

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**



**DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA DE  
EXTRACTOS DE *Rosmarinus officinalis* L. (ROMERO) SOBRE *Staphylococcus  
aureus* RESISTENTE A LA METICILINA (SARM)**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR**

**LUIS FERNANDO LEMUS AGUILAR**

**PARA OPTAR AL GRADO DE**

**LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA**

**DICIEMBRE 2015**

**SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR INTERINO**

LIC. JOSÉ LUIS ARGUETA ANTILLÓN

**SECRETARIA GENERAL INTERINA**

DRA. ANA LETICIA ZAVALA DE AMAYA

**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

**DECANO**

LIC. SALVADOR CASTILLO ARÉVALO

**SECRETARIO**

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCÍA ERAZO

**DIRECCIÓN DE PROCESO DE GRADUACIÓN**

**DIRECTORA GENERAL**

MSc. Ena Edith Herrera Salazar

**TRIBUNAL CALIFICADOR**

**COORDINADORAS DE AREA DE:**

**MICROBIOLOGIA**

MSc. María Evelin Sánchez de Ramos

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

**DOCENTES ASESORES**

Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya

MSc. Mirna Lorena Sorto Álvarez

Dr. René Francisco Ramos Alvarenga

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad de El Salvador, en especial a la Facultad de Química y Farmacia y a sus docentes, por haber contribuido en mi formación académica a lo largo de este tiempo, a través de sus conocimientos y su apoyo continuo.

A mis docentes asesores, por su tiempo, orientación, dedicación y su apoyo constante durante este trabajo de graduación.

Al personal de CENSALUD, en especial a los laboratorios de Microbiología, Bacteriología y Fitoquímica, por haberme permitido realizar la parte experimental de mi trabajo de graduación en sus instalaciones.

A Helen Laínez y a APROCSAL por su ayuda en la elaboración de los extractos de romero, utilizados en el presente trabajo de graduación. Mil gracias.

Al Laboratorio Nacional de Referencia, por haberme brindado la cepa resistente para mi trabajo de graduación.

A las coordinadoras de área y en especial a la Licda. María Concepción Odette Rauda Acevedo, por sus consejos y su accesibilidad a lo largo de este trabajo de graduación.

A mi madre Marina, mi hermana Martha, a mi padrino Presbítero Octavio Cruz y a mi familia por su sacrificio, su esfuerzo y apoyo incondicional durante mis estudios. Muchas gracias.

A mis amigos, Angel, Marjorie, María, Mayra, Roxana, Vinicio, Mario, Eder, Alfredo, Marina, Lucía, Liz, Samuel, Beatriz y Guadalupe por su amistad incondicional, por todas las alegrías, ayuda y cariño que me han brindado.

## **DEDICATORIA**

A mi madre y a mi hermana por todo su cariño, amor y apoyo que me han brindado siempre.

A mi familia por su apoyo incondicional y su comprensión.

A mi padrino Presbítero Octavio Cruz por el apoyo que me ha brindado cuando más lo he necesitado.

A mis amigos, Angel, Marjorie, María, Mayra, Roxana, Vinicio, Mario, Eder, Alfredo, Marina, Lucía, Liz, Samuel, Beatriz y Guadalupe, gracias por estar a mi lado durante todos estos años brindándome su amistad incondicional.

Luis Lemus.

## INDICE

	<b>Pág.</b>
Resumen	15
Capítulo I	
1.0 Introducción	xviii
Capítulo II	
2.0 Objetivos	
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	23
3.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	23
3.2 Resistencia a la meticilina de <i>S. aureus</i>	24
3.3 Antibióticos de uso actual para el tratamiento de infecciones de <i>S. aureus</i> resistente a la meticilina	27
3.4 <i>Rosmarinus officinalis</i> L.	28
3.4.1 Descripción taxonómica	28
3.4.2 Etnobotánica	30
3.4.3 Actividades biológicas	30
3.4.4 Metabolitos secundarios	33
3.4.5 Indicaciones y usos	34
3.4.6 Métodos reportados por el estudio de metabolitos del romero	35
3.4.7 Toxicidad	35
3.4.8 Preparaciones tradicionales del romero	36

