



**UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE**  
**MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**



**Efecto inhibitorio *in vitro* de los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” y *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” frente a cepas de *Escherichia coli* BLEE, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus***

**TESIS**

**Para Optar el Título Profesional de Licenciado (a) en Biología**  
**Microbiología - Parasitología**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. María Chapoñan Vidaurre**

**Bach. Jorge Antonio Limo Arrasco**

**ASESOR:**

**MSc. Mario Cecilio Moreno Mantilla**

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2022**

Efecto inhibitorio *in vitro* de los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” y *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” frente a cepas de *Escherichia coli* BLEE, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

## TESIS

Para Optar el Título Profesional de Licenciado (a) en Biología

Microbiología – Parasitología

### **APROBADA POR**

Dra. Carmen Carreño Farfán

---

### **PRESIDENTA**

MSc. Consuelo Rojas Idrogo

---

### **SECRETARIA**

Mblga. María Teresa Silva García

---

### **VOCAL**

MSc. Mario Cecilio Moreno Mantilla

---

### **ASESOR**

**LAMBAYEQUE, PERÚ**

**2022**

## **AGRADECIMIENTO**

Principalmente a Dios, quien es el sendero de nuestras vidas y nos ha forjado por el camino correcto, por ser nuestra fortaleza durante el proceso de nuestra carrera y guiarnos a cumplir una de nuestras metas más anheladas.

A nuestros padres, por su amor, trabajo y sacrificio, que nos han brindado durante todos estos años, impulsándonos a ser mejores cada día.

Al MSc. Mario Cecilio Moreno Mantilla, nuestro querido asesor; por su gran apoyo y darnos la oportunidad de recurrir a él, llenándonos de su experiencia y sabiduría en este presente trabajo.

A Cesar Ordinola, amigo y compañero, por apoyarnos en nuestra investigación.

## DEDICATORIAS

A Dios, quien es el lucero, fuerza, poder y seguridad de mi vida.

A mis padres José y Mercedes por su amor infinito, y ser el motor y motivo de cada logro; a mis hermanos Katherine, Cinthia y Richard, por estar siempre a mi lado impulsándome a seguir adelante.

A mis amigos Jhon Falla y Jorge Limo, por su apoyo constante; a Marjorie Tineo y Pierina Paoli, por su valiosa, sincera y gran amistad.

A mis maestros por su aporte en el conocimiento y ser parte de mi formación profesional.

*Maria Chapoñan Vidaurne*

A Dios, por darme la vida, las fuerzas y estar presente en cada momento.

A mis padres Jorge y Paula por su apoyo incondicional en este largo camino; el cual, se está culminado con mucho éxito, a mi familia por apoyarme y ser un gran soporte.

A mis amigos, quienes son muy importantes para mí; a María Chapoñan, mi amiga y compañera de tesis, por su apoyo constante en este camino que emprendimos juntos y poder cumplir uno de nuestros anhelos más deseados.

*Jorge Antonio Limo Arrasco*

## ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN.....	12
II.	MARCO TEÓRICO .....	15
2.1.	Antecedentes de la Investigación.....	15
2.2.	Bases Teóricas .....	17
2.2.1	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	17
2.2.2	<i>Caesalpinia spinosa</i> .....	18
2.2.3	<i>Escherichia coli</i> BLEE .....	19
2.2.4	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	20
2.2.5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	20
III.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
3.1.	Población y muestra.....	21
3.2.	Materiales .....	21
3.2.1.	Material Botánico .....	21
3.2.2.	Material Microbiológico .....	21
3.3.	Métodos .....	25
3.3.1.	Variables de estudio.....	25
3.3.2.	Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis.....	25
3.3.3.	Identificación de las cepas de <i>Escherichia coli</i> BLEE, <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	25
3.3.4.	Obtención del extracto etanólico a partir de <i>Rosmarinus officinalis</i> “romero” y <i>Caesalpinia spinosa</i> “tara”. .....	30
3.3.5.	Solución madre de <i>Rosmarinus officinalis</i> “romero” y <i>Caesalpinia spinosa</i> “tara”.....	33
3.3.6.	Preparación de extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> “romero” y <i>Caesalpinia spinosa</i> “tara” a diferentes concentraciones.....	33
3.3.7.	Estandarización del inóculo bacteriano .....	34
3.3.8.	Preparación de discos de susceptibilidad.....	34
3.3.9.	Prueba de susceptibilidad bacteriana según el método modificado de difusión de Kirby Bauer .....	35
3.3.10.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	35
3.3.11.	Análisis estadístico de datos .....	37
IV.	RESULTADOS .....	38

4.1.	Efecto Inhibitorio del extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> frente al crecimiento de <i>Escherichia coli</i> BLEE, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .....	38
4.2.	Efecto Inhibitorio del extracto etanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> frente al crecimiento de <i>Escherichia coli</i> BLEE, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .....	38
4.3.	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).....	41
4.4.	Análisis de varianza de los promedios de los halos de inhibición de <i>Escherichia coli</i> BLEE por efecto de los extractos etanólicos de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	44
4.5.	Análisis de varianza de los promedios de los halos de inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por efecto de los extractos etanólicos de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	47
4.6.	Análisis de varianza de los promedios de los halos de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> por efecto de los extractos etanólicos de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	49
V.	DISCUSIÓN.....	53
VI.	CONCLUSIONES.....	56
VII.	RECOMENDACIONES .....	57
VIII.	REFERENCIAS .....	58
IX.	ANEXOS.....	65

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Concentraciones de los extractos etanólicos de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	34
<b>Tabla 2</b>	Promedios del halo de inhibición de <i>Escherichia coli</i> BLEE, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> enfrentadas al extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> . .....	40
<b>Tabla 3</b>	Promedios del halo de inhibición de <i>Escherichia coli</i> BLEE, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> enfrentadas al extracto etanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> .40	40
<b>Tabla 4</b>	Análisis de varianza (ANAVA) de los promedios de los halos de inhibición de <i>Escherichia coli</i> BLEE por efecto de los extractos etanólicos de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	45
<b>Tabla 5</b>	Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición de <i>Escherichia coli</i> BLEE por efecto de los extractos etanólicos <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	45
<b>Tabla 6</b>	Prueba de significancia de Tukey del promedio de halo de inhibición de <i>Escherichia coli</i> BLEE por las cinco concentraciones de los extractos etanolicos de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	46
<b>Tabla 7</b>	Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición de las cepas de <i>Escherichia coli</i> BLEE frente a los extractos etanolicos de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	46
<b>Tabla 8</b>	Análisis de varianza (ANAVA) de los promedios de los halos de inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por efecto de los extractos etanólicos de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	48
<b>Tabla 9</b>	Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por efecto de los extractos etanólicos <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	48
<b>Tabla 10</b>	Prueba de significancia de Tukey del promedio de halo de inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por las cinco concentraciones de los extractos etanolicos de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	49
<b>Tabla 11</b>	Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición de las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> frente a los extractos etanolicos de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	49
<b>Tabla 12</b>	Análisis de varianza (ANAVA) de los promedios de los halos de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> por efecto de los extractos etanólicos de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	51
<b>Tabla 13</b>	Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> por efecto de los extractos etanólicos <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	51
<b>Tabla 14</b>	Prueba de significancia de Tukey del promedio de halo de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> por las cinco concentraciones de los extractos etanolicos de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	52

<b>Tabla 15</b> Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> frente a los extractos etanolicos de <i>Rosmarinus officinalis</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	52
---	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Hojas de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	22
<b>Figura 2</b>	Frutos maduros de <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	22
<b>Figura 3</b>	Cepas de <i>Escherichia coli</i> BLEE.....	23
<b>Figura 4</b>	Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	23
<b>Figura 5</b>	Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	24
<b>Figura 6</b>	Cultivo de <i>Escherichia coli</i> en Agar MacConkey.....	26
<b>Figura 7</b>	Identificación de <i>Escherichia coli</i> . A. Indol: positivo. B. Rojo de Metilo: positivo. C. Voges Proskauer: negativo. D. Citrato de Simmons: negativo. E. Agar Hierro Triple Azúcar: A/A +, -. F. Agar Lisina Hierro: K/K.....	26
<b>Figura 8</b>	Antibiograma de <i>Escherichia coli</i> BLEE.....	27
<b>Figura 9</b>	Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> en Agar Sangre.....	27
<b>Figura 10</b>	Cultivo de <i>Staphylococcus aureus</i> en Agar Manitol Salado.....	28
<b>Figura 11</b>	Prueba de Coagulasa para <i>Staphylococcus aureus</i> .....	28
<b>Figura 12</b>	Cultivo de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> en Agar Cetrimide.....	29
<b>Figura 13</b>	Identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . A. Agar Citrato de Simmons: positivo. B. Agar Hierro Triple Azúcar: K/K. C. Caldo Tripticasa Soya. D. Prueba de Oxidasa: positiva.....	29
<b>Figura 14</b>	Material Botánico triturado: A. <i>Rosmarinus officinalis</i> . B. <i>Caesalpinia spinosa</i> ..	30
<b>Figura 15</b>	Maceración: A. <i>Rosmarinus officinalis</i> . B. <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	31
<b>Figura 16</b>	Proceso de filtración del extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	31
<b>Figura 17</b>	Recuperación del Extracto Crudo de <i>Rosmarinus officinalis</i> .....	32
<b>Figura 18</b>	Recuperación del Extracto Crudo de <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	32
<b>Figura 19</b>	Obtención de las concentraciones a partir de la Obtención de las concentraciones a partir de la solución madre de: A. <i>Rosmarinus officinalis</i> . B. <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	33
<b>Figura 20</b>	Siembra en la superficie de la placa de Agar Muller Hinton con el inóculo de cada cepa incubado durante 24 horas.....	36
<b>Figura 21</b>	Efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> frente a A1. <i>Escherichia coli</i> BLEE, B1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , C1. <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i> frente a A2. <i>Escherichia coli</i> BLEE B2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , C2. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	39
<b>Figura 22</b>	Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de <i>Rosmarinus officinalis</i> frente a la especie <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa 1.....	42
<b>Figura 23</b>	Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de <i>Caesalpinia spinosa</i> frente a la especie <i>Escherichia coli</i> BLEE Cepa 1.....	42
<b>Figura 24</b>	Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de <i>Caesalpinia spinosa</i> frente a la especie <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Cepa 1.....	43
<b>Figura 25</b>	Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de <i>Caesalpinia spinosa</i> frente a la especie <i>Staphylococcus aureus</i> Cepa 1.....	43

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación de tipo experimental se realizó con el objetivo de determinar el efecto inhibitorio *in vitro* de los extractos etanólicos de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze y *Rosmarinus officinalis* L. a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/mL frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* BLEE y *Pseudomonas aeruginosa*. La prueba de susceptibilidad se realizó por el método de difusión en agar KirbyBauer. Los resultados obtenidos en esta investigación indicaron que el extracto etanólico del fruto de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze tuvo un mayor efecto inhibitorio *in vitro* frente a las cepas de *S. aureus* con un promedio de halo de inhibición de 31.8 mm, *E. coli* BLEE con 16.7 mm y *Ps. aeruginosa* con 9.77 mm. Con respecto al extracto de hojas de *Rosmarinus officinalis* L, presentó una menor acción inhibitoria *in vitro* frente a las cepas de *S. aureus* con un promedio de halo de inhibición de 22.73 mm, a diferencia de las cepas de *E. coli* BLEE y *Ps. aeruginosa* la acción inhibitoria es nula. Para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), se adecuó la técnica siguiendo las recomendaciones del método de macrodilución en tubo según la Norma Técnica Peruana N°30 del INS. La CMI del extracto etanólico *Rosmarinus officinalis* L. para *S. aureus* fue de 20 mg/mL y la CMI del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze para *S. aureus*, *E. coli* BLEE y *Ps. aeruginosa* fue de 50 mg/mL, 30 mg/mL y 10 mg/mL respectivamente. Se concluyó que el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze tuvo efecto inhibitorio en todas las cepas de *E. coli* BLEE, *Ps. aeruginosa* y *S. aureus*. Mientras que el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. solo tuvo efecto inhibitorio *in vitro* sobre las cepas de *S. aureus*.

**Palabras Clave:** Efecto inhibitorio, Extractos etanólicos, *Rosmarinus officinalis* L, *Caesalpinia spinosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* BLEE, *Pseudomonas aeruginosa*, Concentración Mínima inhibitoria.

## ABSTRACT

The present experimental research work was carried out with the objective of determining the *in vitro* inhibitory effect of the ethanolic extracts of *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze and *Rosmarinus officinalis* L. in 100, 200, 300, 400 and 500 mg / mL concentrations against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ESBL and *Pseudomonas aeruginosa* strains. The susceptibility test was carried out by the Kirby-Bauer agar diffusion method. The results obtained in this investigation indicated that the ethanolic extract of *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze fruit had a greater inhibitory effect *in vitro* against *S. aureus* strains with an average inhibition halo of 31.8 mm, *E. coli* ESBL 16.7 mm and *Ps. aeruginosa* 9.77 mm. Regarding the extract of *Rosmarinus officinalis* L. leaves, it presents a lower inhibitory action *in vitro* against *S. aureus* strains with an average inhibition halo of 22.73 mm, unlike of *E. coli* ESBL and *Ps. aeruginosa* strains the inhibitory action is null. For the determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), the technique was adapted following the recommendations of the macrodilution tube method according to the Peruvian Technical Standard N°30 of the INS. The MIC of the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. for *S. aureus* was 20 mg/mL and the MIC of the ethanolic extract of *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze for *S. aureus*, *E. coli* ESBL and *Ps. aeruginosa* was 50 mg/mL, 30 mg/mL and 10 mg/mL respectively. It was concluded that the ethanolic extract of *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze had an inhibitory effect on all *E. coli* ESBL, *Ps. aeruginosa* and *S. aureus* species. Whereas the ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. only had an inhibitory effect *in vitro* on *S. aureus* strains.

