cada uno de los tratamientos en estudio donde se determinó que el mayor promedio lo obtiene el tratamiento T7 que alcanzó el mayor promedio de 50 mm. Los promedios más bajos corresponden a los tratamientos T2 y T1 con 9,5 y 7,5 mm respectivamente.

CUADRO 06: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) producido por el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.* “romero” frente a *Escherichia coli ATCC 11225*.

Tratamiento	Concentración (mg/ml)	Turbidez
T1	5,93 mg/ ml	T
T2	6,23 mg/ ml	T
T3	6,53 mg/ ml	T
T4	6,83 mg/ ml	NT
T5	7,12 mg/ ml	NT
T6	7,42 mg/ ml	NT
T7	7,72 mg/ ml	NT
T8	8,01 mg/ ml	NT
T9	8,31 mg/ ml	NT
T10	8,61 mg/ ml	NT

T11	8,90 mg/ ml	NT
T12	9,20 mg/ ml	NT
T13	9,50 mg/ ml	NT
T14	9.79 mg/ ml	NT
T15	10.09mg/ ml	NT
TP	Control Positivo	T
TN	Control Negativo	NT

Fuente: Elaboración propia.

T: Presenta turbidez.

NT: No Presenta turbidez.

El Cuadro 06, muestra la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, donde se observa que a partir de la concentración de 6,83 mg/ml inhibe el crecimiento bacteriano; mas no se nota a partir de 5,93 mg/ml. Por tanto, la CMI para *Escherichia coli* ATCC 11225 fue de 6,83 mg/ ml.

CUADRO 07: Concentración Mínima Bactericida (CMB) producido por el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.* “romero” frente a *Escherichia coli* ATCC 11225.

Nº Tubos	Nº Placas	Conc. mg/ml	UFC/Placa	Observaciones
4	1	6,83 mg/ml	2	
5	2	7,12 mg/ml	0	CMB
6	3	7,42 mg/ml	0	

Fuente: Elaboración propia.

El Cuadro 07, muestra la determinación de la Concentración Mínima Bactericida, basándonos a partir de los resultados obtenidos del Cuadro 6; tomando los 3 primeros tubos en donde no se evidenció turbidez. Encontrándose que en el tubo 5 con la concentración de 7,12 mg/ml hay inhibición total del crecimiento bacteriano; mientras que en el tubo 4 a una concentración de 6.83 mg/ml hay aun el crecimiento de 2 ufc.

Cuadro 08: Evaluación antimicrobiana *in vitro* del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 por el método de difusión en disco de kirby-Bauer.

Tratamiento	Aceite esencial		Ø Halo de inhibición (mm)				Promedio de halos (mm)
			Repeticiones				
	Volumen	Conc.(mg/ml)	I	II	III	IV	
T1	2,5 µl	2,23	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0
T2	5,0 µl	4,45	11,0	11,0	11,0	11,0	11,0
T3	7,5 µl	6,68	11,0	11,0	12,0	12,0	11,5
T4	10,0 µl	8,91	14,0	15,0	17,0	17,0	15,75
T5	12,5 µl	11,14	17,0	19,0	25,0	27,0	22,0
T6	15,0 µl	13,36	19,0	20,0	27,0	29,0	23,75
T7	17,5 µl	15,59	22,0	22,0	29,0	32,0	26,25
T8	20,0 µl	17,82	No hubo crecimiento bacteriano				

Fuente: Elaboración propia.

En el Cuadro 08, se observa el efecto antibacteriano de los 7 tratamientos probados evidenciándose halos de inhibición entre 7,0 y 26,25 mm de diámetro. Siendo la concentración de 15,59 mg/ ml la que generó el halo

de mayor tamaño. Sin embargo, en el tratamiento T8 a la concentración de 17,82 mg/ml se evidenció la inhibición total del crecimiento bacteriano.

Cuadro 09: Determinación del grado de sensibilidad de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” según Duraffourd (1983).

Aceite esencial			Grado de sensibilidad		
N °	Volumen	Conc.(mg/ml)	Sensibilidad límite entre 9 a 14 mm (sensible = +)	Sensibilidad media entre 15 a 19 mm (muy sensible = ++)	Sumamente sensible de 20 mm a más (S.S. = +++)
T1	2,5 µl	2,23			
T2	5,0 µl	4,45	11,0		
T3	7,5 µl	6,68	11,5		
T4	10,0 µl	8,91		15,75	
T5	12,5 µl	11,14			22,0
T6	15,0 µl	13,36			23,75
T7	17,5 µl	15,59			26,25
T8	20,0 µl	17,82	-	-	-

Fuente: Elaboración propia.

En el cuadro 09, según **Duraffourd (1983)**, se reporta la sensibilidad a partir del tratamiento T2 con un halo promedio de 11,0 mm a la concentración de 4,45 mg/ml, hasta el tratamiento T7. En cambio, no se reporta señales de sensibilidad para el T8.

Cuadro 10: Análisis de varianza para comparar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.* a través de la variación de los promedios de los halos de inhibición frente a *Staphylococcus aureus ATCC 25923* entre los diferentes tratamientos.

Fuentes de variabilidad	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculado	Significación	
					0,05	0,01
TRATAMIENTO (Concentraciones)	6	1294,0	215,667	36,426	2,66	4,01 **
BLOQUE (Halos)	3	120,679	40,2262	6,794	3,16	5,09 **
ERROR	18	106,571	5,92063			
TOTAL	27	1521,25				

** Diferencias altamente significativas

El análisis de varianza, utilizado para Fc fue de 0,05 y 0,01% de probabilidad, de promedios de halos de inhibición, indica que existen diferencias estadísticas al nivel halos, es decir estadísticamente influyeron sobre la variable en estudio, para el caso de las tratamientos se

encontraron diferencias altamente significativas, por lo que deducimos que existe suficiente evidencia estadística para señalar que las diferentes tratamientos influyeron directamente sobre la variable en estudio, con un nivel de confianza del 99%.

Cuadro 11: Análisis de varianza de regresión lineal simple para el tamaño de los halos de inhibición entre las diferentes concentraciones del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.* frente a *Staphylococcus aureus ATCC 25923.*

Fuentes de variabilidad	SC	G L	CM	F	Significación 0,05 0,01
Regresión	313,911	1	313,911	163,68	6,608 16,258 **
Error	9,5889	5	1,9177		
Total	323,500	6			

* * Diferencias altamente significativas

1. Formular la Hipótesis:

H₀: No existe relación entre la concentración de aceite esencial y el tamaño de los halos.

H₁: Si existe relación entre la concentración de aceite esencial y el tamaño de los halos.

2. Nivel de significancia: $\alpha = 0,05; 0,01$

3. Estadístico de prueba: $F_c = 163,68$

4. Decisión: $F_c > \alpha = 0,05; 0,01$ Por lo tanto se rechaza la hipótesis H_0 .

5. Conclusión: Se concluye que la relación es altamente significativa entre la concentración del aceite esencial y el tamaño de los halos, es decir están relacionados linealmente con un nivel de confianza del 99%.