3.5 Método de determinación de la concentración inhibitoria mínima: microdilución en caldo	37
--	----

## Capítulo IV

4.0 Diseño Metodológico	40
4.1 Tipo de estudio	40
4.2 Investigación bibliográfica	40
4.3 Investigación de campo	41
4.4 Parte experimental	41
4.4.1 Obtención del material vegetal	41
4.4.2 Identificación taxonómica y certificación del material vegetal	41
4.4.3 Obtención de los extractos	41
4.4.4 Prueba de solubilidad de los extractos	43
4.4.5 Medios de cultivo y reactivos a utilizar	43
4.4.6 Concentración inhibitoria mínima por el método de microdilución en caldo	43
4.4.6.1 Preparación de diluciones de los extractos de <i>Rosmarinus officinalis</i>	44
4.4.6.2 Preparación de la dilución de vancomicina	45
4.4.6.3 Obtención, mantenimiento y verificación de la identidad de cepas de trabajo	47
4.4.6.4 Preparación de cultivos de trabajo	51
4.4.6.5 Determinación de la concentración inhibitoria mínima por el método de microdilución en caldo	53
4.5 Análisis estadístico	56

Capítulo V	
5.0 Resultados y Discusión de Resultados	59
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	87
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	90
Bibliografía	
Glosario	
Anexos	



## INDICE DE ANEXOS

### ANEXO N°

1. Antibióticos actuales en el tratamiento de infecciones producidas por SARM.
2. Elaboración de extractos de romero.
3. Medios de cultivo y reactivos a utilizar.
4. Dilución de los extractos.
5. Primera dilución de vancomicina.
6. Segundo proceso de dilución de vancomicina.
7. Obtención de la cepa SARM.
8. Regeneración de cepas SARM y SASM.
9. Estandarización de cepas SARM y SASM.
10. Diluciones seriadas.
11. Primera prueba de microdilución en caldo.
12. Segunda prueba de microdilución en caldo.
13. Control de la concentración de suspensión de prueba.
14. Procedimiento de uso de lector ELISA.
15. Carta del proveedor.
16. Certificado provisto por el Jardín Botánico La Laguna
17. Elaboración de los extractos.
18. Proceso de evaporación de los extractos.
19. Método de tabulación de datos de absorbancia
20. Datos tabulados.
21. Ejemplos de microplacas luego de incubación.
22. Presentación de los resultados obtenidos.

## INDICE DE CUADROS

CUADRO N°		Pág.
1.	Variantes de cassette cromosómico estafilocócico <i>SCCmec</i> .	26
2.	Actividades biológicas estudiadas del romero.	31
3.	Métodos de extracción utilizados para el estudio de metabolitos del romero.	35
4.	Antibiograma y mecanismos de resistencia en <i>Staphylococcus</i> .	51
5.	Prueba de solubilidad de los extractos.	62
6.	Solubilidad de las soluciones stock de los extractos.	62

## INDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA N°</b>		<b>Pág.</b>
1.	Morfología de <i>S. aureus</i> .	23
2.	Factores de virulencia presentes en <i>S. aureus</i> .	24
3.	Estructura de vancomicina y teicoplanina y sus sustituyentes.	27
4.	<i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero).	29
5.	Metabolitos secundarios presentes en el romero.	34
6.	Gráfico de porcentaje de rendimiento obtenido en ambos extractos.	61
7.	Absorbancias de vancomicina obtenidas en placa HiSMHS.	63
8.	Gráfica de segundo análisis de vancomicina en placa VRMHS.	64
9.	Reanimación y pruebas de identidad de cepas de <i>S. aureus</i> .	66
10.	Absorbancias de controles positivos y negativos de cada microplaca	71
11.	Absorbancias obtenidas en ensayo CIM de los extractos.	75
12.	Absorbancias obtenidas en ensayo CIM de vancomicina.	76