**Key words:** Inhibitory Effect, Ethanolic Extract, *Rosmarinus officinalis* L, *Caesalpinia spinosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ESBL, *Pseudomonas aeruginosa*, Minimum Inhibitory Concentration.

## I. INTRODUCCIÓN

Los antibióticos son un elemento clave para combatir las enfermedades infecciosas, y desde su aparición han permitido disminuir la morbilidad y mortalidad en el planeta, asociada a diversas patologías de forma muy significativa (Alvo et al., 2016); no obstante, la resistencia a los antibióticos está aumentando en todo el mundo a niveles peligrosos.

En los últimos años, el uso generalizado de antibióticos indudablemente ha acelerado la evolución de los microorganismos, y ha llevado a la aparición de cepas que han adquirido sistemáticamente múltiples genes de resistencia que ponen en peligro nuestra capacidad para tratar las enfermedades infecciosas comunes (Kannan et al., 2011), ejemplo de ello es *Escherichia coli* BLEE, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

*Escherichia coli*, es el principal agente etiológico de las infecciones del tracto urinario, con incidencia de hasta 80%, que ha aumentado su resistencia a través de diversos mecanismos, siendo uno de los más conocidos, la producción de betalactamasa de espectro extendido (BLEE) (Calle et al., 2017; Rendón et al., 2012); se sospecha de diferentes factores que pueden participar en la adquisición de *E. coli* BLEE a través de la comida, de transmisión de portadores fecales de persona a persona, de diseminación del microorganismo en el ambiente, a través de animales domésticos y animales salvajes, así como la existencia de reservorios en los asilos (Aguilar, 2015).

*Staphylococcus aureus*, es un agente frecuente de infección, tanto en el ámbito comunitario como en el hospitalario; produce una amplia gama de enfermedades, desde infecciones cutáneas superficiales a infecciones de partes blandas y óseo-articulares (Galiana, 2003). En los últimos años se ha encontrado que la proporción de aislamientos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) en el Perú se ha incrementado, pues se han detectado en varios hospitales y clínicas cerca de un 50% de estas cepas MRSA (Maguiña et al., 2006).

*Pseudomonas aeruginosa*, es uno de los patógenos aislados con mayor frecuencia en pacientes internados, su mortalidad oscila entre 35%-70%, según la localización de las infecciones, pronóstico de la enfermedad de base, gravedad clínica inicial y también el tratamiento antibiótico (Hernández et al., 2018), puede causar infecciones graves, afectando a múltiples localizaciones, especialmente frecuente en pacientes con neumonías, bacteriemias, infecciones del tracto urinario, quemaduras, leucemia aguda, transplantes de órganos, fibrosis quística (Álvarez et al., 2017).

Para superar esta situación, hoy en día se busca alternativas que pueden ayudarnos ante estos problemas que aquejan a la población como es la utilización de plantas medicinales y sus derivados con finalidad terapéutica, ya que las sustancias químicas que las componen tienen una actividad biológica en humanos (Tres, 2006). Se estima que el 80% de la población mundial utiliza remedios herbolarios tradicionales y que al menos 35 000 especies vegetales presentan potencial para uso medicinal contra diversas enfermedades (García de Alba et al., 2012).

En el Perú existe una gran variedad de plantas medicinales donde podemos destacar el uso de *Rosmarinus officinalis* “romero” caracterizándose por su potencial de acción medicinal debido a que posee un elevado contenido en sustancias o principios activos, con propiedades químicas, bioquímicas u organolépticas muy específicas, que permiten su utilización con fines terapéuticos, aromáticos y gastronómicos (Ávila et al., 2011). Tiene propiedades hepatoprotectoras, antiinflamatorio, antiulcerogénico, antioxidante, ejerce también un efecto diurético (López, 2008).

Así mismo en esta investigación tenemos a *Caesalpinia spinosa* “tara” utilizada muy frecuentemente de manera empírica, por sus propiedades curativas, en infecciones bronquiales, como antiinflamatorio, en caso de sinusitis; infecciones vaginales y micóticas, heridas crónicas y piezas dentales con caries dental (Huarino y Ramos, 2013). El estudio de estas plantas en la

presente investigación nos ayudará a superar diversos problemas de salud y 3 detener la propagación de las infecciones.

En este contexto, se planteó el siguiente problema: ¿Tiene efecto inhibitorio *in vitro* los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” y *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” frente a cepas de *Escherichia coli* BLEE, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*? La hipótesis planteada fue: Los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” y *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” tienen efecto inhibitorio frente a cepas de *Escherichia coli* BLEE, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

El objetivo general de la investigación fue: Determinar el efecto inhibitorio *in vitro* de los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” y *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” frente a cepas de *Escherichia coli* BLEE, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. El objetivo específico fue: Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” y *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” frente a cepas de *Escherichia coli* BLEE, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes de la Investigación

Prieto et al. (2018) realizaron el ensayo *in vivo* del extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* como un controlador de *Flavobacterium columnare* en individuos de *Oreochromis niloticus* (tilapia). Para lo cual, se obtuvo el extracto de frutos secos de *C. spinosa* y se mezcló con el agua de cultivo para peces a la concentración final de 0.14 mg/ml en acuarios de 280 L. En la primera etapa, los peces de tilapia infectados artificialmente con *F. columnare* manifestaron los síntomas de la enfermedad. En la segunda etapa, los peces enfermos fueron tratados con el extracto de *C. spinosa* disuelto en el agua de cultivo y se mantuvieron hasta su recuperación, demostrando así su efectividad.

Castro et al. (2016), Terán et al. (2015) evaluaron el efecto *in vitro* del aceite esencial de *Caesalpinia spinosa* (tara) obtenidas de legumbres secas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, SARM ATCC 43300 y el cultivo SARM HRDT347; determinándose las CMI y CMB; así mismo se determinó la actividad antibacteriana frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Los resultados obtenidos fueron: las CMI para *S. aureus* ATCC 43300 y HRDT347 es similar, del 0.156%, mientras que para *S. aureus* ATCC 25923 es del 0.039%; las CMB para *S. aureus* ATCC 4330 y HRDT347 es, del 0.312%, mientras que para *S. aureus* ATCC 25923 es del 0.156%. La determinación de la actividad antibacteriana en concentraciones de 100, 50 y 25%, formó halos de inhibición de 21, 18 y 16 mm, respectivamente, frente a *S. mutans*.

Guevara (2013) demostró el efecto del aceite de *Rosmarinus officinalis* “romero” sobre el crecimiento *in vitro* de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis*, se usó concentraciones de 10%, 50% y 100% obteniéndose como 6 resultados que el mayor halo de inhibición de crecimiento de *Escherichia coli* es de 12 mm, para *Staphylococcus aureus* es de 13mm y para *Salmonella enteritidis* es de 15mm a la concentración de 100% y el menor

halo de inhibición de crecimiento de *Escherichia coli* es de 7 mm, para *Staphylococcus aureus* es de 8 mm y para *Salmonella enteritidis* es de 10 mm a la concentración de 10%.

Huarino y Ramos (2013) determinaron el efecto antibacteriano *in vitro* de diferentes concentraciones del extracto alcohólico de la *Caesalpinia spinosa* “tara” mediante el método de difusión en placa, se usó la flora mixta salival, para enfrentarlas a soluciones de 6,25; 12,5; 25; 50 y 75 mg/mL de extracto alcohólico. Los resultados mostraron que el extracto alcohólico de la *Caesalpinia spinosa* tiene actividad antibacteriana *in vitro* sobre dichos cultivos, siendo la media de los diámetros de los halos de inhibición 12,32; 13,8; 14,92; 15,48 y 17,32 mm para 6,25; 12,5; 25; 50 y 75 mg/mL respectivamente.

Castaño et al. (2010) evaluaron la actividad bactericida y determinaron la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre microorganismos de interés alimentario: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella sonnei*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* y *Lactobacillus plantarum*. El aceite esencial exhibió un amplio espectro de acción antimicrobiana tanto para bacterias Gram positivas como Gram negativas con CIM entre 512 – 4096 ppm. El extracto etanólico mostró actividad antimicrobiana contra las bacterias *S. sonnei*, *S. typhimurium* y *L. monocytogenes* con CIM de 1024 ppm.

Barni et al. (2009) evaluaron la eficiencia antibacteriana del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. en dos modelos de infección en piel de ratón: superficial y subcutáneo contra la bacteria patógena *Staphylococcus aureus*. Los resultados obtenidos mostraron que el extracto de romero que contiene 2,3% de polifenoles bioactivos presentó una acción bacteriostática contra *S. aureus* sobre la piel del ratón, mientras que ensayando una doble concentración de polifenoles bioactivos (4,6%) se observó una inhibición total del crecimiento bacteriano. Los resultados indican que los polifenoles bioactivos del romero, dependiendo de

su concentración, pueden ejercer in vivo acciones bacteriostáticas y bactericidas contra *S. aureus*.

Mengoni et al. (2007) evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos obtenidos a partir de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (romero). Los microorganismos utilizados consistieron en seis aislamientos clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Todos los aislados presentaron resistencia a gentamicina y uno de los aislados presentó resistencia a todos los antibióticos empleados. La actividad de dos extractos de romero, uno etanólico y otro acuoso fueron evaluados in vitro por el método de 5 macrodilución en agar. El extracto etanólico presentó actividad antibacteriana para todos los microorganismos evaluados, para este caso la CMI no superó los 800 µg/ml y en el caso del extracto acuoso la CMI fue superior a 10000 µg/ml con lo que se considera que este último no posee actividad microbicida para estas cepas.

## **2.2. Bases Teóricas**

### **2.2.1 *Rosmarinus officinalis* L.**

La especie *Rosmarinus officinalis* L. fue identificada por Linneo en 1753 (Lax, 2014) perteneciente a la familia Lamiaceae, y conocida popularmente como “romero” es una especie originaria de la región mediterránea, donde también se cultiva. De hecho, sus principales países productores son España, Marruecos y Túnez (Castaño et al., 2010; López, 2008). Adaptada en nuestro país como hierba aromática, se cultiva en la Costa y en la Sierra (entre 0 y 3500 metros de altitud) (Ponce et al., 2015).

Es una planta arbustiva propio de zonas secas y áridas, que puede medir de 50 a 150 cm de altura y es perenne, frondoso y muy ramificado con tallos prismáticos, las hojas son estrechas, agudas y pequeñas de 4-6 mm, tienen forma de espigas de color verde brillante, florece dos veces al año en primavera y otoño, las flores se caracterizan por un color azul claro con pequeñas manchas violetas (Ávila et al., 2011).

En la planta se han reportado diversos compuestos químicos los cuales han sido agrupados de manera general por diversos autores en ácidos fenólicos, flavonoides, aceite esencial, ácidos triterpénicos y alcoholes triterpénicos. Las hojas de romero contienen un 1,0-2,5% de aceite esencial y en su composición química se ha identificado la presencia de  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, 8 canfeno, ésteres terpénicos como el 1,8-cineol, alcanfor, linalol, verbinol, terpineol, carnosol, rosmanol, isorosmanol, 3-octanona, isobanil-acetato y  $\beta$ -cariofileno; los ácidos vanílico, caféico, clorogénico, rosmarínico, carnósico, ursólico, oleanólico, butilínico, betulínico, betulina,  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, borneol, y acetato de bornilo (Avila et al., 2011; López, 2008).

La infusión de hojas de *Rosmarinus officinalis* “romero” es utilizada en la medicina tradicional peruana para aliviar la tos, es buena para el hígado y para evitar los espasmos intestinales (Calleja y Ávila, 2016). Estudios etnobotánicos le atribuyen propiedades tónicas, estimulante, antifebril, colagoga, antiespasmódicas, antimicrobianas y diuréticas. Por su parte estudios farmacológicos reconocen que posee efecto relajante sobre los músculos lisos de la tráquea, el intestino y las vías urinarias; efecto hepatoprotector; útil en el asma bronquial, desórdenes espasmo-génicos, úlcera péptica, enfermedades inflamatorias, aterosclerosis, enfermedades isquémicas del corazón, catarata y favorece la motilidad espermática (Martínez et al., 2004).

### **2.2.2 *Caesalpinia spinosa***

*Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, conocida como “tara”, *Caesalpinia* se denomina en honor a Andrea Caesalpinia (1524 - 1603), botánico y filósofo italiano; *spinosa*, del latín “spinosus”, con espinas (Chávez, 2014). Es una leguminosa nativa del Perú, su producción se distribuye por toda la costa peruana desde Piura hasta Tacna, así como en los valles interandinos secos entre 1000 y 3100 msnm de Ancash, Apurímac, Arequipa, Ayacucho, Cajamarca, Huancavelica, Huánuco y Junín (Terán et al., 2015).

La tara es un árbol siempre verde, de 3-5 m. de altura; pero puede llegar a medir hasta 12m. en su vejez; su tronco está provisto de una corteza gris espinosa, con ramillas densamente pobladas. Las hojas son alternas, de hoja perenne. Las inflorescencias son terminales de 15-20 cm de largo en racimos con muchas flores y cubierto de pelos diminutos. Las flores son de color amarillo a naranja con pétalos de 6-7 mm. El fruto es una legumbre sésil de 9 cm de color naranja rojizo, rico en taninos, contiene hasta 7 semillas ovoides, de color marrón oscuro cuando están maduros. Cada árbol de tara puede rendir un promedio de 20 kg a 40 kg de vaina cosechándolo dos veces al año (Terán et al., 2015).