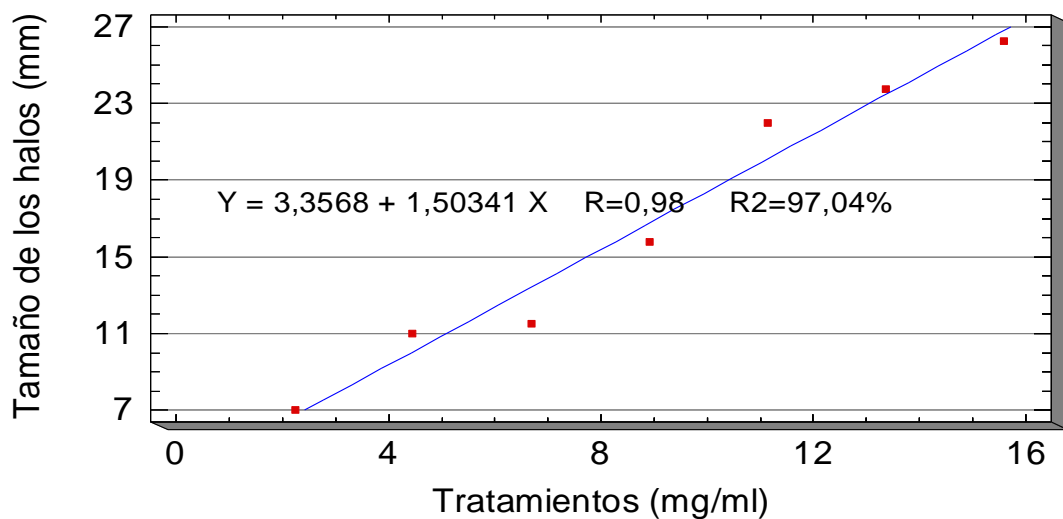


Gráfico 02: Análisis de correlación y regresión lineal simple entre el tamaño de los halos y la concentración de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. en estudio frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

El gráfico 02, muestra que existe una alta correlación entre las variables estudio, la ecuación señala que por cada unidad (mg/ml) de concentración de aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* el tamaño de los halos se incrementa en 1,50341mm. El coeficiente de Pearsón de 0,98 indica una alta correlación entre las variables, el coeficiente de determinación fue de R= 97,04, este valor indica que la regresión simple explica que el 97,04 % del tamaño de los halos está determinada por las concentraciones de aceite esencial.

Cuadro 12: Prueba de significación de Tukey para los promedios de los halos de inhibición de los diferentes tratamientos del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Orden de mérito	Tratamientos (mg/ml)	Promedio de halos (mm)	Significancia (α 0,05)
1	T ₇ :	26,25	a
2	T ₆ :	23,75	a
3	T ₅	22,0	a
4	T ₄	15,75	b
5	T ₃	11,5	b c
6	T ₂ :	11,0	b c
7	T ₁ :	7,0	c

La prueba de significación de Tukey registra los promedios de los tratamientos donde destacan con el mayor promedio el tratamiento T₇, T₆ y T₅ siendo estadísticamente similares en sus promedio; en segundo lugar se observa que el tratamiento T₄, T₃ y T₂ son también estadísticamente similares y finalmente el T₁ tuvo el menor promedio con 7,0mm.

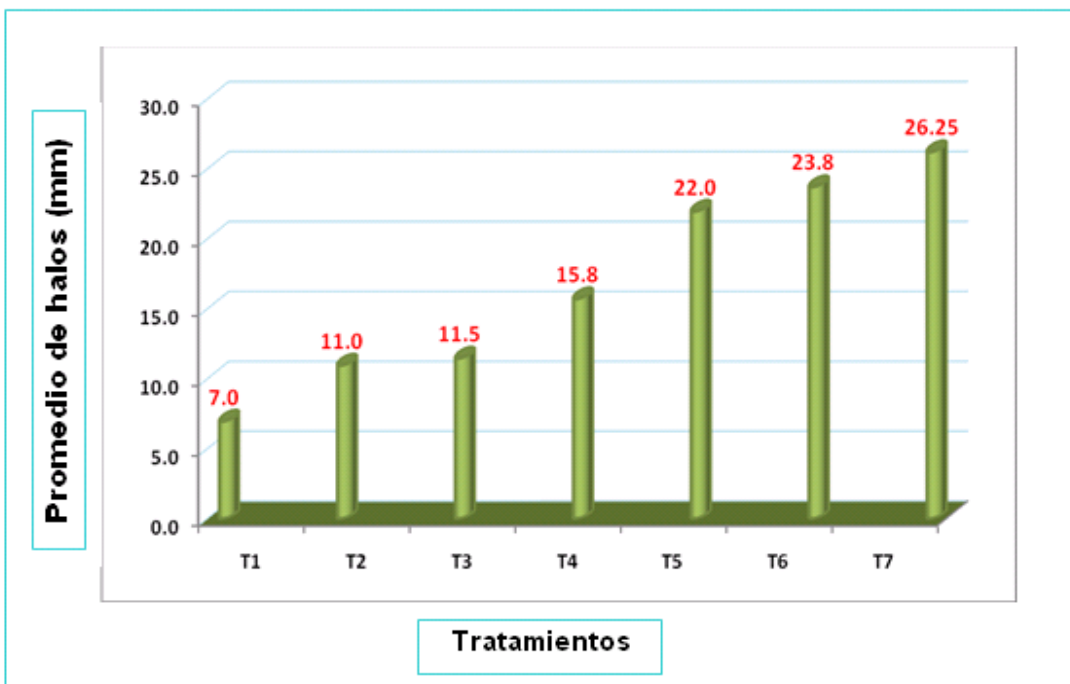


Figura 02: Promedio de cada uno de los halos y los tratamientos del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.* en estudio frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

En la Figura 02, se observa los promedios de cada uno de los tratamientos en estudio donde se determinó que el mayor promedio lo obtiene el tratamiento T7 que alcanzó el mayor promedio de 26,25 mm. El promedio más bajo corresponde al tratamiento T1 con diámetro promedio de 7,0 mm.

CUADRO 13: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) producido por el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.* “romero” frente a *Staphylococcus aureus ATCC 25923*.

Tratamiento	Concentración (mg/ml)	Turbidez
T1	5,93 mg/ ml	T
T2	6,23 mg/ ml	T
T3	6,53 mg/ ml	T
T4	6,83 mg/ ml	T
T5	7,12 mg/ ml	T
T6	7,42 mg/ ml	T
T7	7,72 mg/ ml	T
T8	8,01 mg/ ml	T
T9	8,31 mg/ ml	T

T10	8,61 mg/ ml	T
T11	8,90 mg/ ml	T
T12	9,20 mg/ ml	T
T13	9,50 mg/ ml	NT
T14	9,79 mg/ ml	NT
T15	10,09 mg/ml	NT
TP	Control Positivo	T
TN	Control Negativo	NT

Fuente: Elaboración propia

T: Presenta turbidez.

NT: No Presenta turbidez.

El Cuadro 13, muestra la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis*, donde se observa que a partir de la concentración 9,50 mg/ml no se evidenció el crecimiento bacteriano; no obstante, a partir de la concentración de 5,93 mg/ml si se muestra desarrollo bacteriano. Por tanto, la CMI para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es de 9.50 mg/ml.

CUADRO 14: Concentración Mínima Bactericida (CMB) producido por el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.* “romero” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Nº Tubos	Nº Placas	Conc. mg/ml	UFC/Placa	Observaciones
13	1	9,50 mg/ml	4	
14	2	9,79 mg/ml	2	
15	3	10,09 mg/ml	0	CMB

Fuente: Elaboración propia

El Cuadro14, muestra la determinación de la Concentración Mínima Bactericida, basándonos a partir de los resultados obtenidos del Cuadro 13; tomando los 3 primeros tubos en donde no se evidenció turbidez. Encontrándose que en el tubo 15 con la concentración de 10,09 mg/ml hay una inhibición total del crecimiento bacteriano; mientras que en el tubo 13 y 14 a una concentración de 9,50 mg/ml y 9,79 mg/ml existe aun el crecimiento de 4 ufc y 2 ufc respectivamente.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Numerosas son las investigaciones que se han realizado encaminadas a la búsqueda de nuevos componentes con actividad antimicrobiana a partir de fuentes naturales, dentro de ellos un considerable número de estudios han sido encaminados hacia la evolución de la actividad antimicrobiana en extractos y aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. Para ello se han empleado técnicas “in vitro” dada la reproductibilidad de las mismas.

Dentro de las prioridades en investigación en salud en el Perú está el encontrar alternativas que promuevan o faciliten el acceso a la salud para todos en la Costa, Sierra y Selva del Perú (Alvarado, 1989). Durante los últimos años, la medicina tradicional ha cobrado gran impulso y crédito creciente en todo el mundo. No obstante, una de las conclusiones más notables y reiteradas de las reuniones nacionales e internacionales celebradas sobre este tema es que existen factores que siguen entorpeciendo su equipación con la medicina moderna. El reconocimiento de los valores teóricos y prácticos de la medicina tradicional es lento.