## INDICE DE TABLAS

<b>TABLA N°</b>		<b>Pág.</b>
1.	CIM de romero frente a <i>S. aureus</i> .	32
2.	Diluciones de los extractos de romero.	44
3.	Primera dilución de vancomicina.	46
4.	Segunda dilución de vancomicina.	47
5.	Volumen de los extractos al día 11.	59
6.	Porcentaje de rendimiento de los extractos.	60
7.	Halos de inhibición obtenidos en prueba de antibiograma.	67
8.	Verificación del método de estandarización.	68
9.	Concentraciones inhibitorias mínimas de los extractos de romero.	69
10.	Concentraciones inhibitorias mínimas de la vancomicina.	72
11.	Análisis de la varianza para absorbancias de los extractos.	77
12.	Resultados de prueba LSD para absorbancias por extracto.	78
13.	Resultados de prueba LSD para absorbancias por microorganismos en extractos.	79
14.	Resultados de prueba LSD para absorbancias por medios de cultivo en extractos.	80
15.	Resultados de prueba LSD para absorbancias por concentración en extractos.	80
16.	Análisis de la varianza para absorbancias de vancomicina.	81
17.	Resultados de prueba LSD para absorbancias por microorganismo en vancomicina.	82
18.	Resultados de prueba LSD para absorbancias por concentración en vancomicina.	83

## ABREVIATURAS

ANOVA: Analysis of Variance, análisis de la varianza.

APROCSAL: Asociación de Promotores Comunales Salvadoreños.

ATCC: American Type Culture Collection, Colección de Cultivos de Tipo Americano.

CBM, CMB: concentración mínima bactericida.

CDC: Centro para el Control y Prevención de Enfermedades

CIM: concentración inhibitoria mínima.

DIF: difusión en disco.

DIL: dilución en agar.

*E. coli*: *Escherichia coli*.

*E. faecalis*: *Enterococcus faecalis*.

ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, especies de *Enterobacter*.

Fem: factor esencial para resistencia a la meticilina.

HSD: Health Science Department, Departamento de Ciencias de la Salud.

LSD: Least Significant Difference, mínima diferencia significativa.

MADIL: macrodilución en caldo.

MDIL: microdilución en caldo.

MH: Mueller Hinton.

MHS: Mueller Hinton Salino.

MMH: microplaca con caldo Mueller Hinton.

MMHS: microplaca con caldo Mueller Hinton Salino.

MMSCCRAMMS: microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules, componentes de superficie microbianos que reconocen las moléculas de matriz adhesiva.

*P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*.

PBP2a: proteína ligadora de penicilina con actividad transpeptidasa de baja afinidad por betalactámicos.

*R. officinalis* L.: *Rosmarinus officinalis* L.

*S. aureus*: *Staphylococcus aureus*.

SARM: *S. aureus* resistente a la meticilina.

SARM-AH, HA-MRSA: *S. aureus* resistente a la meticilina adquirido en el hospital.

SARM-AC, CA-MRSA: *S. aureus* resistente a la meticilina adquirido en la comunidad.

SASM: *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina.

SCCmec: cassette cromosómico estafilocócico.

VISA: Vancomycin-intermediate *S. aureus*, *S. aureus* con resistencia intermedia a la vancomicina.

VRSA: Vancomycin-resistant *S. aureus*, *S. aureus* con resistencia a la vancomicina.

## RESUMEN

El aumento de la presencia de cepas resistentes a los tratamientos quimioterápicos actuales, y por tanto, el aumento de la mortalidad por infecciones difíciles de tratar, hacen indispensable la búsqueda de moléculas bioactivas frente a cepas resistentes. Los metabolitos secundarios presentes en las plantas medicinales son un punto de partida para la exploración de nuevos fármacos.

En el presente trabajo se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico (90 %) e hidroalcohólico (70 %) de *Rosmarinus officinalis*, sobre dos cepas de *Staphylococcus aureus*, una cepa resistente a la meticilina proporcionada por el Laboratorio Nacional de Referencia y otra cepa sensible a la meticilina proporcionada por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador. El objetivo principal de este trabajo es establecer si dichos extractos presentan actividad antimicrobiana que permita considerarlos íntegramente o a uno de sus metabolitos secundarios para el tratamiento de infecciones producidas por cepas resistentes.

Las concentraciones inhibitorias mínimas de cada extracto y de vancomicina, el cual fue utilizado como fármaco de referencia, se obtuvieron en dos medios de cultivo, en caldo Mueller Hinton y en caldo Mueller Hinton Salino, con el objetivo de determinar si la presencia de cloruro de sodio es un factor que modifica la concentración a la cual se inhibe el microorganismo.

Los resultados muestran que el extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* presenta una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 1 mg/mL sobre la cepa *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, mientras que del extracto etanólico, la concentración requerida fue de 2 mg/mL.