En el Perú, numerosos estudios han reportado la presencia de taninos, flavonoides, gomas, alcaloides y proteínas que se pueden encontrar tanto en la vaina como en la semilla, los mismos que sirven como base para la elaboración de otros productos usados en la industria farmacéutica, alimentaria (Benites, 2015). Tienen acción farmacológica como antihemorrágico local, antidiarreico, antihepatóxica, Antisépticos, tienen una acción bactericida y bacteriostática. También ejercen un efecto antifúngico. Es utilizada, muy frecuentemente en la medicina tradicional para aliviar malestares de la garganta; sinusitis; infecciones vaginales y micóticas; lavado de los ojos inflamados; heridas crónicas y en el diente cariado; dolor de estómago; las diarreas; cólera; reumatismo y resfriado; depurativo del colesterol (Flores, 2011).

### **2.2.3 *Escherichia coli* BLEE**

La presencia de *E. coli* con BLEE se asoció inicialmente a brotes nosocomiales en grandes hospitales, principalmente en áreas de cuidados intensivos y quirúrgicas. Sin embargo, las últimas investigaciones publicados centran su atención en los aislamientos en infecciones adquiridas en la comunidad, brotes en unidades de cuidados crónicos y asilos, así como en muestras de orina y heces de portadores sanos (García et al., 2011).

El principal mecanismo de resistencia de las enterobacterias es la producción de  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido (BLEE), codificadas por los genes bla (TEM, SHV, CTX-M,

entre otros), frecuentemente asociadas a plásmidos, cromosómico o transposones producidas por *Escherichia coli* principalmente. Pertenecen al grupo 2be de la clasificación de Bush y Jacoby son resistentes a todos los antibióticos betalactámicos con la excepción de los carbapenémicos, las cefamicinas y las combinaciones de betalactámicos con inhibidores 2,3 de betalactamasas, como el tazobactam y el sulbactam (Galván et al., 2016; Escalante et al., 2013).

#### **2.2.4 *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* puede producir enfermedad por toxinas o superantígenos, invadir cualquier órgano o tejido y originar supuración, necrosis tisular, trombosis vascular y bacteriemia. Es el microorganismo con mayor capacidad de originar metástasis por vía hematogena. Puede crecer en el citoplasma celular, formar biopelículas y originar bacteriemia persistente o infección crónica o permanecer quiescente y reactivarse meses o años más tarde (Mensa et al., 2013).

Quizás una de las características más sobresalientes de *S. aureus* es su habilidad para producir una diversidad de toxinas cuyo blanco son las células de la sangre humana. Estas toxinas incluyen la hemolisina- $\beta$  (Hla), hemolisina- $\beta$  y hemolisina-y, la leucocidina de Panton Valentine, y la  $\beta$ - modulina soluble al fenol (PSM- $\alpha$ ) tipo péptidos (Cervantes et al., 2014).

#### **2.2.5 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa* es el primer causante de neumonía asociada a la ventilación mecánica en las unidades de cuidados intensivos (UCI) causando elevadas tasas de mortalidad. Su capacidad de adaptación, diseminación, resistencia intrínseca a los antimicrobianos y su capacidad para adquirir nuevos mecanismos de resistencia hacen difícil el tratamiento de las infecciones causadas por esta bacteria. La resistencia intrínseca a los antimicrobianos en *P. aeruginosa*, se debe principalmente a la presencia de una membrana externa poco permeable, a una enzima  $\beta$ -lactamasa tipo Amp C inducible y a un sistema de bombas de expulsión activa de antimicrobianos (Salvador et al., 2018).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Población y muestra

La población estuvo constituida por cepas de *Escherichia coli* BLEE, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. La muestra se conformó por 3 cepas de cada especie bacteriana, las mismas que se enfrentaron a 5 concentraciones: 500, 400, 300, 200, 100 mg/mL de 2 tipos de extractos etanólicos (*Rosmarinus officinalis* L. “romero” y *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara”). Factorial =  $3 \times 3 \times 5 \times 2 = 90$ . Muestra: 90 unidades. De cada experimento se realizó 5 repeticiones dando un total de 450 unidades experimentales.

#### 3.2. Materiales

##### 3.2.1. Material Botánico

Se utilizó como materia prima, hojas de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” (Figura 1) y frutos de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” (Figura 2) que fueron obtenidos en el Mercado Modelo de la ciudad de Chiclayo en el departamento de Lambayeque.

##### 3.2.2. Material Microbiológico

Estuvo conformada por cepas de *Escherichia coli* BLEE, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, que fueron aisladas e identificadas en el Laboratorio de Microbiología Humana de la especialidad de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo (Figuras 3, 4 y 5).

**Figura 1**

*Hojas de Rosmarinus officinalis.*

**Figura 2**

*Frutos maduros de Caesalpinia spinosa.*



**Figura 3**  
*Cepas de Escherichia coli BLEE.*



**Figura 4**  
*Cepas de Staphylococcus aureus.*



**Figura 5**  
*Cepas de Pseudomonas aeruginosa.*



### 3.3. Métodos

#### 3.3.1. Variables de estudio

- a. **Independiente:** Extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* “romero” y *Caesalpinia spinosa* “tara”.
- b. **Dependiente:** Crecimiento de *Escherichia coli* BLEE  
Crecimiento de *Staphylococcus aureus*  
Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*.

#### 3.3.2. Tipo de estudio y diseño de contrastación de hipótesis

El trabajo de investigación se clasificó según el fin que persigue como una investigación aplicada, según la técnica de contrastación como experimental. En la contrastación de hipótesis se consideró de estímulo creciente (Goode y Hatt, 1970).

#### 3.3.3. Identificación de las cepas de *Escherichia coli* BLEE, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

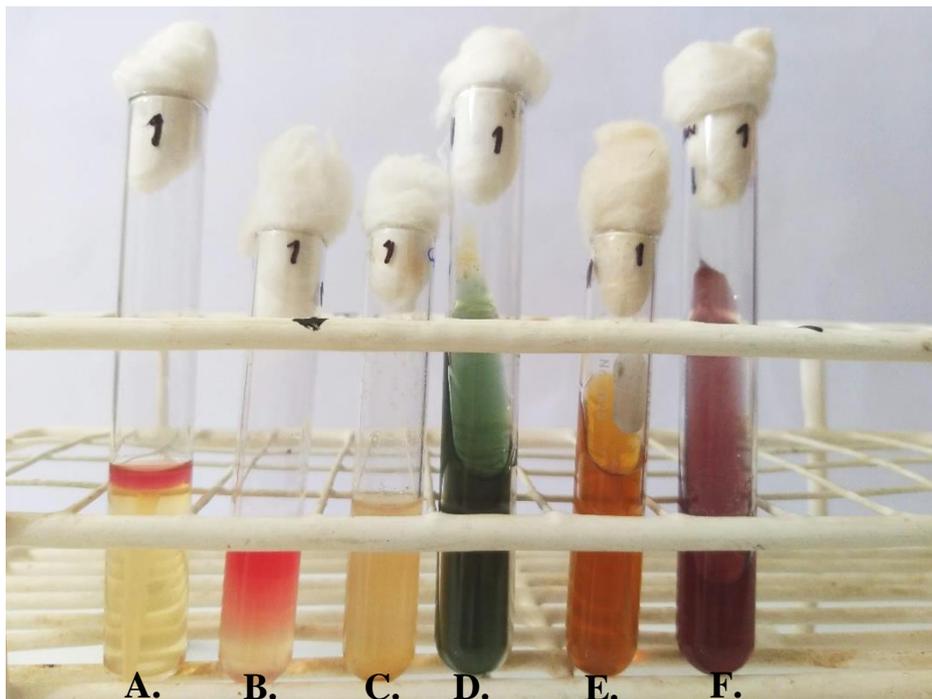
Las cepas de *Escherichia coli* BLEE, se sembraron en Agar MacConkey (Figura 6) para observar las características propias de la bacteria, para la identificación se empleó pruebas bioquímicas IMViC (Indol, Rojo de metilo, Vogues-Proskawer y Citrato), TSI (Agar Hierro Triple Azúcar) y LIA (Agar Lisina Hierro) (Figura 7), y se usó discos de sensibilidad para la determinación de BLEE (Figura 8). Las cepas de *Staphylococcus aureus*, se sembraron en placas con Agar sangre (Figura 9), para la identificación se realizó las pruebas de fermentación del manitol en aerobiosis (Figura 10) y prueba de coagulasa (Figura 11). Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, se sembraron en Agar Cetrimide (Figura 12) para observar las características fenotípicas de la bacteria, se empleó como pruebas de identificación al Citrato Simmons, TSI (Agar Hierro Triple Azúcar), Tiras de la oxidasa (Figura 13).

**Figura 6**

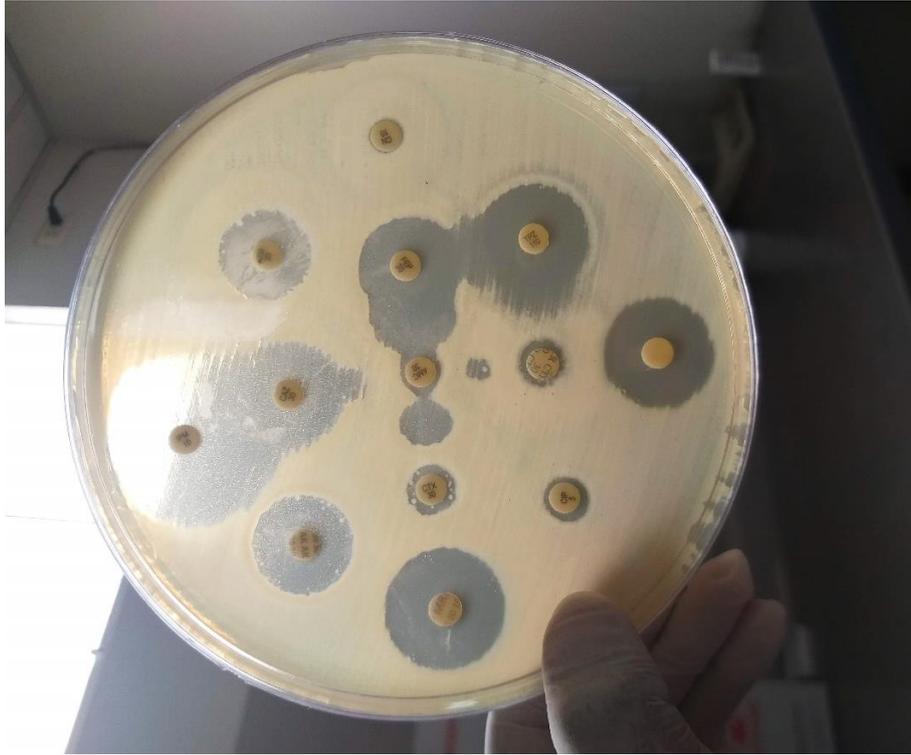
*Cultivo de Escherichia coli en Agar MacConkey*

**Figura 7**

*Identificación de Escherichia coli. A. Indol: positivo. B. Rojo de Metilo: positivo. C. Voges Proskauer: negativo. D. Citrato de Simmons: negativo. E. Agar Hierro Triple Azúcar: A/A +, -. F. Agar Lisina Hierro: K/K.*