En el presente estudio se demostró las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “romero”. Los cuales fueron ensayados en la prueba de difusión de disco o Kirby Bauer frente a bacterias patógenas representativas en la práctica médica, específicamente con *Staphylococcus aureus* **ATCC 25923** y *Escherichia coli* **ATTC 11225**.

Conociendo, empíricamente, algunas de sus propiedades medicinales de *Rosmarinus officinalis* y su aplicación en diferentes áreas. Fueron las razones que motivó el estudio de su aceite esencial. Para ello se realizó un pre-ensayo para observar si esta sustancia presenta actividad antibacteriana.

Muchos métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos. En muchos laboratorios de microbiología clínica, el test de difusión en agar es usado en forma rutinaria para bacterias de rápido crecimiento y algunas bacterias patógenas fastidiosas. Para el presente trabajo se incluyó un método estandarizado de difusión en disco descrito por el Laboratorio Internacional de Referencia (NCCLS, 2002).

Los ensayos de susceptibilidad basados solamente en la presencia o ausencia de una zona de inhibición sin importar su tamaño, no son aceptables. Resultados confiables sólo se pueden obtener con un disco de ensayo de difusión que use el principio de metodología estandarizada y con medidas de diámetro de zona, correlacionados con la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) con cepas conocidas susceptibles y resistentes a varios antibióticos.

En estudios realizados con drogas vegetales para comprobar una eventual actividad antibacteriana, se emplean métodos de difusión en placa con discos o método de diluciones en caldo o en agar. El método de difusión en placa consiste en impregnar discos de papel de filtro con la sustancia vegetal, se aplican los discos en el cultivo y se incuba a 37°C por 24 horas. Para la interpretación de los resultados se consideraron como referencia las pautas dadas por Duraffourd, 1983, que considera la actividad de los aceites esenciales como: Nula, para un diámetro inferior o igual a 9 mm, Sensibilidad límite o sensible entre 9 a 14 mm, Sensibilidad media o muy sensible entre 15 a 19 mm, y finalmente para un diámetro igual o superior a 20 mm la Sensibilidad es considerara como sumamente sensible (Duraffourd, 1983).

El método usado para la obtención del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* fue la destilación por arrastre con vapor de agua. Esta técnica es muy utilizada, para esencias fluidas, especialmente las utilizadas para perfumerías. Se utiliza a nivel industrial debido a su alto rendimiento, la pureza del aceite obtenido y porque no requiere tecnología sofisticada a diferencia de los otros métodos como: el método de la expresión, utilizado solo para esencias cítricas; Extracción con solventes volátiles, el cual resulta costoso por el valor comercial de los solventes y por el riesgo de explosión e incendio y porque se obtienen sustancias impurificadas; Enfleurage o enflorado, técnica empleada para la obtención de esencias florales, pero su bajo rendimiento y la difícil separación del aceite extractor lo hacen costoso (Martínez, 2001).

En el presente trabajo de investigación se demostró las propiedades antimicrobianas del aceite esencial de ***Rosmarinus officinalis***, donde los resultados obtenidos pusieron de manifiesto la actividad exhibida por el aceite esencial frente a bacterias patógenas Grampositiva y Gramnegativa: ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** y ***Escherichia coli* ATCC 11225** respectivamente. Este estudio señaló que ***Escherichia coli* ATCC 11225** fue muy sensible frente al aceite esencial de ***Rosmarinus officinalis* L.**

En todas las pruebas de sensibilidad se empleó el dimetilsulfóxido (DMSO) que es un líquido incoloro que se utiliza básicamente como solvente industrial. Es un disolvente aprótico de baja toxicidad recomendado por la NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), para su uso en pruebas de sensibilidad para bacterias. En el presente estudio no se observó en ninguna de las pruebas (controles) efecto de este solvente sobre ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** y ***Escherichia coli* ATCC 11225**, por lo que los resultados obtenidos sólo serían atribuibles al aceite esencial de ***Rosmarinus officinalis* L.** “romero”.

De los resultados obtenidos en el Cuadro 01, para ***Escherichia coli* ATCC 11225**, se puede apreciar que la sensibilidad empieza a partir del tratamiento T3 (6,68 mg) formando un diámetro de halo promedio de 11,5 llegando hasta generar un halo promedio de 50,0 mm, tratamiento T7 (15,59 mg).

De acuerdo a los estudios realizados por Moreira y col, 2005; quienes demostraron la actividad antimicrobiana del aceite esencial de hojas de ***R. officinalis*** contra varias cepas de *E. coli*, con halos de inhibición entre 18 y 21 mm. Por otro lado en el Cuadro 08, para ***Staphylococcus aureus***

ATCC 25923 se observa que la sensibilidad empieza a partir del tratamiento T2 (4,45 mg) formando un halo promedio de 11,0 mm hasta crear un halo promedio de 26,25 mm; tratamiento T7 (15,59 mg). Estos resultados se deben a la composición de la pared celular y la estructura de la membrana externa de las bacterias Grampositivas y Gramnegativas y su interacción con los componentes fitoquímicos del aceite esencial de “romero” (anexo 01).

Así mismo, se observó en ambos Cuadros 01 y 08, que a partir del tratamiento T8 (17,82 mg) los halos de inhibición superaron el diámetro de la placa en la que se hizo el estudio *in vitro*, concluyendo que inhibían en su totalidad a las especies bacterianas ensayadas. Por tanto, el aceite esencial de ***Rosmarinus officinalis L.*** “romero” inhibe el crecimiento de las dos bacterias que se ha usado en el presente estudio. Pero mostró una sensibilidad mayor sobre ***Escherichia coli* ATCC 11225** que en ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** como se puede observar en los Cuadros 01 y 08, ya que a un mismo volumen de aceite esencial los halos de inhibición para ***Escherichia coli* ATCC 11225** fueron de mayor tamaño. En este contexto, se puede hipotetizar que la actividad antimicrobiana observada en este trabajo podría ser atribuida a una interacción o efecto sinérgico de los principios activos (Bruneton, 1994),

cuya acción es la de provocar lesiones en la membrana citoplasmática, ocasionando alteraciones en la composición interna de la célula bacteriana (Hernández, 1991).

Al efectuar el análisis de varianza (ANOVA) para el promedio de los halos de inhibición de los diferentes tratamientos sobre ***Escherichia coli* ATTC 11225** (Cuadro 01) y ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** (Cuadro 08), se observa que para las dos especies existen diferencias significativas entre los tratamientos. Más no existe diferencia estadística a nivel de halos, para ***Escherichia coli* ATTC 11225** y para el caso de, ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** indica que existen diferencias estadísticas al nivel halos. Por lo que al realizar la prueba de regresión lineal simple para cada una de las especies se observa que existe una relación altamente significativa entre la concentración de aceite esencial y el tamaño de los halos; es decir que la ecuación de regresión lineal simple señala que por cada unidad (mg/ml) de concentración de aceite esencial el crecimiento de los halos se incrementa en 3,19911 mm para el caso de ***E. coli* ATTC 11225** y para el caso de ***S. aureus* ATCC 25923** la ecuación señala que por cada unidad (mg/ml) de concentración de aceite esencial el crecimiento de los halos se incrementa en 1,50341 mm. Al realizar la prueba de Tukey para cada una de las especies se confirma

que a la concentración de 15,59 mg/ml (T7) tuvo mayor actividad inhibitoria frente a ***E. coli* ATCC 11225** y frente a ***S. aureus* ATCC 25923**. Esta prueba confirma que esta concentración es la de mayor acción antibacteriana y por lo tanto la que contiene cantidades apreciables de principios activos de ***R. officinalis*** con actividad antimicrobiana como se puede observar en el Anexo 01.