En cuanto a la cepa *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina, el extracto hidroalcohólico mostró una concentración inhibitoria mínima de 2 mg/mL

independientemente del medio de cultivo utilizado. La diferencia entre medios de cultivo se observa solo en el extracto etanólico sobre esta cepa ya que para el medio Mueller Hinton se obtuvo una concentración inhibitoria mínima de 2 mg/mL y para el medio Mueller Hinton Salino, una concentración inhibitoria mínima de 4 mg/mL.

Las CIM de vancomicina necesarias para inhibir la cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina, fueron de 0.49 µg/mL para medio Mueller Hinton y de 0.98 µg/mL para medio Mueller Hinton Salino. Para la cepa *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina, la concentración obtenida fue de 0.98 µg/mL independientemente del medio de cultivo utilizado. Estos resultados indican que al menos una de las cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina presente en el país todavía es sensible a la vancomicina.

Esto se debe a que la vancomicina es un principio activo puro, por lo que presenta una mayor actividad antimicrobiana en comparación a la actividad presentada por ambos extractos, ya que dichos extractos poseen una variedad de metabolitos secundarios que pueden antagonizar o minimizar la actividad bactericida



**CAPITULO I**  
**INTRODUCCION**

## 1.0 INTRODUCCION

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es una de las bacterias más importantes a nivel clínico debido a la facilidad con la que puede provocar enfermedades y la habilidad que posee para adquirir resistencia a los antibióticos. Una de estas resistencias es hacia la meticilina. Dicho tipo de resistencia representa un serio problema de salud pública debido a que en las personas infectadas con este tipo de cepas, la probabilidad de muerte se incrementa en un 64% <sup>(48)</sup>. En algunas regiones de Latinoamérica, se han reportado casos en que las infecciones por *S. aureus* son resistentes a la meticilina hasta en un 90% <sup>(48)</sup>, lo que hace aún más significativa la búsqueda de nuevos metabolitos bioactivos frente a estos microorganismos resistentes.

La resistencia a la meticilina de *S. aureus* fue descrita por primera vez en Inglaterra en 1961. Desde que fue reportada, se ha dado un aumento de infecciones por esta cepa, la mayoría vinculados a instituciones de salud. A finales de la década de los 90s, se han conocido casos de infecciones por parte de esta cepa vinculada a la comunidad <sup>(5)</sup>.

En el presente trabajo, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) que exhiben los extractos etanólico (90 %) e hidroalcohólico (70 %) de las hojas de romero (*Rosmarinus officinalis* L.), obtenidos por maceración. Las determinaciones se llevaron a cabo utilizando una cepa de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) procedente del Laboratorio Nacional de Referencia y una cepa sensible a la meticilina (SASM).

Se verificaron tanto la identidad como las características de resistencia antimicrobiana de las cepas, para luego realizar la determinación de la concentración inhibitoria mínima de cada extracto, utilizando vancomicina como control positivo.

Se determinó la concentración inhibitoria mínima que presenta la vancomicina; con el objetivo de verificar la sensibilidad de las cepas de estudio frente a este antibiótico y utilizar los valores obtenidos como referencia al momento de comparar la CIM que presentan los extractos.

Estableciendo la capacidad antibacteriana de cada extracto, se puede considerar su posible potencial en la investigación de metabolitos secundarios bioactivos, y/o desarrollo de extractos derivados de productos naturales que presenten una alternativa frente a los tratamientos convencionales actualmente utilizados, o que puedan servir como complemento a las terapias actuales.

Los resultados de CIM de los extractos de romero muestran que el extracto hidroalcohólico necesita una concentración de 1 mg/mL para inhibir el crecimiento de la cepa resistente; mientras que el extracto etanólico, necesita una concentración de 2 mg/mL para ejercer su efecto antibacteriano sobre la cepa SARM. Estos resultados revelan que los extractos presentan un metabolito o una combinación de ellos que presentan potencial antibacteriano frente a cepas de *S. aureus*, ya sean sensibles o resistentes a la meticilina. Por tanto, se debe continuar con su investigación para conocer su espectro de acción, su toxicidad y su estandarización química, con la cual se conlleven a mejoras en los tratamientos para tratar infecciones causadas por cepas resistentes.

La investigación fue realizada en los laboratorios de Fitoquímica, Biotecnología y Microbiología del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), en los meses de mayo a agosto de 2015.