**Figura 8**  
*Antibiograma de Escherichia coli BLEE.*



**Figura 9**  
*Cultivo de Staphylococcus aureus en Agar Sangre.*



**Figura 10**

*Cultivo de Staphylococcus aureus en Agar Manitol Salado.*

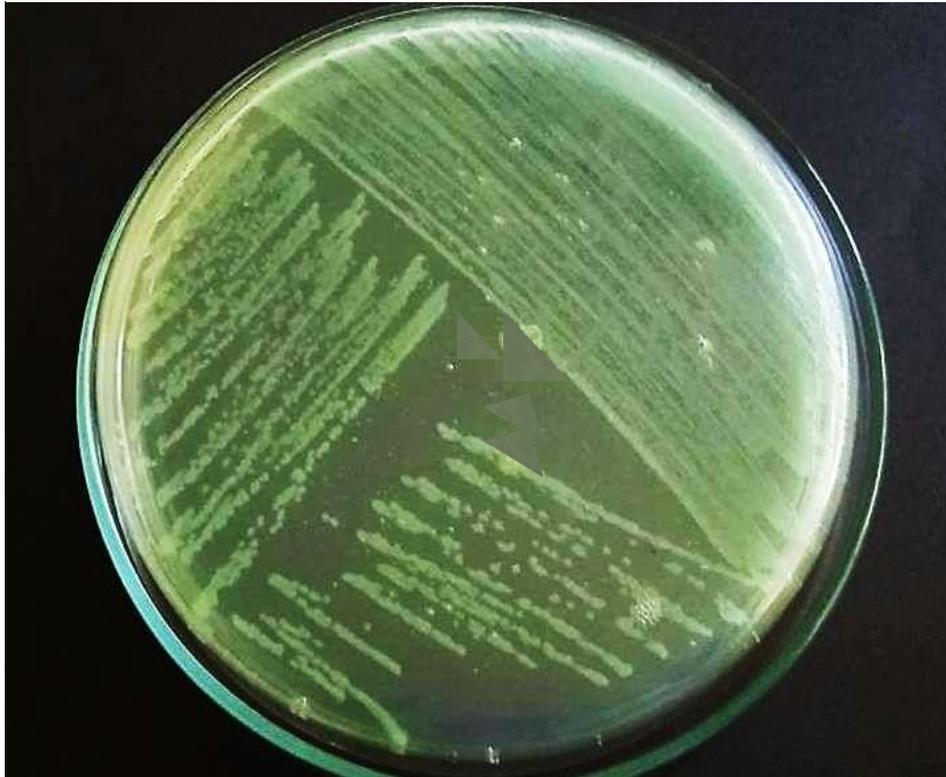
**Figura 11**

*Prueba de Coagulasa para Staphylococcus aureus.*

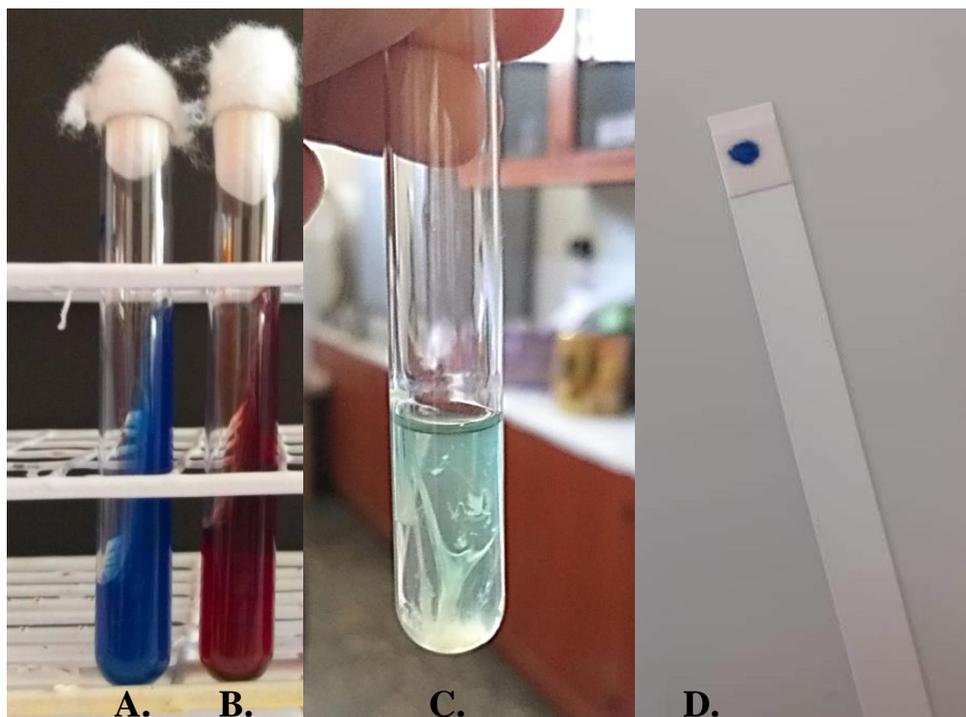


**Figura 12**

*Cultivo de Pseudomonas aeruginosa en Agar Cetrimide.*

**Figura 13**

*Identificación de Pseudomonas aeruginosa. A. Agar Citrato de Simmons: positivo. B. Agar Hierro Triple Azúcar: K/K. C. Caldo Trypticase Soya. D. Prueba de Oxidasa: positiva.*

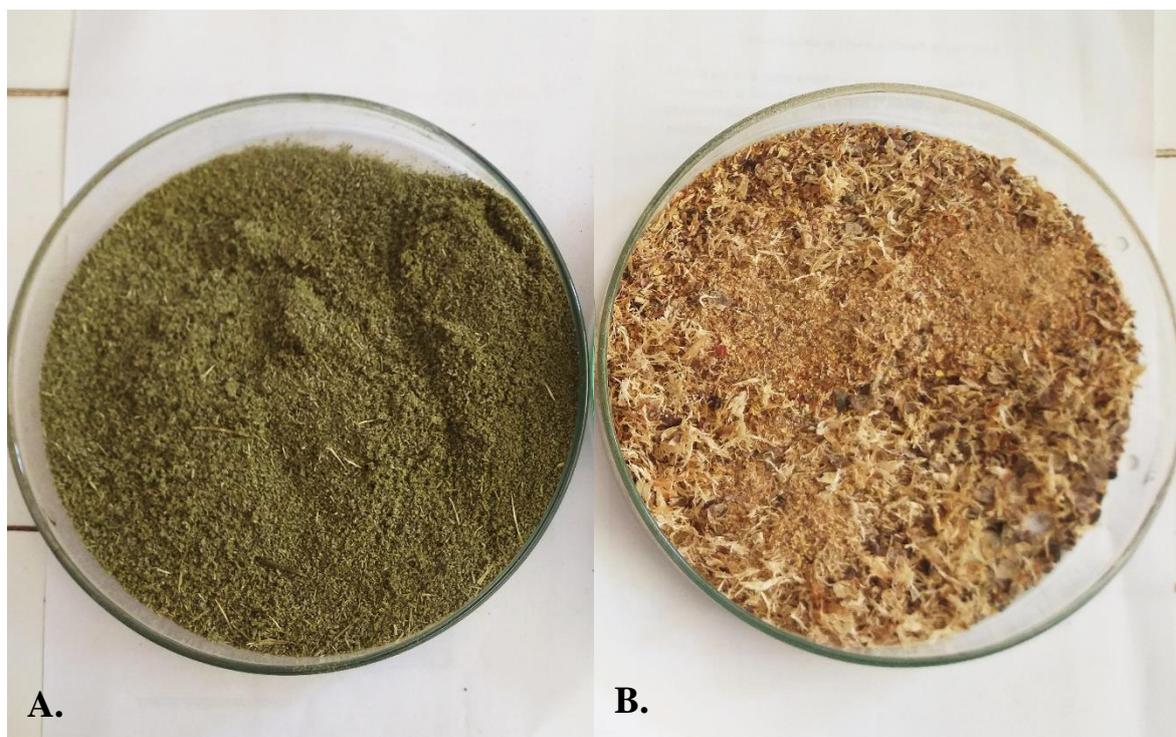


### 3.3.4. Obtención del extracto etanólico a partir de *Rosmarinus officinalis* “romero” y *Caesalpinia spinosa* “tara”.

Las hojas de *Rosmarinus officinalis* “romero” y frutos de *Caesalpinia spinosa* “tara” fueron lavados con abundante agua potable, luego se procedió a desinfectar las hojas y frutos con hipoclorito de sodio al 2%, durante 6 minutos removiéndose el desinfectante con tres enjuagues con agua destilada esterilizada, permaneciendo en agua durante un minuto por enjuague. Las hojas y frutos se llevaron a secado bajo sombra por un promedio de 5 días para su deshidratación. El material seco fue sometido a trituración (Figura 14), la muestra molida se colocó en un recipiente de vidrio al que se le agregó en cantidad doble de etanol al 96 %, en proporción 1:2 y se dejó macerar por 7 días en un lugar donde no tenga contacto con la luz solar (Figura 15). Transcurrido ese tiempo se filtró (Figura 16) y se colocó en crisoles para permitir su evaporación y la obtención del extracto crudo (Figuras 17 y 18).

#### Figura 14

Material Botánico triturado: A. *Rosmarinus officinalis*. B. *Caesalpinia spinosa*.



**Figura 15**

Maceración: A. *Rosmarinus officinalis*. B. *Caesalpinia spinosa*.

**Figura 16**

Proceso de filtración del extracto etánolico de *Rosmarinus officinalis*.

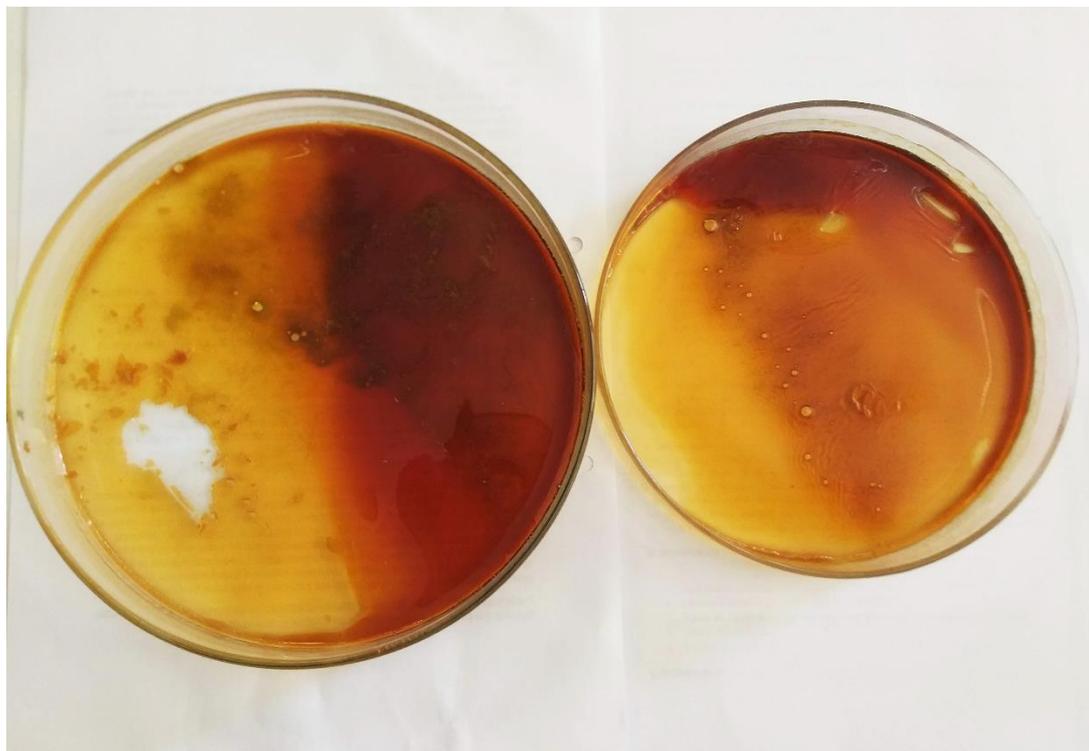


**Figura 17**

*Recuperación del Extracto Crudo de Rosmarinus officinalis.*

**Figura 18**

*Recuperación del Extracto Crudo de Caesalpinia spinosa.*



### 3.3.5. Solución madre de *Rosmarinus officinalis* “romero” y *Caesalpinia spinosa* “tara”

Se preparó a partir de 5 g de extracto etanólico y se enrasó a 10 mL de alcohol al 40° (en proporción 1:2) obteniéndose una concentración de 500 mg/mL.

### 3.3.6. Preparación de extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* “romero” y *Caesalpinia spinosa* “tara” a diferentes concentraciones

A partir de la solución madre se realizaron diluciones sucesivas hasta obtener concentraciones de 500mg/mL, 400 mg/mL, 300 mg/mL, 200 mg/mL, y 100 mg/mL (Figura 19), se tomó un volumen de la solución madre y se completó con agua destilada estéril (Tabla 1).

#### Figura 19

Obtención de las concentraciones a partir de la Obtención de las concentraciones a partir de la solución madre de: A. *Rosmarinus officinalis*. B. *Caesalpinia spinosa*.



**Tabla 1**

*Concentraciones de los extractos etanólicos de Rosmarinus officinalis y Caesalpinia spinosa.*

Solución madre (mL)	Agua destilada estéril (mL)	Concentración (mg/mL)
2	0	500*
1	0.25	400
1	0.6	300
1	1.5	200
1	4	100

### **3.3.7. Estandarización del inóculo bacteriano**

Las cepas bacterianas se sembraron en una placa con Agar Tripticasa Soya y se incubaron a 24 horas, se seleccionaron colonias aisladas y se procedió a preparar una suspensión en Solución Salina Fisiológica Estéril. La suspensión se ajustó a la escala del nefelómetro de Mc Farland (tubo N° 0.5), cuya densidad poblacional es de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL.

### **3.3.8. Preparación de discos de susceptibilidad**

Se empleó papel filtro Watman N° 01, de cual se obtuvo los discos de 6 mm de diámetro, para ello se usó un perforador. Los discos se colocaron en un frasco de vidrio, se esterilizaron en la autoclave 15 Lb. de presión a 121 °C por 15 minutos y finalmente se secaron en el horno 80 °C por 24h. Con la ayuda de una pinza esterilizada, los discos fueron embebidos en las diferentes concentraciones (100, 200, 300, 400, 500 mg/mL), se dejaron secar por 5 min. en reposo para luego realizar la prueba de susceptibilidad. Se utilizó un disco embebido en agua destilada estéril como control negativo.

### **3.3.9. Prueba de susceptibilidad bacteriana según el método modificado de difusión de Kirby Bauer**

En placas petri previamente esterilizadas se sirvió 10 mL. de agar Müller Hinton, se dejó solidificar y se realizó el control de esterilización llevándolas a incubación a 37 °C por 24 horas. Se introdujo el hisopo esterilizado dentro del inóculo estandarizado, eliminando el exceso por rotación firme contra la pared interna del tubo. El inóculo se sembró superficialmente por estría en tres direcciones diferentes, con el fin de cubrir toda la superficie del agar, luego se dejó secar durante cinco minutos y se colocaron los discos impregnados con el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* “romero” y *Caesalpinia spinosa* “tara” (Figura 20). Luego se llevó las placas a incubación a 37°C/24 horas. Transcurrido el tiempo se midió los halos de inhibición (mm), registrando la medida para cada una de las cepas.

### **3.3.10. Determinación de la concentración mínima inhibitoria**

Adecuamos la técnica siguiendo las recomendaciones del método de macrodilución en tubo según la Norma Técnica Peruana N° 30 del INS donde se diluyó a partir de la concentración que tuvo menos efecto inhibitorio, así es como se hicieron diluciones hasta obtener concentraciones decrecientes del extracto, las cuales fueron 100mg/mL, 90 mg/mL, 80mg/mL, 70mg/mL, 60 mg/ mL, 50 Mg/mL, 40mg/mL, 30mg/mL, 20mg/mL y 10 mg/ mL para *Escherichia coli* BLEE y *Pseudomonas aeruginosa*; 100mg/mL, 80mg/mL, 70mg/mL, 60 mg/ mL, 50 Mg/mL, 40mg/mL, 30mg/mL, 20mg/mL, 10 mg/ mL y 5 mg/mL para *Staphylococcus aureus*, a un tubo con caldo nutritivo no se le inoculó y lo tomamos como control negativo de crecimiento y otro sólo con el microorganismo sin añadirle el extracto etanólico como control positivo. Incubar los tubos a 35° C durante 16 a 18 horas. La lectura consistirá en observar a simple vista la presencia de turbidez del caldo en comparación con el tubo de control de crecimiento (control positivo).