Como se puede observar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en los Cuadros 06 y 13, para el caso de ***Escherichia coli* ATCC 11225** fue de **6.83 mg/ml**, a diferencia de ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** que fue de **9.50 mg/ml** respectivamente. Por lo que se puede inferir que el aceite esencial presentó una actividad relativamente menor frente a ***E. coli* ATCC 11225** que a ***S. aureus* ATCC 25923**. Sin embargo, estos resultados obtenidos son diferentes con los estudios realizados por Castaño y col. 2010, quienes determinaron la CMI del aceite esencial de ***R. officinalis*** sobre ***E. coli* ATCC 8739** a valores de 4.096 mg/ml y para ***S. aureus* ATCC 6538** a 1.024 mg/ml. Además, Burt y col. 2007, realizaron la evaluación de CMI del aceite esencial de romero contra: ***S. typhimurium***, ***B. cereus*** y ***S. aureus***, obteniendo valores de 20, 2 y 8 mg/ml, respectivamente. En efecto, se puede apreciar que no existe una actividad selectiva del aceite esencial por algún tipo de bacteria en

especial, sino que su acción, frente a los microorganismos evaluados, es de amplio espectro.

Así mismo se determinó la Concentración Mínima Bactericida (CMB) a partir de las diluciones que salieron negativas en la CMI como se observa en los Cuadros 07 y 13, donde se pudo estimar que CMB para ***Escherichia coli* ATCC 11225** fue de **7.12 mg/ml**, en tanto que para ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** fue de **10.09 mg/ml** respectivamente. Donde se puede apreciar que el aceite esencial presentó una actividad relativamente menor frente a ***E. coli* ATCC 11225** que a ***S. aureus* ATCC 25923**. Sin embargo, según Roldán 2010, demostró que la CMB de *Rosmarinus officinalis* frente a ***Escherichia coli* ATCC 25922** es ≤ 20 mg/ml, paralelamente obtuvo la CMB para ***Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356** a ≤ 80 mg/ml. Esta diferencia podría deberse que aún cuando se trata de una misma especie vegetal, está puede presentar ligeras diferencias entre los compuestos fitoquímicos presentes en la planta (Perú - Colombia). Generalmente se acepta que los aceites son más activos contra bacterias Grampositivas que con bacterias Gramnegativas (Lemos *et al.*, 1990, Smith – Palmer *et al.*, 1998, Burt y Reinders, 2003). Sin embargo, en algunos estudios las bacterias Gramnegativas fueron más sensibles (Kim *et al.*, 1995). Además

de la complejidad de los aceites, hay evidencia que el tiempo de cosecha influye en la composición del aceite y su actividad biológica, otros factores como el genotipo, origen geográfico, ambiental y condiciones agroeconómicas, todos pueden influir en la composición del producto natural, del mismo modo depende también de la forma de tratamiento de la especie vegetal como del método utilizado para su extracción (Svoboda, 1999).

De acuerdo al estudio que se realizó al aceite esencial de ***Rosmarinus officinalis L.*** “romero” en las instalaciones de la Universidad Católica Santa María, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, Laboratorio de ensayo y control de calidad de Arequipa (Anexo 1 y 2). Se observa en forma cuantitativa la presencia de monoterpenos hidrocarbonados: **alfa-pineno** en un 22.69% y limoneno en 2.81% y monoterpenos oxigenados: Eucaliptol o **1,8 cineol** en un 20.21%, y Bicyclo (2.2.1) heptan-2-one, 1, 7,7-trimethyl o **alcanfor** en un 13.36%. Sin embargo, Roldán 2010, por cromatografía gaseosa detectó en el aceite esencial de *Rosmarinus officinalis L.* “romero” en forma cuantitativa principalmente la presencia de: alfa-pineno en un 17.90%, limoneno 0%, alcanfor 12.25% y 1,8 cineol o eucaliptol en un 28.05%. Por lo tanto, la acción antibacteriana demostrada por el aceite esencial de

***Rosmarinus officinalis* L.** “romero” se basaría en estos compuestos bioactivos, básicamente monoterpenos, los cuales tienen propiedades antimicrobianas.

La mayor sensibilidad de ***Escherichia coli* ATCC 11225** con respecto a ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923** frente al espectro de inhibición del aceite esencial de “romero” pueden ser explicados por los posibles mecanismos de daño a la membrana celular bacteriana debido al incremento de su permeabilidad y la afectación de su estructura que como consecuencia tiene lugar una fuga de iones y de otros contenidos celulares, de forma más o menos intensa que puede llevar a la muerte celular. Este daño se genera por la desestabilización de la capa lipídica debido a la interacción de los terpenos presentes en el aceite esencial, con las moléculas de la membrana. El estudio presente demostró que el potencial antimicrobiano del aceite esencial de ***Rosmarinus officinalis*** no depende solo de la composición química del aceite sino también de la estructura celular del microorganismo propiamente tal.

En general, los resultados sugieren la realización de mayores estudios *in vitro* e *in vivo* considerando las diferentes especies, para determinar susceptibilidades de cada una de ellas, ampliando otros métodos de

extracción, utilizando diferentes partes del vegetal o, en su defecto, realizar un estudio fitoquímico empleando otras especies botánicas en especial con las autóctonas registradas en nuestra región. Entonces es necesario dar una aplicación científica que justifique el uso tradicional en el Perú de las plantas medicinales; el conocimiento de su composición química y las propiedades terapéuticas que manifiesten, lo cual nos permitirá una mayor confiabilidad de sus usos.

Por lo tanto, los resultados del presente estudio permitieron confirmar que las hojas de ***Rosmarinus officinalis*** “romero” es productora de compuestos bioactivos, principalmente monoterpenos hidrocarbonados y oxigenados, con efecto antibacteriano *in vitro* frente a ***Escherichia coli* ATCC 11225** y ***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**.

CONCLUSIONES

- Se determinó que el aceite esencial de las hojas de *Rosmarinus officinalis* L presenta compuestos bioactivos, principalmente monoterpenos, con efecto antimicrobiana *in vitro* frente a *E. coli* ATTC11225 y *S. aureus* ATCC 25923.
- El aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L “romero” frente a *Escherichia coli* ATTC11225, produjo un diámetro de halo de inhibición promedio de 50.0 mm y frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, generó un diámetro de halo de inhibición promedio de 26.25 mm.
- La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L “romero” frente a *Escherichia coli* ATTC11225 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue de 6.83 mg/ml y 9.50 mg/ml respectivamente.
- La Concentración Mínima Bactericida (CMB) del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L “romero” frente a *Escherichia coli* ATTC11225 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue de 7.12 mg/ml y 10.09 mg/ml respectivamente.

RECOMENDACIONES

- Se debe valorar la actividad antibacteriana del aceite esencial ***Rosmarinus officinalis L*** “romero” frente a otras bacterias Grampositivas y Gramnegativas, de tal modo se cubrirá casi todo el espectro bacteriano para convertirse en una alternativa natural.
- Se recomienda realizar otro tipo de extracción de ***Rosmarinus officinalis L*** “romero”, para las pruebas de comparación como del extracto acuoso, hidroalcohólico, para de este modo lograr cuan efectivas son las diferentes extracciones y cómo variarán su espectro antimicrobiano frente a bacterias de importancia clínica.
- Corroborar luego del estudio in Vitro en animales de laboratorio, su efecto antibacteriano en ensayos clínicos. Para de esta manera, continuar con estudios de toxicidad subaguda, toxicidad crónica, teratogenicidad y sus efectos adversos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **ARAUJO, J.; DÍAZ R. & SALAS, A. 2008.** Actividad antimicrobiana de plantas. Universidad Científica del Sur. Rev. Científica del Sur. Fondo Editorial de la UCS.
2. **ARTECHE, A.; VANACLOCHA, B.; GÜENECHEA, J. & MARTINEZ, R. 1998.** Fitoterapia (3.a edición). Vademécum de prescripción. Plantas medicinales. Barcelona. Editorial - Masson.
3. **ALVARADO, CH. 1989.** Plantas medicinales del Perú. Editorial - CONCYTEC. Lima – Perú.
4. **BARH, R. F. 1988.** Plantas medicinales. Virtudes insospechadas de plantas conocidas. Ediciones Readers Digest. México, D. F., Pág. 63-87.
5. **BRUNETON, J. 2001.** Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. Segunda edición. Ed. Acribia.
6. **BRACK, A. & HEINZ, P. 2002. PERÚ MARAVILLOSO.** Edit. Epenza.1. Empresa Periodística Nacional SAC. Lima – Perú.