## **CAPITULO II**

### **OBJETIVOS**

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo General

Determinar la concentración inhibitoria mínima de extractos *Rosmarinus officinalis* L. (romero) sobre *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM).

### 2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Preparar los extractos alcohólico (90%) e hidroalcohólico (70%) de *Rosmarinus officinalis* por el método de maceración.
- 2.2.2 Determinar la resistencia a la meticilina de la cepa aislada en Hospital Nacional de Niños Benjamín Bloom y de la cepa control, por medio del método de antibiograma con cefoxitina.
- 2.2.3 Determinar la concentración inhibitoria mínima de los extractos alcohólico e hidroalcohólicos de *R. officinalis* y de la vancomicina por medio del método de microdilución en caldo frente a una cepa de *S. aureus* resistente a la meticilina (SARM) y una cepa sensible a la meticilina (SASM).
- 2.2.4 Comparar la capacidad inhibitoria de los extractos elaborados y de la vancomicina sobre *S. aureus* resistente a la meticilina y *S. aureus* sensible a la meticilina por el método estadístico ANOVA.
- 2.2.5 Interpretar las diferencias de concentraciones inhibitorias mínimas obtenidas entre las cepas resistente a la meticilina y sensible a la meticilina utilizando el método estadístico LSD.
- 2.2.6 Presentar los resultados obtenidos a la Asociación de Promotores Comunales Salvadoreños (APROCSAL) y al Laboratorio Nacional de Referencia del Ministerio de Salud.

## **CAPITULO III**

### **MARCO TEORICO**

### 3.0 MARCO TEORICO

#### 3.1 *Staphylococcus aureus*

*S. aureus*, o también llamado estafilococo dorado, son bacterias grampositivas, pigmentadas, anaerobias facultativas que fermentan carbohidratos y están dispuestos generalmente en racimos irregulares en forma de uva, características que se observan en la figura N°1. Los cocos jóvenes son grampositivos, mientras van envejeciendo tienden a convertirse en gramnegativos, no son móviles y no forman esporas <sup>(15)</sup>.

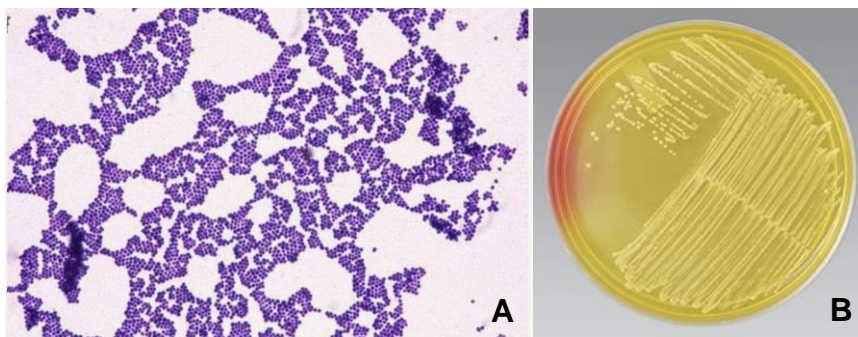


Figura N°1. Morfología de *S. aureus*. (A) Tinción de Gram <sup>(56)</sup>, (B) colonias en agar Manitol Sal <sup>(79)</sup>.

*S. aureus* posee una gran variedad de factores de patogenicidad que pueden ser agrupados de la siguiente manera: los que pertenecen a la estructura de la pared celular (peptidoglucano y ácidos teicoicos), proteínas (MSCRAMMS, proteína A), enzimas (catalasa, coagulasa, hialuronidasa, estafilocinasas, proteasas, lipasas, lactamasa  $\beta$ ), exotoxinas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , y  $\delta$ ), citotoxinas (leucocidina de Pantón Valentine), toxinas exfoliativas (toxina A y B), Toxina del Síndrome del Choque Tóxico (TSST-1) y enterotoxinas (A-E, G-J, K-R, U y V) <sup>(15, 22)</sup>. Dichos factores de patogenicidad o de virulencia están representados en la figura N°2.