**Figura 20**

*Siembra en la superficie de la placa de Agar Muller Hinton con el inoculo de cada cepa incubado durante 24 horas.*



### **3.3.11. Análisis estadístico de datos**

Los resultados fueron sometidos a un Análisis de Varianza (ANAVA), para contrastar las medias de los promedios de los halos de inhibición para las cepas de *Escherichia coli* BLEE, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* “romero” y *Caesalpinia spinosa* “tara”, este análisis se complementó con la Prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.05. Para todo ello se usó el software estadístico: Estadística versión 5.0 y Ms Excel 2016.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Efecto Inhibitorio del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* frente al crecimiento de *Escherichia coli* BLEE, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

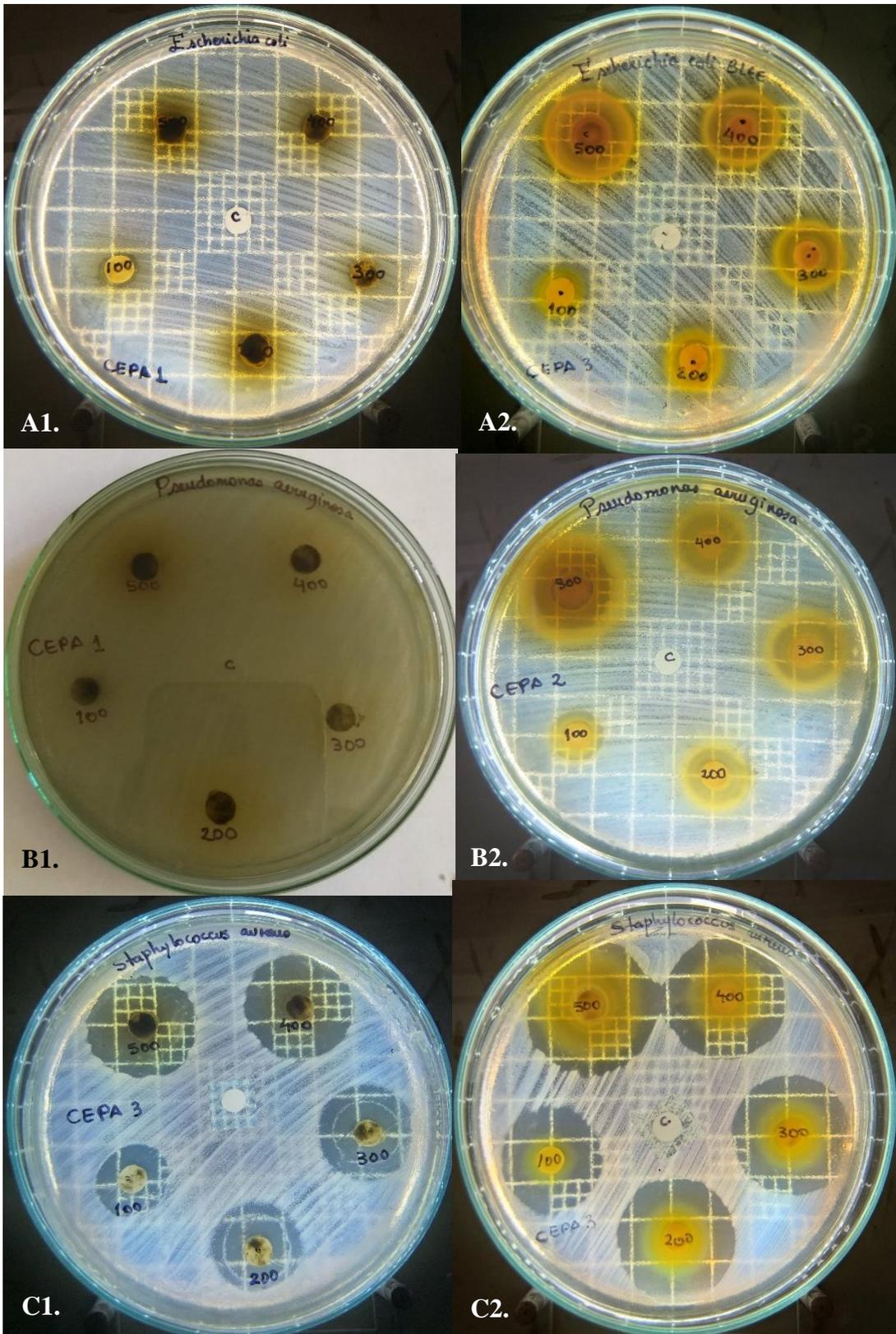
Los resultados obtenidos demostraron que el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* inhibió las cepas de *Staphylococcus aureus*, con halos de inhibición entre 12.86 a 22.73 mm según la concentración del extracto que va desde los 100 mg/mL a 500 mg/mL, cuyos diámetros promedio se incrementan a medida que aumenta la concentración del extracto etanólico; mientras que *Escherichia coli* BLEE y *Pseudomonas aeruginosa* no presentaron interacción alguna al encontrarse halos de inhibición de 6 mm en todas las concentraciones (Figura 21, Tabla 2).

### 4.2. Efecto Inhibitorio del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* frente al crecimiento de *Escherichia coli* BLEE, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

El extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* causó inhibición en todas las cepas de *Escherichia coli* BLEE, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*; se observó que, a mayor concentración de los extractos etanólicos, el efecto inhibitorio era mayor. De igual manera, se pudo determinar que *Staphylococcus aureus* demostró tener una mayor sensibilidad, teniendo en cuenta el promedio de halos que oscila entre 21.93 a 31.8 mm, según la concentración que va desde 100mg/mL a 500mg/mL; le sigue *Pseudomonas aeruginosa* con halos de 10.13 a 15.6 mm y finalmente *Escherichia coli* BLEE con halos de 8.6 a 16.73 mm (Figura 21, Tabla 3).

### Figura 21

Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* frente a A1. *Escherichia coli* BLEE, B1. *Pseudomonas aeruginosa*, C1. *Staphylococcus aureus* y *Caesalpinia spinosa* frente a A2. *Escherichia coli* BLEE B2. *Pseudomonas aeruginosa*, C2. *Staphylococcus aureus*.



**Tabla 2**

*Promedios del halo de inhibición de Escherichia coli BLEE, Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus enfrentadas al extracto etanólico de Rosmarinus officinalis.*

Concentración del extracto (mg/mL)	Halos de inhibición por especie (mm)		
	<i>Escherichia coli BLEE</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100	6.00	6.00	12.86
200	6.00	6.00	15.60
300	6.00	6.00	17.26
400	6.00	6.00	19.06
500	6.00	6.00	22.73

**Tabla 3**

*Promedios del halo de inhibición de Escherichia coli BLEE, Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus enfrentadas al extracto etanólico de Caesalpinia spinosa.*

Concentración del extracto (mg/mL)	Halos de inhibición por especie (mm)		
	<i>Escherichia coli BLEE</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
100	8.60	10.13	21.93
200	10.86	12.00	24.73
300	12.40	13.13	26.60
400	13.73	14.26	29.26
500	16.73	15.60	31.80

### 4.3. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La concentración mínima inhibitoria del extracto de *Rosmarinus officinalis* para *Staphylococcus aureus* fue de 20 mg/mL (Figura 22). Mientras que la concentración mínima inhibitoria del extracto de *Caesalpinia spinosa* para *Escherichia coli* BLEE, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* fue de 50 mg/mL, 30 mg/mL y 10mg/mL respectivamente (Figuras 23, 24 y 25).

**Figura 22**

*Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de Rosmarinus officinalis frente a la especie Staphylococcus aureus Cepa 1.*

**Figura 23**

*Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de Caesalpinia spinosa frente a la especie Escherichia coli BLEE Cepa 1.*



**Figura 24**

*Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de Caesalpinia spinosa frente a la especie Pseudomonas aeruginosa Cepa 1.*

**Figura 25**

*Diluciones utilizadas en la prueba de CMI con el extracto de Caesalpinia spinosa frente a la especie Staphylococcus aureus Cepa 1.*



#### **4.4. Análisis de varianza de los promedios de los halos de inhibición de *Escherichia coli* BLEE por efecto de los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Caesalpinia spinosa***

Se determinó que las variables extracto, concentración (cc), cepa, extracto\*cc y extracto\*cepa influyeron significativamente sobre el efecto producido por los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Caesalpinia spinosa* sobre el crecimiento de *Escherichia coli* BLEE, tal y como se demuestra en el Análisis de Varianza (Tabla 4), mientras que en la interacción en las variables cc\*cepa y extracto\*cc\*cepa se genera un efecto similar, sin diferencias significativas.

##### **Hipótesis**

H<sub>0-1</sub>: No existen diferencias significativas entre los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Caesalpinia spinosa*.

H<sub>0-2</sub>: No existen diferencias significativas entre las concentraciones de los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Caesalpinia spinosa*.

H<sub>0-3</sub>: No existen diferencias significativas entre las cepas de *Escherichia coli* BLEE.

H<sub>0-4</sub>: No existen diferencias significativas entre los extractos etanólicos y las concentraciones utilizadas.

H<sub>0-5</sub>: No existen diferencias significativas entre los extractos etanólicos y las cepas bacterianas estudiadas.

H<sub>0-6</sub>: No existen diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas y las cepas bacterianas estudiadas.

H<sub>0-7</sub>: No existen diferencias significativas entre los extractos etanólicos, las concentraciones utilizadas y las cepas bacterianas estudiadas.

**Tabla 4**

*Análisis de varianza (ANOVA) de los promedios de los halos de inhibición de Escherichia coli BLEE por efecto de los extractos etanólicos de Rosmarinus officinalis y Caesalpinia spinosa.*

Efecto	SS	DF	MS	F	P	Decisión
extracto	1568.17	1	1568.17	4850.00	0.000000	Rechazar H <sub>0-1</sub>
cc	279.93	4	69.98	216.44	0.000000	Rechazar H <sub>0-2</sub>
cepa	4.97	2	2.49	7.69	0.000720	Rechazar H <sub>0-3</sub>
extracto*cc	279.93	4	69.98	216.44	0.000000	Rechazar H <sub>0-4</sub>
extracto*cepa	4.97	2	2.49	7.69	0.000720	Rechazar H <sub>0-5</sub>
cc*cepa	2.03	8	0.25	0.78	0.618034	Aceptar H <sub>0-6</sub>
extracto*cc*cepa	2.03	8	0.25	0.78	0.618034	Aceptar H <sub>0-7</sub>
Error	38.80	120	0.32			

SS: Sum of squares (Suma de cuadrados) DF: Degree of freedom (grado de libertad) MS: Middle square (cuadrado medio) F: Test P: Probability (Probabilidad)

Se evidenció a través de la Prueba de significación de Tukey el comportamiento de la variable “extracto” con el cuál se determinó que los extractos etanólicos empleados forman halos promedios muy distintos, siendo el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* el que generó halos de inhibición de mayor dimensión con promedio de 12.47 mm., mientras que el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* no tuvo efecto (Tabla 5).

**Tabla 5**

*Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición de Escherichia coli BLEE por efecto de los extractos etanólicos Rosmarinus officinalis y Caesalpinia spinosa.*

Extracto	Promedio de halos de inhibición (mm)	Significancia ( $\alpha=0.05$ )
<i>Rosmarinus officinalis</i>	6.00	a
<i>Caesalpinia spinosa</i>	12.47	b

Se puede apreciar el efecto que producen las diferentes concentraciones de los extractos etanólicos empleados sobre las cepas de *Escherichia coli* BLEE, evidenciando que existen diferencias entre todas las concentraciones; es decir, a medida que las concentraciones de los extractos aumentan el efecto inhibitorio es mayor observándose en los diámetros de los halos de inhibición (Tabla 6).

**Tabla 6**

*Prueba de significancia de Tukey del promedio de halo de inhibición de Escherichia coli BLEE por las cinco concentraciones de los extractos etanolicos de Rosmarinus officinalis y Caesalpinia spinosa.*

cc (mg/mL)	Promedio de halos de inhibición (mm)	Significancia ( $\alpha=0.05$ )
100	7.30	a
200	8.43	b
300	9.20	c
400	9.87	d
500	11.37	e

Con respecto a las cepas empleadas de *Escherichia coli* BLEE la cepa 3 y la cepa 1 presentan halos de inhibición muy similares y son las más sensibles; por otro lado, la cepa 2 es más resistente ya que presenta un promedio de halo de inhibición de 8.98 mm (Tabla 7).

**Tabla 7**

*Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición de las cepas de Escherichia coli BLEE frente a los extractos etanolicos de Rosmarinus officinalis y Caesalpinia spinosa.*

Cepa de <i>Escherichia coli</i> BLEE	Promedio de halos de inhibición (mm)	Significancia ( $\alpha=0.05$ )
2	8.98	a
3	9.32	b
1	9.40	b

#### **4.5. Análisis de varianza de los promedios de los halos de inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* por efecto de los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Caesalpinia spinosa***

Se determinó que las variables extracto, concentración (cc), cepa, extracto\*cc y extracto\*cepa influyeron significativamente sobre el efecto producido por los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Caesalpinia spinosa* sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, tal y como se demuestra en el Análisis de Varianza (Tabla 8), mientras que en la interacción en las variables cc\*cepa y extracto\*cc\*cepa se genera un efecto similar, sin diferencias significativas.

#### **Hipótesis**

H<sub>0-1</sub>: No existen diferencias significativas entre los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Caesalpinia spinosa*.