7. **CHAVEZ, A. 1997.** La materia Médica del Incanato. Editorial Mejía Baca Lima. 10 Págs.

8. **CASTAÑO P, HADER I.; CIRO G, GELMY.; ZAPATA M, JOSÉ E.; & JIMÉNEZ R, SILVIA L. 2010.** Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis L.* sobre algunas bacterias de interés alimentario. Vol. 17, número 2. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. págs. 149-154.

9. **CONA, E. 2002.** Condiciones para un buen Estudio de Susceptibilidad Mediante Test de Difusión en Agar. Rev Chil Infec. Vol. 19. Pág. 77-81.

10. **CONNER, D. 1993. NATURALLY OCCURRING COMPOUNDS.**
En A. Branen & P. Davison (Eds.). Antimicrobials in foods (2th ed) (p. 441-468) New York: Marcel Dekker, Inc.

11. **CRONQUIST, A. 1981.** An integrated system of classifications of flowering plant. Columbia university press New York 1262 pp.

- 12. DURAFFOURD, C. & J., LAPRAZ. 1983.** Cuaderno de Fitoterapia Clínica. Editorial Masson – Francia.
- 13. FERNÁNDEZ, O. & ALE, O. 2008.** Cultivo de Plantas Aromáticas y Medicinales de la Región de Tacna. Ediciones. Escuela de Campo FCAG/UNJBG-Tacna.
- 14. GARCÍA BARRIGA, H. 1992.** Flora medicinal de Colombia. Botánica Médica. Segunda edición. Tercer Mundo Editores. Bogotá, pp. 29-31, 506.
- 15. GONZÁLEZ, P. 1984.** "Utilización Terapéutica de Nuestras Plantas Medicinales", Universidad de La Salle, Bogotá, Capítulo VI.
- 16. GRANADOS, R. & VILLAVERDE, C. 1996.** Bacteriología. Características y clasificación bacteriana y Virología. Características y técnicas bioquímicas. Editorial Paraninfo Magallanes - Madrid.
- 17. GARCIA RODRIGUEZ, J. A.; & PICAZO, J.J. 1996.** Microbiología Médica. Tomo II. Editorial Elsevier - España 606p.

- 18. HERNÁNDEZ, T. & RODRÍGUEZ M. 1991.** Estudio in vitro de la acción fungicida y bactericida del aceite esencial Camazuleno (obtenido de la manzanilla), frente a microorganismos aislados de lesiones bucofaríngeas. Rev. Cubana.
- 19. HERNANDEZ, L. 2003.** Actividad inhibitoria letal de los extractos de ajo para *E. coli* y *L. Innocua*.
- 20. JAWETZ, M. & ADELBERG. 1996.** Manual de Microbiología Médica. 14^o Edición. Editorial el Manual moderno. México.
- 21. KALEMBA, D. & KUNICKA, A. 2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry. 10, pp.813-829.
- 22. KONEMAN, E. W.; ALLEN, M.D.; STEPHEN, D.; & WILLIAM, M. 2004.** Diagnostico microbiológico 5ta edición. Editorial Médica Panamericana S. A. Madrid - España.
- 23. MARTÍNEZ, A. 2001.** Aceites Esenciales. Facultad de Química Farmacéutica. Medellin. amart@muiscas.udea.edu

- 24. MOREIRA, M.R.; PONCE, A.G.; DEL VALLE, C.E.; & ROURA, S.I. 2005.** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Food Sci Technol Int.* Aug;38 (5): 565-570.
- 25. MURRAY, P. K. & ROSENTHA, L. 2006.** *Microbiología Médica*, 5ta edición. Editorial Elsevier, Madrid.
- 26. MINISTERIO DE SALUD. 2002.** Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Difusión. Serie de Normas técnicas N° 30 Lima.
- 27. MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; & PARKER, J. 2004.** *Biología de los Microorganismos*. Brock. 10ª Edición. Editorial: Pearson - Alha. Pags: 1089.
- 28. NYCHAS, J. 1995.** Natural antimicrobials from plants. En: Gould G W. (Ed.), *New Methods of Foo Preservation* p. 59-89. London: Champman & Hall.

- 29. NATIONAL COMITÉ FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. 2002.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard.
- 30. OMS. 1979.** Plantas medicinales: un modelo de curación, clasificación popular correlativa de plantas y enfermedades en una comunidad rural andino-venezolano. Informes técnicos. Vol. II N° 6.
- 31. RESTREPO, A., ROBLEDO, J. & BEDOYA, V. 1996.** Fundamento de Medicina. Enfermedades infecciosas. Quinta Edición. Editorial Corporación para Investigación Biológica. Medellín - Colombia.
- 32. FORERO, R. & LINA, P. 2010.** Extracción de aceites esenciales, composición química y evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro. UNC Bogota D.C. Trabajo de grado presentado para optar al título de Magíster en Producción Animal, línea de profundización en nutrición de monogástricos.
- 33. SANCHEZ, L. 1997.** Staphylococcus un patógeno de gran virulencia. Rev. Medica, Edición N ° 16/17 Perú.

34. VAN GINKEL, A. 2003. Apuntes del Máster y Diplomatura de posgrado de la UAB “Plantas Medicinales y Fitoterapia. Módulo 2. Cultivo de plantas medicinales. Tecnología y Producción.”

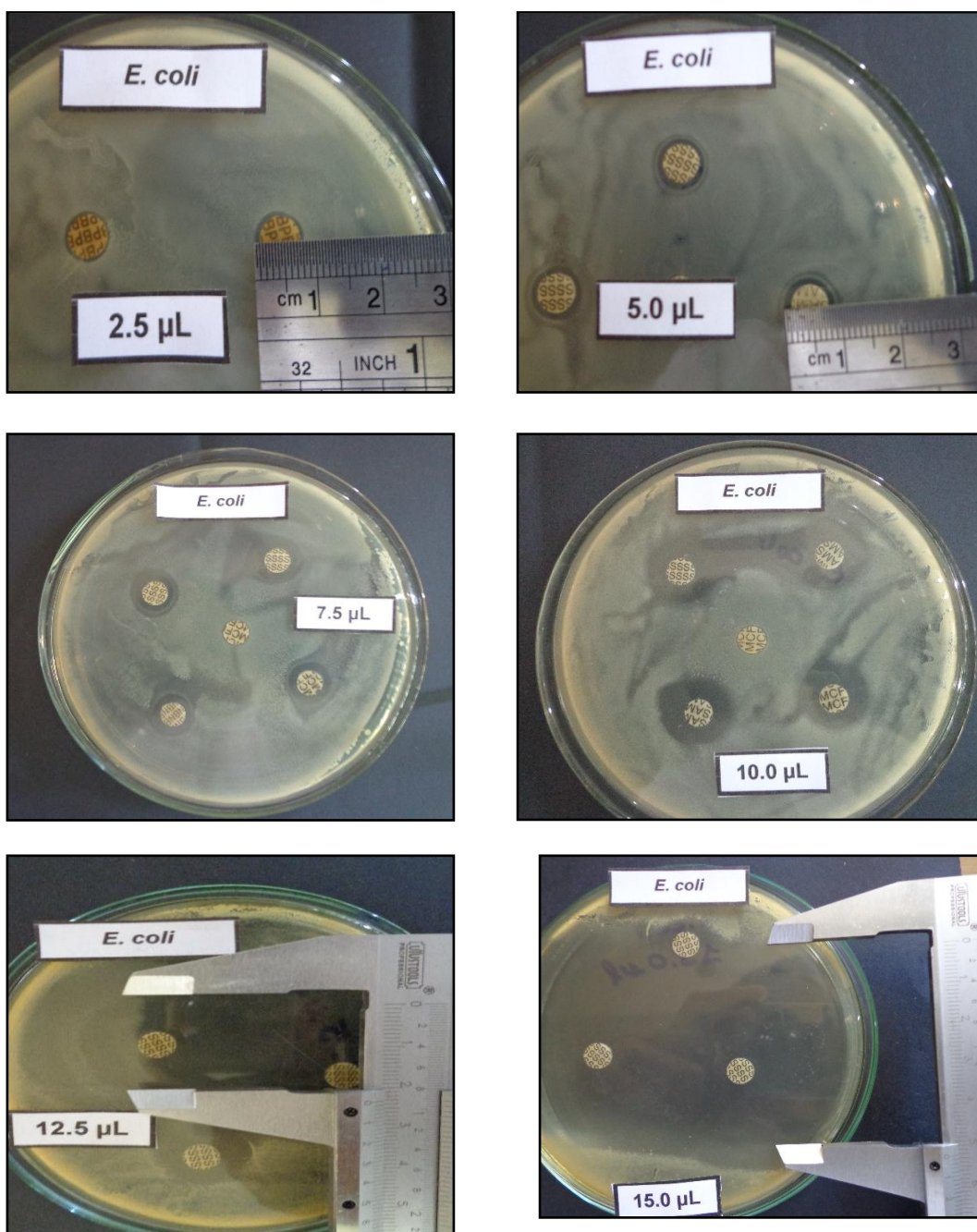
35. SVOBODA, K. and HAMPSON, J. 1999. Bioactivity of Essentials oil of selected temperate aromatic plants. Plant biology departamentet SAC, Auchincruive, Ayr, Scotland, UK.