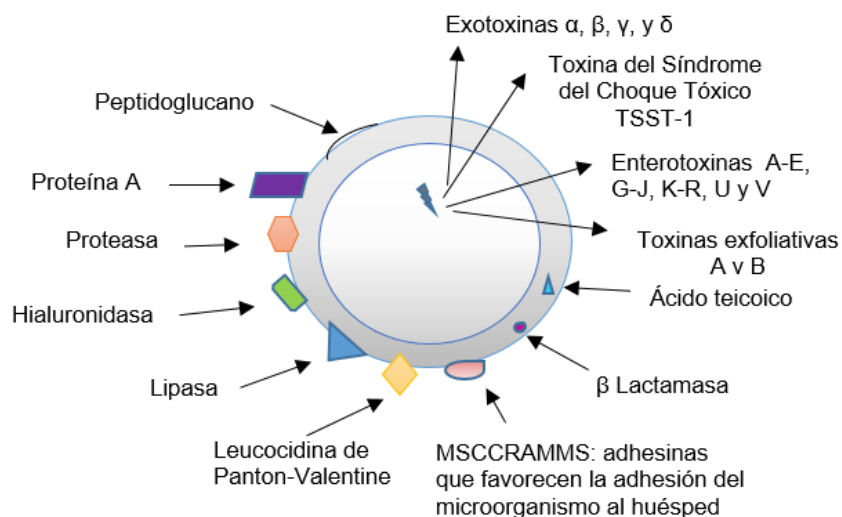


Figura N°2. Factores de virulencia presentes en *S. aureus* <sup>(15)</sup>.

Según la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA, por sus siglas en inglés), *S. aureus* es uno de los 6 patógenos de mayor importancia en la práctica médica diaria <sup>(5)</sup>. Junto con *E. coli*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa*, está considerada una de las causas principales de infecciones hospitalarias <sup>(85)</sup>.

### 3.2 Resistencia a la meticilina de *S. aureus*

Las infecciones producidas por SARM presentan un serio impacto en la salud del paciente debido a que aumentan ciertos factores de riesgo como “la mortalidad por distintas causas, mortalidad atribuida a bacterias, mortalidad en la unidad de cuidados intensivos, aumento de la duración en estancia hospitalaria post-infección, aumento de la duración de la estancia en la unidad de cuidados intensivos, choque séptico y el aumento de la bacteriemia” <sup>(64)</sup>. A ello se debe sumar el uso de antibióticos de segunda línea que resultan ser más caros y con mayores efectos secundarios sobre la salud de paciente. El uso de antibióticos de segunda línea no solo presenta la desventaja de mayores efectos secundarios



sobre el paciente, sino además la posibilidad de conducir a generar resistencia a *S. aureus* y otras bacterias <sup>(88)</sup>.

Hay ciertos tipos de pacientes que presentan un mayor riesgo de infección por parte de esta cepa, y por tanto, un mayor riesgo de mortalidad. Dichos pacientes con mayor riesgo son los que presentan las siguientes enfermedades: “enfermedad pulmonar crónica, influenza, leucemia, tumores malignos, pacientes que han sido sometidos a un trasplante de órganos, prótesis o dispositivos implantados, quemaduras, trastornos crónicos de la piel, diabetes, catéteres urinarios, personas sometidas a diálisis renal, personas inmunosuprimidas por el uso de la radiación o corticosteroides, personas con VIH/SIDA, recién nacidos y madres en lactancia” <sup>(25)</sup>.

La resistencia de *S. aureus* a la meticilina es bastante conocida. El primer aislamiento de esta cepa se produjo en 1961 en Inglaterra, considerándolo un patógeno asociado a las instituciones hospitalarias. En 1993, en Japón, se aisló una cepa de *S. aureus* con resistencia intermedia a la vancomicina (VISA por sus siglas en inglés). La resistencia total hacia la vancomicina (SARV) se reportó en 2002 en Estados Unidos <sup>(5)</sup>.

Las infecciones con cepas de *S. aureus* con resistencia a la meticilina habían quedado reducidas a ser adquiridas en las instituciones hospitalarias (SARM-AH, HA-MRSA en inglés); pero a finales de los años 90s se comenzó a adquirir dicha cepa fuera de las instituciones hospitalarias, por lo que se le denominó *S. aureus* resistente a la meticilina adquirida en la comunidad (SARM-AC, CA-MRSA en inglés). Esta cepa posee susceptibilidad antimicrobiana diferente a la cepa que es adquirida en instituciones hospitalarias. Esta última cepa genera preocupación debido a que no se conoce exactamente su origen; se considera que su aparición se debe a la asociación de dos genotipos: el genotipo resistente

de *S. epidermidis* y el genotipo de una cepa de *S. aureus* meticilina-sensible más virulento <sup>(5)</sup>.