H<sub>0-2</sub>: No existen diferencias significativas entre las concentraciones de los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Caesalpinia spinosa*.

H<sub>0-3</sub>: No existen diferencias significativas entre las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

H<sub>0-4</sub>: No existen diferencias significativas entre los extractos etanólicos y las concentraciones utilizadas.

H<sub>0-5</sub>: No existen diferencias significativas entre los extractos etanólicos y las cepas bacterianas estudiadas.

H<sub>0-6</sub>: No existen diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas y las cepas bacterianas estudiadas.

H<sub>0-7</sub>: No existen diferencias significativas entre los extractos etanólicos, las concentraciones utilizadas y las cepas bacterianas estudiadas.

**Tabla 8**

*Análisis de varianza (ANOVA) de los promedios de los halos de inhibición de Pseudomonas aeruginosa por efecto de los extractos etanólicos de Rosmarinus officinalis y Caesalpinia spinosa.*

Efecto	SS	DF	MS	F	P	Decisión
extracto	1851.53	1	1851.53	2923.46	0.000000	Rechazar H <sub>0-1</sub>
cc	131.97	4	32.99	52.09	0.000000	Rechazar H <sub>0-2</sub>
cepa	8.69	2	4.35	6.86	0.001506	Rechazar H <sub>0-3</sub>
extracto*cc	131.97	4	32.99	52.09	0.000000	Rechazar H <sub>0-4</sub>
extracto*cepa	8.69	2	4.35	6.86	0.001506	Rechazar H <sub>0-5</sub>
cc*cepa	1.31	8	0.16	0.26	0.977915	Aceptar H <sub>0-6</sub>
extracto*cc*cepa	1.31	8	0.16	0.26	0.977915	Aceptar H <sub>0-7</sub>
Error	76.00	120	0.63			

SS: Sum of squares (Suma de cuadrados) DF: Degree of freedom (grado de libertad) MS: Middle square (cuadrado medio) F: Test P: Probability (Probabilidad)

Se evidenció a través de la Prueba de significación de Tukey el comportamiento de la variable “extracto” con el cuál se determinó que los extractos etanólicos empleados forman halos promedios muy distintos, siendo el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* el que generó halos de inhibición de mayor dimensión con promedio de 13.03 mm., mientras que el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* no tuvo efecto (Tabla 9).

**Tabla 9**

*Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición de Pseudomonas aeruginosa por efecto de los extractos etanólicos Rosmarinus officinalis y Caesalpinia spinosa.*

Extracto	Promedio de halos de inhibición (mm)	Significancia ( $\alpha=0.05$ )
<i>Rosmarinus officinalis</i>	6.00	a
<i>Caesalpinia spinosa</i>	13.02	b

En las diferentes concentraciones experimentales el efecto inhibitorio para las concentraciones de 200 mg/mL y 300 mg/mL posee el mismo grado de significancia, así mismo las concentraciones de 300 mg/mL y 400 mg/mL; sin embargo, las concentraciones de 100 mg/mL y 500 mg/mL son diferentes a los anteriores (Tabla 10).

**Tabla 10**

*Prueba de significancia de Tukey del promedio de halo de inhibición de Pseudomonas aeruginosa por las cinco concentraciones de los extractos etanolicos de Rosmarinus officinalis y Caesalpinia spinosa.*

cc (mg/mL)	Promedio de halos de inhibición (mm)	Significancia ( $\alpha=0.05$ )	
100	8.07	a	
200	9.00	b	
300	9.57	b	c
400	10.13		c
500	10.80		d

Con respecto a las cepas empleadas de *Pseudomonas aeruginosa* la cepa 2 y la cepa 3 presentan halos de inhibición muy similares y son las más sensibles; por otro lado, la cepa 1 es más resistente ya que presenta un promedio de halo de inhibición de 9.18 mm (Tabla 11).

**Tabla 11**

*Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición de las cepas de Pseudomonas aeruginosa frente a los extractos etanolicos de Rosmarinus officinalis y Caesalpinia spinosa.*

Cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Promedio de halos de inhibición (mm)	Significancia ( $\alpha=0.05$ )	
1	9.18	a	
2	9.62		b
3	9.74		b

#### **4.6. Análisis de varianza de los promedios de los halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* por efecto de los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Caesalpinia spinosa***

Se determinó que las variables extracto, concentración (cc), cepa, extracto\*cepa, cc\*cepa y extracto\*cc\*cepa, influyeron significativamente sobre el efecto producido por los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Caesalpinia spinosa* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, tal y como se demuestra en el Análisis de Varianza (Tabla 12), mientras que en la interacción de la variable extracto\*cc no hay diferencia significativa.

#### **Hipótesis**

H<sub>0-1</sub>: No existen diferencias significativas entre los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Caesalpinia spinosa*.

H<sub>0-2</sub>: No existen diferencias significativas entre las concentraciones de los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Caesalpinia spinosa*.

H<sub>0-3</sub>: No existen diferencias significativas entre las cepas de *Staphylococcus aureus*.

H<sub>0-4</sub>: No existen diferencias significativas entre los extractos etanólicos y las concentraciones utilizadas.

H<sub>0-5</sub>: No existen diferencias significativas entre los extractos etanólicos y las cepas bacterianas estudiadas.

H<sub>0-6</sub>: No existen diferencias significativas entre las concentraciones utilizadas y las cepas bacterianas estudiadas.

H<sub>0-7</sub>: No existen diferencias significativas entre los extractos etanólicos, las concentraciones utilizadas y las cepas bacterianas estudiadas.

**Tabla 12**

*Análisis de varianza (ANOVA) de los promedios de los halos de inhibición de Staphylococcus aureus por efecto de los extractos etanólicos de Rosmarinus officinalis y Caesalpinia spinosa.*

Efecto	SS	DF	MS	F	P	Decisión
extracto	3285.36	1	3285.36	2044.83	0.000000	Rechazar $H_{0-1}$
cc	1703.51	4	425.88	265.07	0.000000	Rechazar $H_{0-2}$
cepa	467.45	2	233.73	145.47	0.000000	Rechazar $H_{0-3}$
extracto*cc	6.97	4	1.74	1.09	0.367065	Aceptar $H_{0-4}$
extracto*cepa	259.00	2	129.50	80.60	0.000000	Rechazar $H_{0-5}$
cc*cepa	42.01	8	5.25	3.27	0.002093	Rechazar $H_{0-6}$
extracto*cc*cepa	61.67	8	7.71	4.80	0.000039	Rechazar $H_{0-7}$
Error	192.80	120	1.61			

SS: Sum of squares (Suma de cuadrados) DF: Degree of freedom (grado de libertad) MS: Middle square (cuadrado medio) F: Test P: Probability (Probabilidad)

Se evidenció a través de la Prueba de significación de Tukey el comportamiento de la variable “extracto” con el cuál se determinó que los extractos etanólicos empleados forman halos promedios muy distintos, siendo el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* el que generó halos de inhibición de mayor dimensión con promedio de 26.87 mm., mientras que el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* con promedio de 17.51 mm. (Tabla 13).

**Tabla 13**

*Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición de Staphylococcus aureus por efecto de los extractos etanólicos Rosmarinus officinalis y Caesalpinia spinosa.*

Extracto	Promedio de halos de inhibición (mm)	Significancia ( $\alpha=0.05$ )
<i>Rosmarinus officinalis</i>	17.50	a
<i>Caesalpinia spinosa</i>	26.87	b

Se puede apreciar el efecto que producen las diferentes concentraciones de los extractos etanólicos empleados sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*, evidenciando que existen diferencias entre todas las concentraciones; es decir, a medida que las concentraciones de los extractos aumentan el efecto inhibitorio es mayor observándose en los diámetros de los halos de inhibición (Tabla 14).

**Tabla 14**

*Prueba de significancia de Tukey del promedio de halo de inhibición de Staphylococcus aureus por las cinco concentraciones de los extractos etanolicos de Rosmarinus officinalis y Caesalpinia spinosa.*

cc (mg/mL)	Promedio de halos de inhibición (mm)	Significancia ( $\alpha=0.05$ )
100	17.40	a
200	20.17	b
300	21.93	c
400	24.17	d
500	27.27	e

Con respecto a las cepas empleadas de *Staphylococcus aureus* las tres cepas presentan halos de inhibición diferentes; siendo, la cepa 3 más sensible con promedio de halo de inhibición de 23.84 mm y la cepa 2 más resistente con promedio de halo de inhibición de 19.74 mm (Tabla 15).

**Tabla 15**

*Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición de las cepas de Staphylococcus aureus frente a los extractos etanolicos de Rosmarinus officinalis y Caesalpinia spinosa.*

Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>	Promedio de halos de inhibición (mm)	Significancia ( $\alpha=0.05$ )
2	19.74	a
1	22.98	b
3	23.84	c

## V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación realizado, se logró demostrar que existe efecto inhibitorio *in vitro* del extracto de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. frente a la cepa *Staphylococcus aureus* con halos de inhibición de 22.73 mm a la máxima concentración del extracto, mientras que para *Escherichia coli* BLEE y *Pseudomonas aeruginosa* no presento inhibición alguna (Tabla 2).

Estos resultados concuerdan con Rodríguez et al. (2014), en cuyo trabajo evaluó la actividad del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” sobre *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, determinando que el extracto tuvo efecto sobre *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*, bacterias implicadas en infecciones de las vías respiratorias altas; y que sobre *Pseudomonas aeruginosa* dicho extracto no ejerció efecto alguno. Así mismo nos menciona que a partir de concentraciones de 5 mg/ml inhiben a *S. aureus* con halos de 7mm.

Otro trabajo descrito por la investigación realizada por Gonelimali et al. (2018), donde evaluaron propiedades antimicrobianas y mecanismo de acción del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. “romero” el cual exhibió efecto inhibitorio contra cuatro cepas patógenas (EC, SE, BC y SA) *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, además nos confirma que no hay inhibición frente a *Pseudomonas aeruginosa*. En nuestra investigación *E. coli* BLEE no tiene efecto inhibitorio, como lo menciona Serra (2017), esto se debe a que la cepa usada presenta un mecanismo de resistencia BLEE (Betalactamasa de espectro extendido) por lo tanto hace un poco más difícil la inhibición de la bacteria por parte del extracto de hojas de *Rosmarinus officinalis* L.

La resistencia actual de los gérmenes a los antimicrobianos constituye un grave problema actual de salud en todo el orbe; además García et al. (2011), afirma que hoy en día

está aumentando el número de infecciones adquiridas en la comunidad o relacionadas con la salud causadas por estas *E. coli* productoras de BLEE. El papel de estas enzimas, es el de actuar como un factor de virulencia; por lo tanto, lo hace más resistente al microorganismo.

La actividad inhibitoria del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. se debe a los compuestos químicos que presenta, se considera que son los ácidos fenoles y particularmente el ácido rosmarinico los que tienen mayor efecto sobre los microorganismos, poseen propiedades antimicrobianas las cuales son potenciadas por los flavonoides, estos últimos potencian el grado de liposubilidad del extracto que le permite atravesar las membranas celulares por difusión pasiva, con ello contribuye también las saponinas que alteran la tensión superficial de los lípidos de la membrana celular.

Los resultados de la actividad inhibitoria del extracto del fruto de *Caesalpinia spinosa* frente a las cepas de *Escherichia coli* BLEE, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, generó halos de inhibición de 31.80 mm en *S. aureus*, siendo estas cepas las que presentaron mayor susceptibilidad, le sigue *E. coli* BLEE con 16.73 mm y *P. aeruginosa* con 15.60 mm a la máxima concentración del extracto (500 mg/mL) (Tabla 3).

Estos resultados guardan relación con lo que menciona Asqui y Calcina (2019), quienes afirman que el extracto etanólico de las vainas de *Caesalpinia Spinosa* presentan acción inhibitoria; pues en su investigación, la evaluación de la sensibilidad antibacteriana de los extractos sobre *Escherichia coli* fue de sensibilidad intermedia a concentraciones de 80 y 100 % del extracto y resistente a concentraciones menores de 80 %. Para *Staphylococcus aureus* fue sensible a la concentración del 100 % del extracto, de sensibilidad intermedia para concentraciones de 40, 60 y 80 % y resistente a concentraciones menores de 40 %. Comparando las dos investigaciones podemos decir que en las dos demuestran que el extracto de fruto de *Caesalpinia spinosa* tiene acción inhibitoria frente a las cepas patógenas ya mencionadas. Además, que a concentraciones más bajas ya no hay inhibición.

También Ravines (2019), afirma que tanto *Staphylococcus aureus* como *Pseudomonas aeruginosa* fueron sensibles al extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) evidenciándose por la generación de halos de inhibición, cuyos diámetros promedio se incrementan a medida que aumenta la concentración del extracto etanólico (600 a 900 mg/ml). De la misma forma, se pudo determinar que *Staphylococcus aureus* demostró ser más sensible con halos de inhibición de 10.56 mm a 14.2 mm y para *Pseudomonas aeruginosa* con promedio de halos de inhibición de 8.87 mm a 11.56 mm. Este trabajo de investigación obtuvo resultados similares a nuestro trabajo realizado con el mismo extracto, con la diferencia que nosotros trabajamos con concentraciones más bajas como son de 100 a 500 mg/ml, con los cuales también mostro resultados de inhibición.

En estudios realizados a *Caesalpinia spinosa* (Tara) se encontró presencia de taninos, flavonoides, gomas, alcaloides, y proteínas que se pueden encontrar tanto en la vaina como en la semilla, los cuales hacen que tenga acción farmacológica. Este vegetal presenta como metabolito secundario predominante a los Taninos, particularmente el ácido gálico los cuales son solubles en agua, etanol, acetona y la actividad antibacteriana se basa en estos al combinarse con las proteínas de la membrana celular de las bacterias, inhiben la actividad enzimática desnaturalizando las proteínas (Cholán et al, 2019).