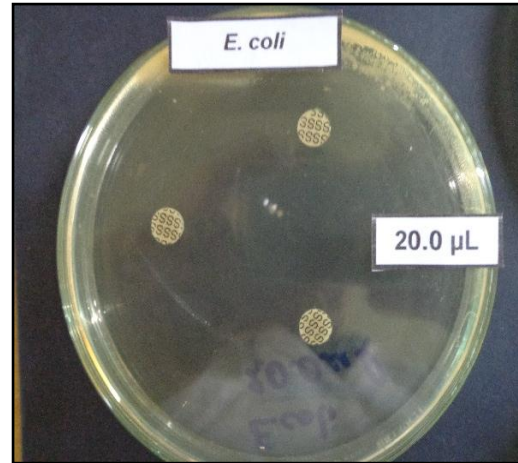
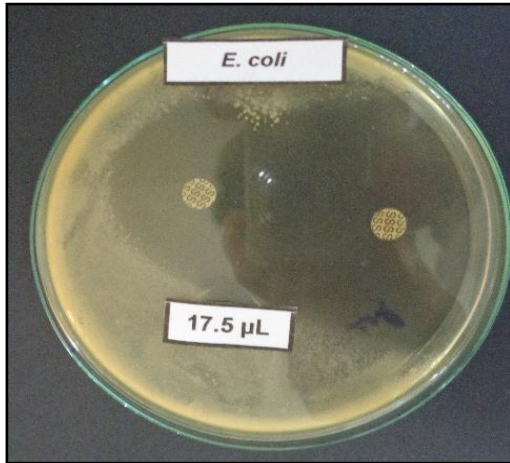
FOTOGRAFÍAS

Fotografía 01: Extracción del aceite esencial de hojas secas de *Rosmarinus officinalis* mediante el método de arrastre con vapor de agua.

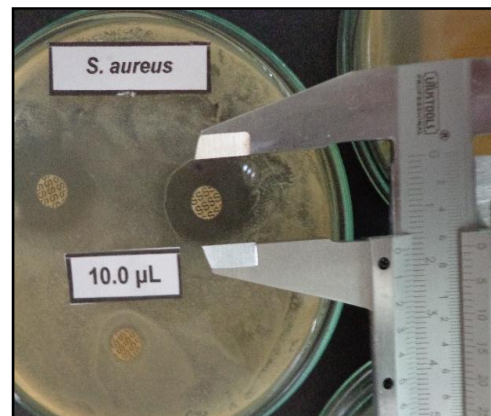
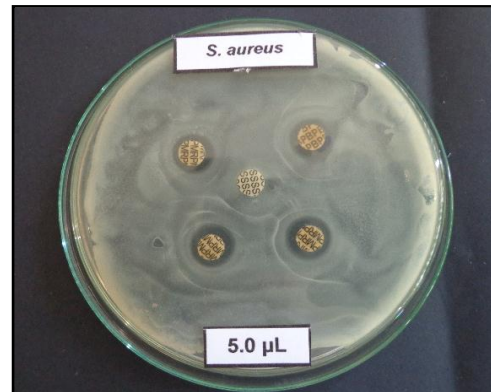
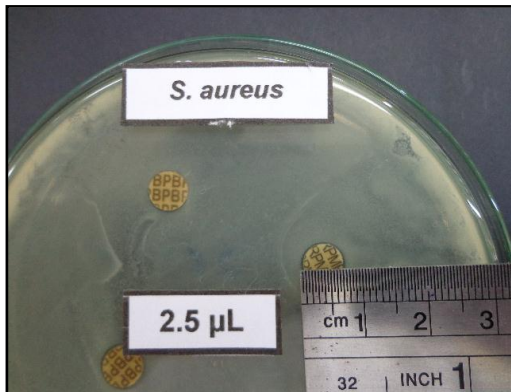


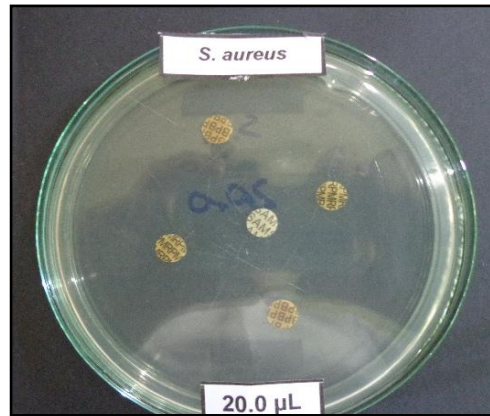
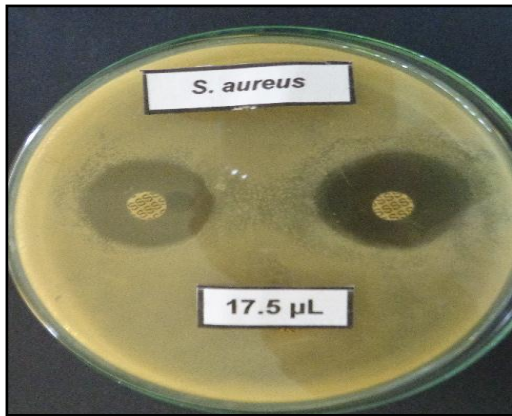
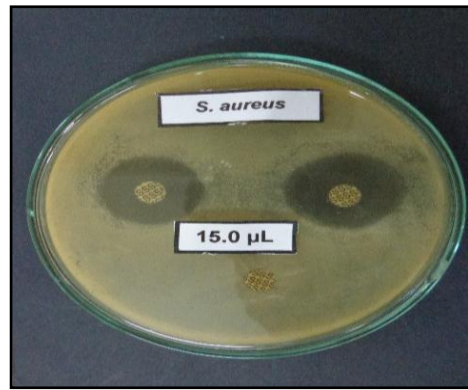
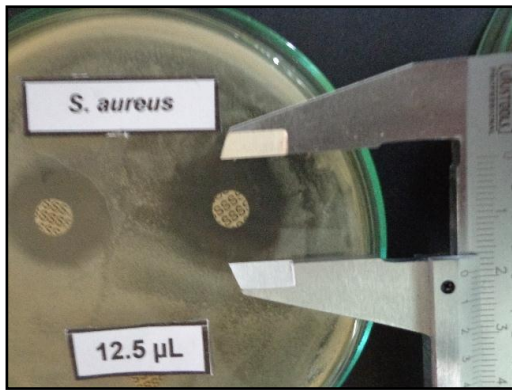
Fotografía 02: Susceptibilidad de *Escherichia coli* ATCC 11225 frente al aceite de *Rosmarinus officinalis* “romero” por el método de difusión en disco (kirby Bauer).