La resistencia a meticilina de *S. aureus* comprende un mecanismo bien definido por el gen *mecA* <sup>(50, 59)</sup>. Dicho gen evita que el anillo betalactámico se una a las enzimas que ayudan a formar la pared celular de la bacteria (transpeptidasas), y por lo tanto, la bacteria es capaz de replicarse de forma normal. El gen codifica la proteína PBP2a (unión de penicilina proteína 2<sup>a</sup>), la cual tiene una baja afinidad por los antibióticos beta-lactámicos como la meticilina y la penicilina por lo que evita la inhibición de la síntesis de la pared celular por estas sustancias <sup>(59)</sup>. Esta proteína es transportada por un elemento genético móvil llamado cassette cromosómico estafilocócico (SCCmec) <sup>(50, 59)</sup>. En el cuadro N°1 se muestran las variantes del SCCmec y la cepa en la cual se han encontrado.

Cuadro N°1 .Variantes del cassette cromosómico estafilocócico SCCmec <sup>(5, 50)</sup>

Variante	Cepa en la que se encuentra	Acción y/o efecto
I	SARM adquirido en hospital	Presenta la resistencia a la meticilina
II		Presenta resistencia a múltiples antibióticos diferentes a los $\beta$ -lactámicos y a metales pesados
III		
VIII		
IV	SARM adquirido en la comunidad	Más pequeños y móviles lo que facilita la diseminación de la cepa. Presentan la resistencia a la meticilina
V		
VI		No se ha encontrado la acción y/o efecto que provocan estas variantes.
VII		

Se entiende que una cepa de SARM es resistente a todos los betalactámicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémicos). Al ser SARM-AH genéticamente multiresistente, los antibióticos indicados son los

glucopéptidos (vancomicina y teicoplanina) para tratamiento terapéutico <sup>(5)</sup>. Las estructuras de la vancomicina y teicoplanina se muestran en la figura N°3.

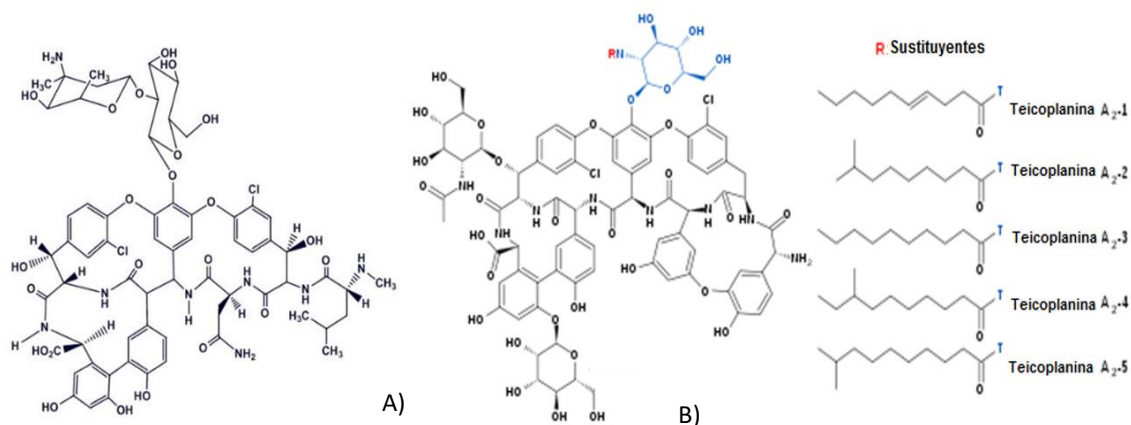


Figura N°3: Estructuras de A) Vancomicina <sup>(49)</sup> y B) Teicoplanina <sup>(78)</sup> y sus sustituyentes.