Para finalizar Rodríguez et al. (2014), considera que las bacterias gram positivas muestran mayor sensibilidad a los productos en función a la mayor permeabilidad que ofrecen sus envolturas (pared celular y membrana citoplásmica); en cambio *Pseudomonas aeruginosa* por ser una bacteria gram negativa posee una pared de naturaleza hidrófoba que actúa como barrera de difusión a moléculas grandes dándole mayor impermeabilidad, incluso éste es mayor en 100 veces a la de otras bacterias gramnegativas, a esto se le agrega que dicha resistencia podría deberse a la presencia de un material extracromosómico en algunas cepas, determinando genéticamente la resistencia a los antimicrobianos.

## VI. CONCLUSIONES

- 6.1. El extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* tiene efecto inhibitorio *in vitro* sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* estudiadas. Sin embargo, no presento efecto alguno frente a las cepas de *Escherichia coli* BLEE y *Pseudomonas aeruginosa*.
- 6.2. El extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* tiene efecto inhibitorio en todas las cepas de *Escherichia coli* BLEE, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.
- 6.3. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de *Rosmarinus officinalis* fue de 20mg/mL para *Staphylococcus aureus*.
- 6.4. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto de *Caesalpinia spinosa* para *Escherichia coli* BLEE fue de 50mg/mL, *Pseudomonas aeruginosa* de 30mg/mL y *Staphylococcus aureus* de 10mg/mL.

## VII. RECOMENDACIONES

Continuar con la investigación probando los extractos de *Rosmarinus officinalis* y *Caesalpinia spinosa* con otros microorganismos de importancia clínica. Realizar pruebas de toxicidad de los extractos etanólicos de *Rosmarinus officinalis* y *Caesalpinia spinosa* para garantizar su inocuidad tanto *in vitro* como *in vivo*. Realizar investigaciones con otras plantas a fin de observar su efectividad sobre *Escherichia coli* BLEE, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

## VIII. REFERENCIAS

- Aguilar, D. (2015). *E. coli* BLEE, la enterobacteria que ha atravesado barreras. *Revista de Investigación Médica Sur*, 22(2), 57-63.
- Álvarez, J., Lamas, J., González, L., Rodríguez, I., Fernández, M., Arca, A., Bermúdez, J., y Fuente, J. (2017). Resistencia a carbapenemas en *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en urocultivos: prevalencia y factores de riesgo. *Revista Española de Quimioterapia*, 30(3), 195-200.
- Alvo, A., Téllez, V., Sedano, C., y Fica, A. (2016). Conceptos básicos para el uso racional de antibióticos en otorrinolaringología. *Revista de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello*, 76, 136-147. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-48162016000100019>
- Asqui, M y Calcina, M. (2019). *Efecto antibacteriano de extracto etanólico de las vainas de Caesalpinia Spinosa (Molina) Kutze (tara) sobre Staphylococcus aureus ATCC 25923 y Escherichia coli ATCC 25922, Arequipa-2019* (tesis de pregrado, Universidad Privada Autónoma del Sur). Repositorio institucional. <http://repositorio.upads.edu.pe/xmlui/handle/UPADS/82>
- Ávila, R., Navarro, A., Vera, O., Dávila, R., Melgoza, N., y Meza, R. (2011). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y Mar*, 15(43), 23-36. <https://biblat.unam.mx/es/revista/ciencia-y-mar/articulo/romero-rosmarinus-officinalis-l-una-revision-de-sus-usos-no-culinarios>
- Barni, M., Fontanals, A., y Moreno, S. (2009). Estudio de la eficacia antibiótica de un extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. contra *Staphylococcus aureus* en dos modelos de infección en piel de ratón. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(3), 219-223. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85611774009>

- Benites, C. (2015). *Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de Caesalpinia spinosa (“tara”) sobre cepa de Candida albicans ATCC 90028* (tesis de pregrado, Universidad Privada de Antenor Orrego). Repositorio institucional. <https://hdl.handle.net/20.500.12759/1313>
- Calle, A., Colqui, K., Rivera, D., y Cieza, J. (2017). Factores asociados a la presentación de infecciones urinarias por *Escherichia coli* productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Revista Médica Herediana*, 28, 142-149. <https://doi.org/10.20453/rmh.v28i3.3180>
- Calleja, M., y Ávila, L. (2016). Plantas Medicinales. *Tlamati Sabiduría*, 7(1), 607-619.
- Castaño, H., Ciro, G., Zapata, J., y Jiménez, S. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Vitae*, 17(2), 149-154. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0121-40042010000200006&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-40042010000200006&lng=en&tlng=es).
- Castro, A., Ramos, N., Juárez, J., Ruíz, J., Choquesillo, F., Ponce, J., Santa María, O., Castillo, A., García, D., Escudero, J., Navarro, A., Huamán, S., Machaca, M., Gutiérrez, P., Ramírez, E., y Gonzales, S. (2016). Composición química del aceite esencial de *Caesalpinia spinosa* “tara”, evaluación antioxidante y efecto antibacteriano frente a *Streptococcus mutans*. *Ciencia e Investigación*, 19(2), 89- 94. <https://doi.org/10.15381/ci.v19i2.13636>
- Cervantes, E., García, R., y Salazar, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica Médica de Laboratorio*, 61(1), 28- 40.

- Chávez, V. (2014). *Efecto de la Caesalpinia spinosa “taya” pulverizada en el tratamiento de la dermatitis del pañal en niños menores de un año que acuden al puesto de salud Huaraclla. Jesus-Cajamarca, 2013* (tesis de doctorado, Universidad Nacional de Cajamarca). Repositorio institucional. <http://repositorio.unc.edu.pe/bitstream/handle/UNC/1945>
- Cholán, K., Zavaleta, G., Saldaña, J., y Blas, W. (2019). Efecto del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Fabaceae) sobre el crecimiento de *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*. *Arnaldoa*, 26 (2), 699-712. <http://doi.org/10.22497/arnaldoa.262.26212>
- Flores, C. (2011). *Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de Caesalpinia spinosa “taya” sobre cepas de Enterococcus faecalis ATCC29212* (tesis de pregrado, Universidad Nacional Trujillo).
- Galiana, A. (2003). Infección por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente adquirido en la comunidad. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 74(1), 26-29. [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1728-59172011000300007&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172011000300007&lng=es&tlng=es).
- Galván, F., Agapito, J., Bravo, N., Lagos, J., y Tamariz, J. (2016). Caracterización fenotípica y molecular de *Escherichia coli* productoras de  $\beta$ -Lactamasas de espectro extendido en pacientes ambulatorios de Lima, Perú. *Revista Médica Herediana*, 27, 22-29.
- García, A., García, E., Hernández, A., Ruiz, J., Yagüe, G., Herrero, J., y Gómez, J. (2011). Bacteriemias por *Escherichia coli* productor de betalactamasas de espectro extendido (BLEE): significación clínica y perspectivas actuales. *Revista Española de Quimioterapia*, 24(2), 57-66.

- García de Alba, J., Ramírez, B., Robles, G., Zañudo, J., Salcedo, A., y García de Alba, J. (2012). Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos*, 39, 29-44.
- Goode, W., y Hatt, P. (1970). *Métodos de investigación social*. Trillas.
- Gonelimali, F., Lin, J., Miao, W., Xuan, J., Charles, F., Chen., y Hatab, S. (2018). Antimicrobial Properties and Mechanism of Action of Some Plant Extracts Against Food Pathogens and Spoilage Microorganisms. *Frontiers in microbiology*, 9(1639), 01-09. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01639>
- Guevara, M. (2013). *Efecto del aceite esencial de Rosmarinus officinalis "romero" sobre el crecimiento in vitro de Escherichia coli, Staphylococcus aureus y Salmonella enteritidis* (tesis de pregrado, Universidad Nacional de Trujillo).
- Hernández, A., Yagüe, G., García, E., Simón, M., Moreno, L., Canteras, M., y Gómez, J. (2018). Infecciones nosocomiales por *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente incluido carbapenémicos: factores predictivos y pronósticos. Estudio prospectivo 2016-2017. *Revista Española de Quimioterapia*, 31(2), 123–130.
- Huarino, M., y Ramos, D. (2013). Efecto antibacteriano de *Caesalpinia spinosa* (tara) sobre flora salival mixta. *Odontología SANMARQUINA*, 16(1), 32-35. <https://doi.org/10.15381/os.v16i1.5374>
- Kannan, R., Iniyar, A., y Prakash, V. (2011). Isolation of a small molecule with anti-MRSA activity from a mangrove symbiont *Streptomyces sp.* PVRK-1 and its biomedical studies in Zebrafish embryos. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(5), 341–347. [http://doi.org/10.1016/S2221-1691\(11\)60077-4](http://doi.org/10.1016/S2221-1691(11)60077-4)

- Lax, V. (2014). *Estudio de la variabilidad química, propiedades antioxidantes y biocidas de poblaciones espontaneas de Rosmarinus officinalis L. en la región de Murcia* (tesis de doctorado, Universidad de Murcia, España). Repositorio institucional <http://hdl.handle.net/10201/41969>
- López, M. (2008). El romero Planta aromática con efectos antioxidantes. *Offarm*, 27(7), 60-63.
- Maguiña, C., Ugarte, C., y Montiel, M., (2006). Uso adecuado y racional de los antibióticos. *Acta Médica Peruana*, 23(1), 15-20. <http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v23n1/a04v23n1>
- Martínez, S., De la Paz, J., Corral, A., y Martínez, C. (2004). Actividad diurética y antipirética de un extracto fluido de *Rosmarinus officinalis L.* en ratas. *Revista Cubana Plantas Medicinales*, 9(1).
- Mengoni, E., Castañeda, N., Centron, D., Moreno, S., Pivetta, O., Cafferata, E., y Vojnov, A. (2007). Uso potencial de extractos de romero sobre aislados clínicos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes con fibrosis quística. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(6), 354-355. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85617472021>
- Mensa, J., Soriano, A., Linares, P., Barberán, J., Montejo, M., Salavert, M., y col. (2013). Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Revista Española de Quimioterapia*, 26(1), 1-84. <https://medes.com/publication/92734>
- Ponce, J., Guadalupe, L., y Arana, C. (2015). Estudio bromatológico de *Rosmarinus officinalis L.* “romero” y obtención del aceite esencial. *Ciencia e Investigación*, 18(1), 9-13. <https://doi.org/10.15381/ci.v18i1.13599>

- Prieto, Z., Salirrosas, D., Arqueros, M., y Sánchez, L. (2018). El extracto de *Caesalpinia spinosa* inhibe la infección in vivo de *Flavobacterium columnare* en tilapia. *Scientia Agropecuaria*, 9(2), 215-221. <http://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecu.2018.02.06>
- Ravines, C. (2019). *Efecto inhibitorio in vitro de los extractos etanólicos de Caesalpinia spinosa, Curcuma longa, Plantago major y Verbena officinalis, sobre el crecimiento de Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa* (tesis de pregrado, Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo). Repositorio institucional. <https://hdl.handle.net/20.500.12893/4590>
- Rendón, M., Reyes, A., Rosas, J., y Rodríguez, F. (2012). Infecciones de vías urinarias. Patrón de resistencia in vitro de *E. coli* y *E. coli* ESBL a quinolonas, trimetoprimasulfametoxazol y nitrofurantoína. *Revista Medicina Interna de México*, 28(5), 434-439. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=37284>
- Rodríguez, Y., Espinoza, S., y Vergara, M. (2014). Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” sobre el crecimiento *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Salud & Vida Sipanense*. 1(2), 63-74.
- Serra, M. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*. 16(3), 402-419.
- Terán, Y., González, J., Gómez, K., Reyna, L., y Avila, F. (2015). Efecto in vitro del aceite esencial de los frutos de *Caesalpinia spinosa* (molina) Kuntze, tara sobre la viabilidad de cultivos de *Staphylococcus aureus* metilino resistente. *Pueblo Continente*, 26(1), 75-87.

Tres, J. (2006). Interacción entre fármacos y plantas medicinales. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 29 (2), 233-252.

## **IX. ANEXOS**

## ANEXO A



<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase:</b>	Asteridae
<b>Orden:</b>	Lamiales
<b>Familia:</b>	Lamiaceae
<b>Subfamilia:</b>	Nepetoideae
<b>Tribu:</b>	Mentheae
<b>Género:</b>	<i>Rosmarinus</i>
<b>Especie:</b>	<i>Rosmarinus officinalis</i>

## ANEXO B



Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae
Subfamilia:	Caesalpinioideae
Tribu:	Caesalpinieae
Género:	<i>Caesalpinia</i>
Especie:	<i>Caesalpinia spinosa</i>

## ANEXO C

## Constancia de identificación de las plantas trabajadas



**HERBARIO**  
**PEDRO RUIZ GALLO**  
UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

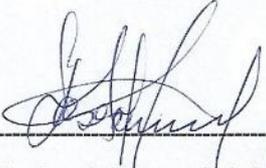
**CONSTANCIA**

LA DIRECTORA DEL HERBARIO PRG DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL  
PEDRO RUIZ GALLO, QUE SUSCRIBE,

**Hace constar:**

Que, los señores: **María Chapoñan Vidaurre** y **José Anonio Limo Arrasco**, Bachiller en Biología de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Facultad de Ciencias Biológicas, han hecho llegar al Herbario PRG 04 muestras botánicas, como parte de su proyecto de tesis titulada **“Efecto inhibitorio in vitro de los extractos etanólicos de romero y tara o taya, frente a cepas de *Escherichia coli* BLEE, *Pseudomonas aureginosa* y *Staphylococcus aureus*.”** las que han sido revisadas e identificadas como *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) perteneciente a la familia Lamiaceae Martinov y *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze (Tara o Taya) perteneciente a la familia Fabaceae Lindl.