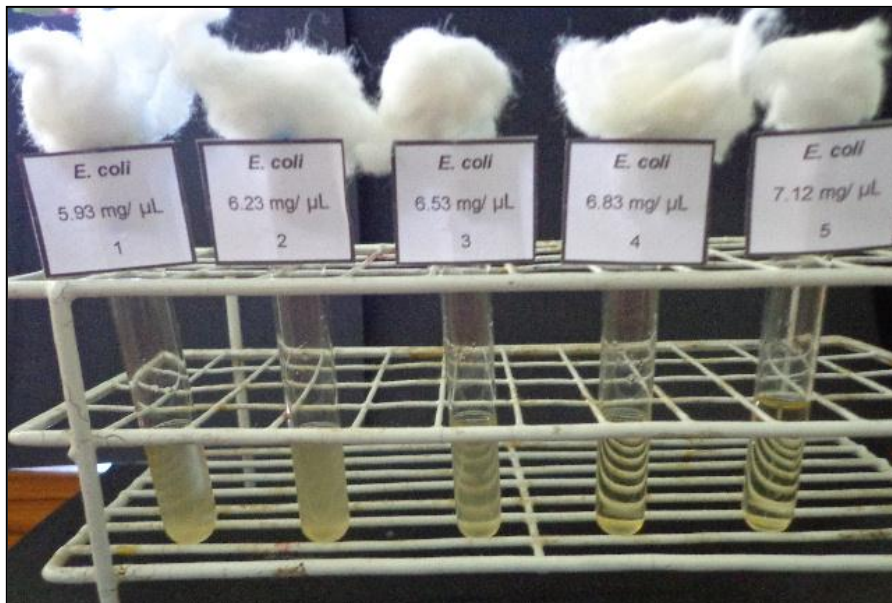


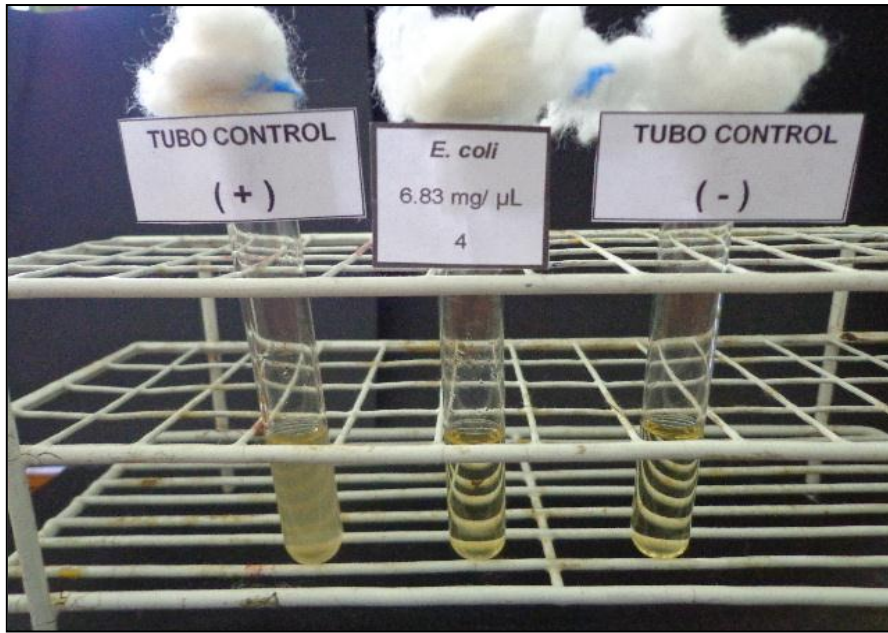
Fotografía 02: Susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 frente al aceite de *Rosmarinus officinalis* “romero” por el método de difusión en disco (Kirby-Bauer).





Fotografía 03: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para *Escherichia coli* ATTC 11225.



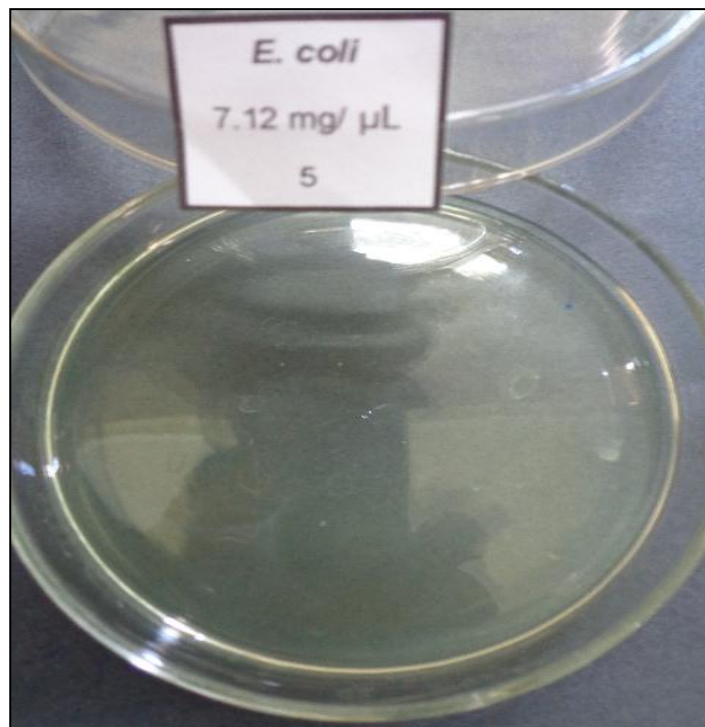


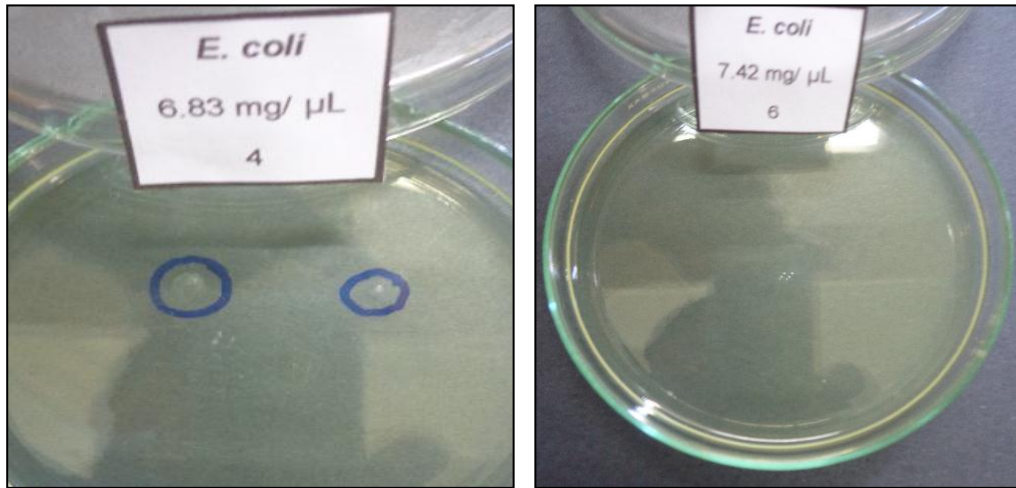
Fotografía 03: Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