Lambayeque, 14 de enero del 2020

  
MSc. Josefa Escurra Puicón



**ANEXO D**

Constancia de identificación de cepas trabajadas

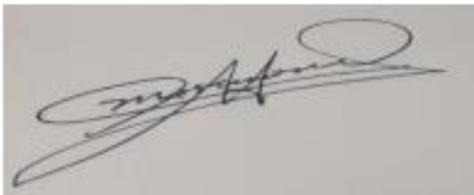
## Constancia

El que suscribe, MSc. Mario Cecilio Moreno Mantilla, jefe del laboratorio de Microbiología Clínica, deja constancia de que:

Las cepas de *Escherichia coli* BLEE, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* fueron cedidos por el Laboratorio de Microbiología Clínica y verificadas por los Bachilleres **Jorge Limo Arrasco y María Chapoñan Vidaure**, para la realización de su trabajo de tesis.

Se expide la presente constancia a solicitud de los interesados para los fines que crean convenientes.

Chiclayo, 25 de Febrero del 2022



*MSc. Mario C. Moreno Mantilla*

Jefe de Laboratorio de Microbiología Clínica

## ANEXO E

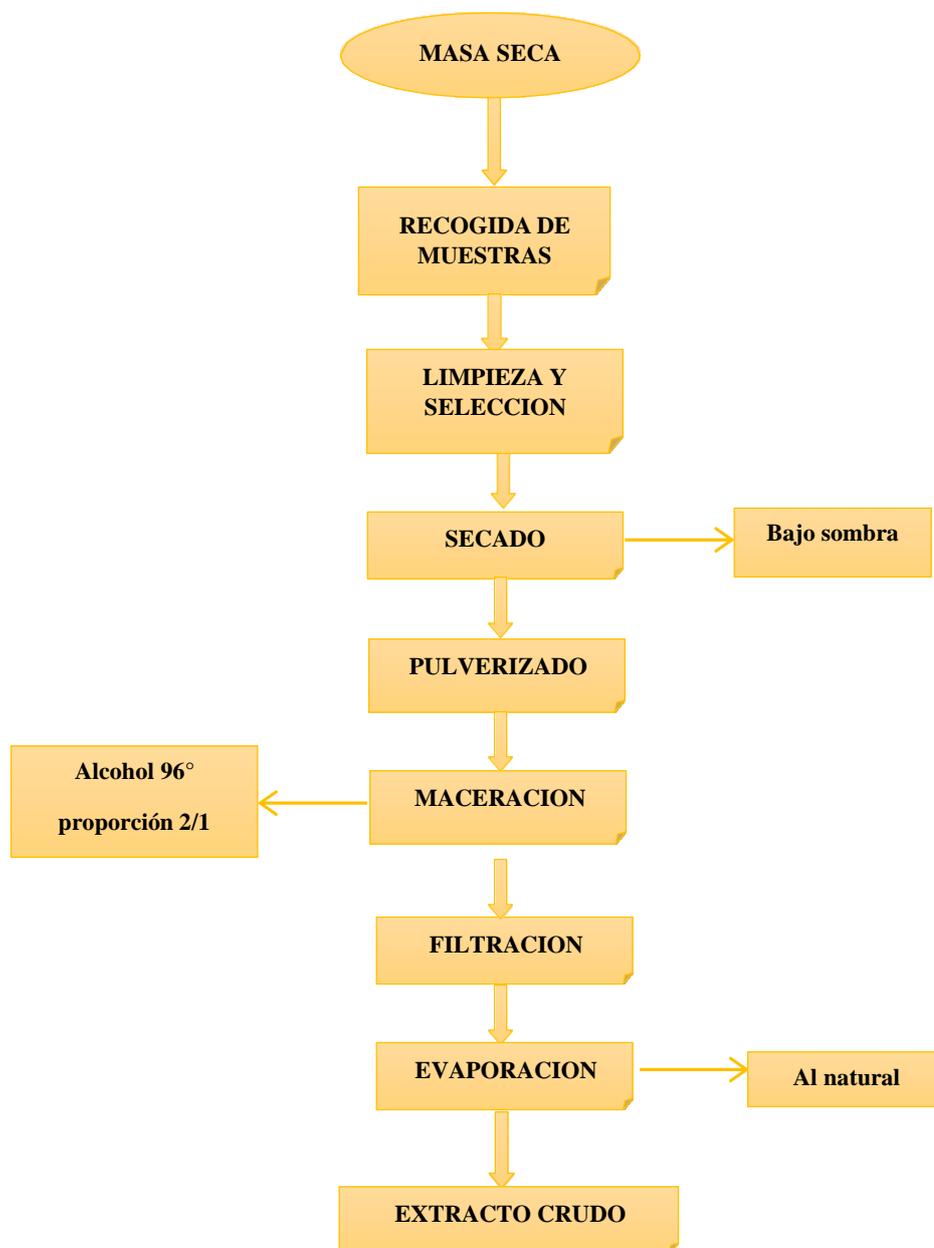
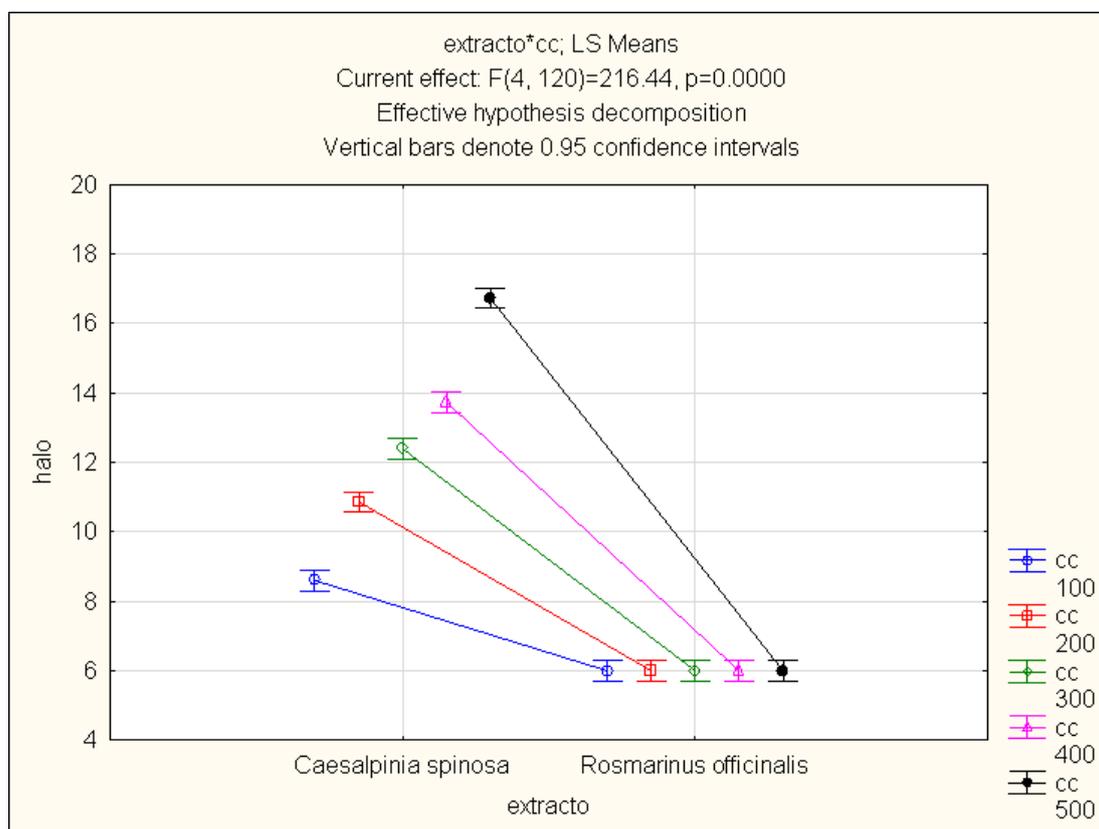


DIAGRAMA DE OBTENCION DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Rosmarinus officinalis* "romero" y *Caesalpinia spinosa* "tara"

## ANEXO F

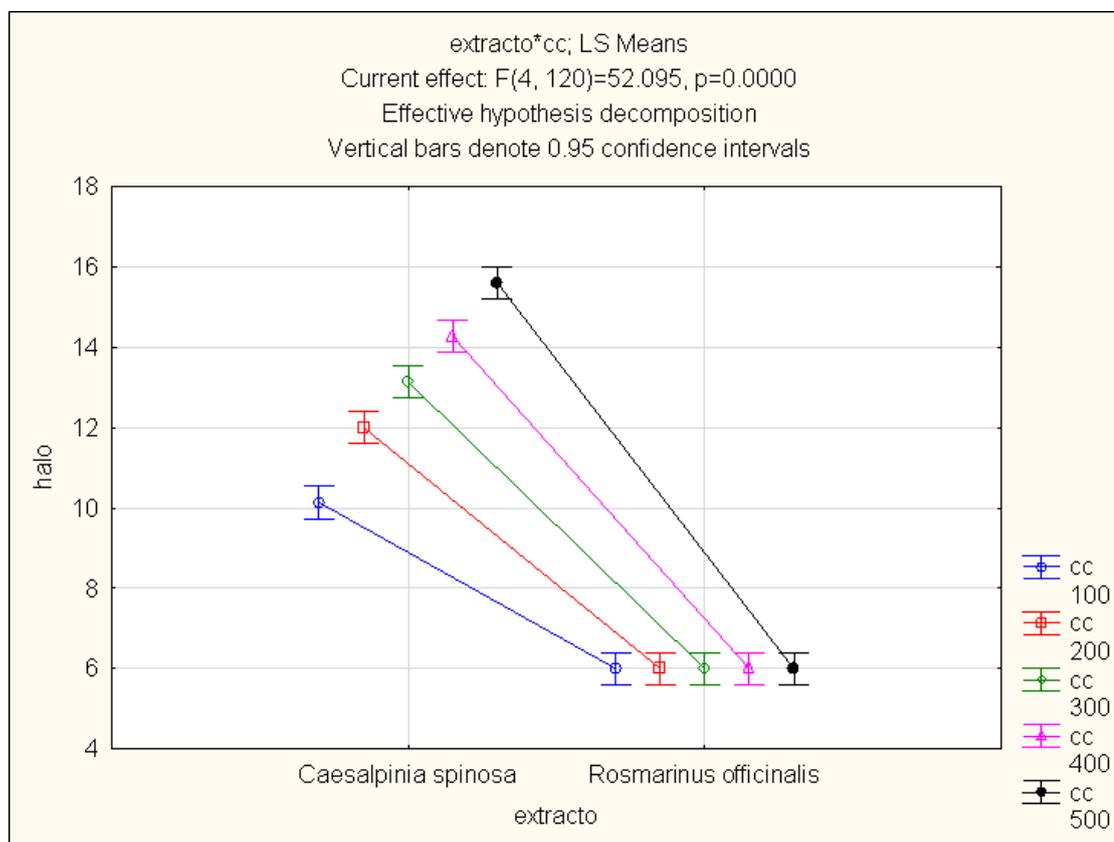
Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición de *Escherichia coli* BLEE por efecto de los extractos etanólicos y concentración de *Rosmarinus officinalis* y *Caesalpinia spinosa*.

Extracto	cc	Halo	1	2	3	4	5	6
<i>Rosmarinus officinalis</i>	100	6.00000	a					
<i>Rosmarinus officinalis</i>	200	6.00000	a					
<i>Rosmarinus officinalis</i>	300	6.00000	a					
<i>Rosmarinus officinalis</i>	400	6.00000	a					
<i>Rosmarinus officinalis</i>	500	6.00000	a					
<i>Caesalpinia spinosa</i>	100	8.60000		b				
<i>Caesalpinia spinosa</i>	200	10.86667			c			
<i>Caesalpinia spinosa</i>	300	12.40000				d		
<i>Caesalpinia spinosa</i>	400	13.73333					e	
<i>Caesalpinia spinosa</i>	500	16.73333						f



Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* por efecto de los extractos etanólicos y concentración de *Rosmarinus officinalis* y *Caesalpinia spinosa*.

Extracto	cc	Halo	1	2	3	4	5	6
<i>Rosmarinus officinalis</i>	100	6.00000	a					
<i>Rosmarinus officinalis</i>	200	6.00000	a					
<i>Rosmarinus officinalis</i>	300	6.00000	a					
<i>Rosmarinus officinalis</i>	400	6.00000	a					
<i>Rosmarinus officinalis</i>	500	6.00000	a					
<i>Caesalpinia spinosa</i>	100	10.13333		b				
<i>Caesalpinia spinosa</i>	200	12.00000			c			
<i>Caesalpinia spinosa</i>	300	13.13333				d		
<i>Caesalpinia spinosa</i>	400	14.26667					e	
<i>Caesalpinia spinosa</i>	500	15.60000						f



Prueba de significancia de Tukey del promedio de halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* por efecto de los extractos etanólicos y concentración de *Rosmarinus officinalis* y *Caesalpinia spinosa*.

Extracto	cc	Halo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Rosmarinus officinalis</i>	100	12.86667		b							
<i>Rosmarinus officinalis</i>	200	15.60000			c						
<i>Rosmarinus officinalis</i>	300	17.26667				d					
<i>Rosmarinus officinalis</i>	400	19.06667					e				
<i>Rosmarinus officinalis</i>	500	22.73333	a								
<i>Caesalpinia spinosa</i>	100	21.93333	a								
<i>Caesalpinia spinosa</i>	200	24.73333						f			
<i>Caesalpinia spinosa</i>	300	26.60000							g		
<i>Caesalpinia spinosa</i>	400	29.26667								h	
<i>Caesalpinia spinosa</i>	500	31.80000									i