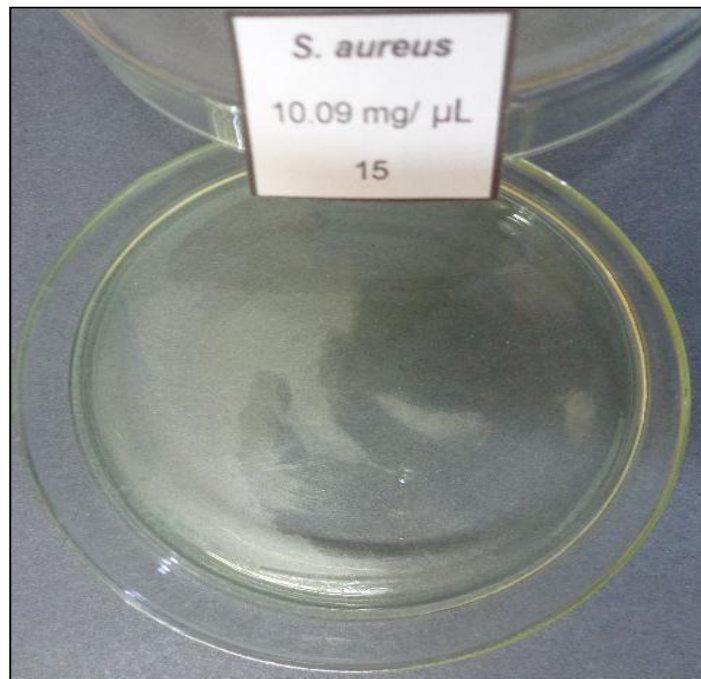


Fotografía 04: Concentración Mínima Bactericida (CMB) para *Escherichia coli* ATTC 11225.





Fotografía 05: Concentración Mínima Bactericida (CMB) para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



ANEXOS

ANEXO N° 01



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ +51 54 251210 ANEXO 1166
✉ laboratorioensayoucsm@gmail.com 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apto. 1350
AREQUIPA - PERU



INFORME DE ENSAYO

N° DE INFORME: ANA21C13.000704

Nombre del Cliente : ROBERTO RONDON PEREZ
Dirección del Cliente : BUENA VISTA MZ C-2 TACNA
Condición del Muestreado : POR EL CLIENTE
Descripción : ACEITE ESENCIAL DE ROMERO
Rosmarinus officinalis
Envase : Tubo de ensayo con tapa
Peso de Muestra : 5 mL
Fecha de Recepción : 21/02/2013
Fecha de Emisión de informe : 08/03/2013
Paginas : Pagina 1 de 2

ANALISIS FISICO QUIMICO:

Determinación Cuantitativa de metabolitos secundarios (%)

Método: Cromatografía Gaseosa con detección de masas, método de cuantificación, por normalización interna (área %)

Pico	Nombre	%
1	.alpha.-Pinene	22,69
2	Camphene	7,79
3	Bicyclo[3.1.1]heptane, 6,6-dimethyl-2-methyl	3,43
4	.beta.-Myrcene	11,24
5	Benzene, 1-methyl-3-(1-methylethyl)-	1,15
6	D-Limonene	2,81
7	Eucalyptol	20,21
8	(+)-4-Carene	0,85
9	1,6-Octadien-3-ol, 3,7-dimethyl-	3,09
10	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-one, 1,7,7-trimethyl-, (13,36
11	Bicyclo[2.2.1]heptan-2-ol, 1,7,7-trimethyl-, (1	2,88
12	3-Cyclohexene-1-methanol, .alpha.,.alpha.,4-tr	1,24
13	Bicyclo[3.1.1]hept-3-en-2-one, 4,6,6-trimethy	2,36
14	Bornyl acetate	2,10
15	Caryophyllene	2,16
16	1,4,7,-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-	1,18
17	1,2-Benzenedicarboxylic acid, diisooctyl ester	1,46

Q.F. Ricardo A. Abril Ran...
CQFDA 00624
JEFE DE LABORATORIO



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

ANEXO N 02



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS
LABORATORIO DE ENSAYO Y CONTROL DE CALIDAD

Urb. San José S/N Umacollo CAMPUS UNIVERSITARIO H-204/205 ☎ +51 54 251210 ANEXO 1166
✉ laboratorioensayoucsm@gmail.com 🌐 http://www.ucsm.edu.pe 📄 Apto. 1350
AREQUIPA - PERU

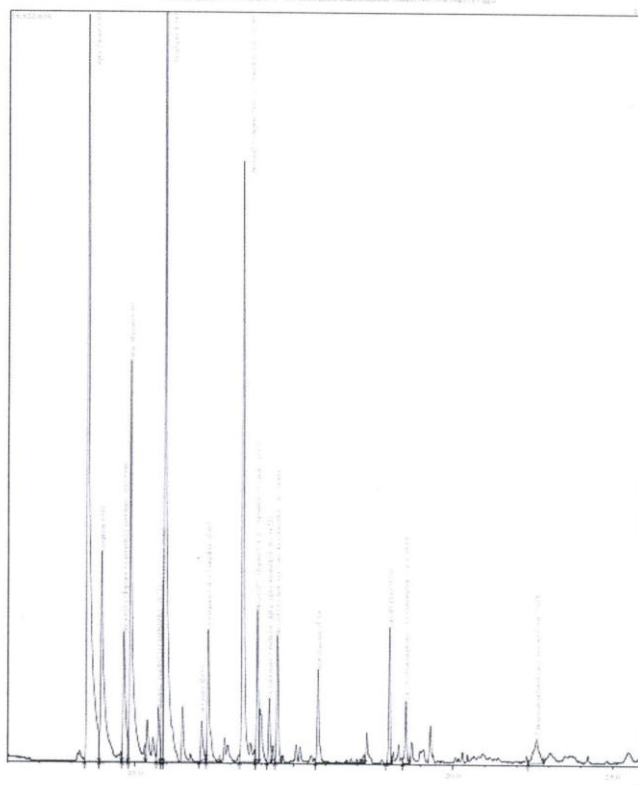


INFORME DE ENSAYO

Nº DE INFORME: ANA 21C13.000704

Nombre del Cliente	: ROBERTO RONDON PEREZ
Dirección del Cliente	: BUENA VISTA MZ C-2 TACNA
Condición del Muestreado	: POR EL CLIENTE
Descripción	: ACEITE ESENCIAL DE ROMERO <i>Rosmarinus officinalis</i>
Envase	: Tubo de ensayo con tapa
Peso de Muestra	: 5 mL
Fecha de Recepción	: 21/02/2013
Fecha de Emisión de informe	: 08/03/2013
Páginas	: Pagina 2 de 2

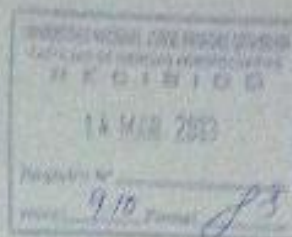
CROMATOGRAMA



Los resultados emitidos en el presente informe se relacionan únicamente a las muestras ensayadas. Este documento no debe ser reproducido, sin autorización escrita del Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad

ANEXO N° 03

Tacna, 14 de marzo del 2012



Señor:

DR. QUITERIO VALENCIA MECOLA

Decano de la Facultad de Ciencias Agropecuarias

Presente.-

De mi consideración:

Tengo el agrado de dirigirme a Ud., para manifestarle con relación a la solicitud del Sr. Roberto Germán Rondón Pérez, sobre la identificación de una especie botánica, informo que se ha procedido a identificar la muestra entregada y debo señalar que se trata de *Rosmarinus officinalis* L. "Romero".

Sin más que informar al respecto, le saludo cordialmente.

Atentamente;

Dra. Rosario Zegarra Zegarra

Profesora Principal FCAG

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS		UNAJB
PROV N°:	458	FECHA:
A :	Mekasade	
PARA :	Por tiempo a quien agradecer a la Dra. Rosario ZEGARRA Z	
7		
		27 SECRETARÍA

Bach. Roberto G. Rondón Pérez.

Tesista

Msc. César J. Cáceda Quiroz.

Asesor de Tesis