No todas las cepas de SARM que poseen el gen *mecA* poseen resistencia a la meticilina ya que la resistencia viene dada por la eficiencia de la producción de PBP2a que se halla modulada por factores cromosómicos. Se debe tomar en cuenta también que el papel que juegan las enzimas Fem (factor esencial para la resistencia a la meticilina) puede ser crítico en la resistencia homogénea a la oxacilina. Por ello una disminución de los Fem conlleva a una reducción de la resistencia a la meticilina <sup>(59)</sup>.

### 3.3 Antibióticos de uso actual para el tratamiento de infecciones de *S. aureus* resistente a la meticilina

En la actualidad se han indicado 13 antibióticos para el tratamiento de infecciones por SARM. Los antibióticos efectivos utilizados como terapia contra infecciones producidas por SARM son: penicilina, clindamicina, clotrimoxazol, daptomicina, fosfomicina, linezolid, rifampicina, teicoplanina, doxiciclina, minociclina, tigeciclina, vancomicina y gentamicina <sup>(59)</sup>. En el Anexo N°1 se describen las

características más importantes de cada grupo de antibióticos utilizados para el tratamiento de SARM.

El tratamiento actual para tratar infecciones de *S. aureus* resistente a la metilina (SARM) comprende distintos fármacos que se utilizan dependiendo del área en donde se localiza la infección; además se considera la concentración inhibitoria mínima (CIM) que presenta el antibiótico elegido ante la cepa. En los casos en que la infección sea grave, la recomendación es elegir una terapia que incluya dos o más fármacos frente a una monoterapia, con el objetivo de obtener una eficacia clínica mayor y así evitar que la cepa desarrolle resistencia a los antibióticos con la que se trata la infección <sup>(59)</sup>.

### **3.4 *Rosmarinus officinalis* L.**

#### **3.4.1 Descripción taxonómica**

*R. officinalis* se clasifica de la siguiente manera <sup>(38)</sup>:

- Reino: *Plantae*
- Filo: *Magnoliophyta*
- Clase: *Magnoliopsida*
- Orden: *Lamiales*
- Familia: *Lamiaceae*
- Género: *Rosmarinus*
- Especie: *officinalis*
- Nombre científico: *Rosmarinus officinalis* L.

Hojas, Tallo y Raíz: “la planta es un subarbusto ramificado de hojas perennes, de 50 a 150 cm de alto, de ramas erguidas, escaladas u ocasionalmente decumbentes. Las hojas son perennes lineales, coriáceas, marginales, verde claro y un tanto rugosas. Son tomentosas, de 15 a 40 mm por 12 a 3,5 mm” <sup>(57)</sup>. Ver figura N°4.

Flores y Frutas: “las flores labiadas crecen en inflorescencias, en la parte superior de las ramas. El cáliz es de 3 a 4 mm., verde o rojizo, inicialmente tomentoso, luego 5 a 7 mm y glabro. La venación es conspicua. La corola es de 10 a 12 mm de largo, azulado, ocasionalmente rosado o blanco. La nuez es café” <sup>(57)</sup>. Ver figura N°4.

Partes medicinales: “las partes medicinales son el aceite extraído a partir de las hojas y el tallo frondoso, la floración, puntas de las ramas secas, hojas secas, hojas frescas, las partes aéreas frescas recolectadas durante la floración y las ramas floridas” <sup>(57)</sup>. Ver figura N°4.



Figura N°4. *Rosmarinus officinalis* (Romero) <sup>(72)</sup>. (A) Arbusto, (B) flor, (C) características morfológicas del romero.

### 3.4.2 Etnobotánica

Los usos etnobotánicos del romero en la medicina popular son diversos; entre ellos se mencionan: antiespasmódico en el cólico renal y en la dismenorrea <sup>(1, 3, 37)</sup>, como tónico <sup>(3)</sup>, analgésico <sup>(3)</sup>, colagogo <sup>(3)</sup>, antirreumático <sup>(1, 3)</sup>, carminativo <sup>(3)</sup>, diurético <sup>(3, 37)</sup>, expectorante <sup>(3)</sup>, antiepiléptico <sup>(3)</sup>, astringente <sup>(26)</sup>, anti-envejecimiento <sup>(1)</sup> y mejora la digestión <sup>(1, 37)</sup>. Es utilizado como alivio en trastornos respiratorios, cálculos renales, hipertensión y dolor de estómago <sup>(1, 37)</sup>. Como estimulante para el crecimiento del cabello, la circulación y del sistema nervioso <sup>(1)</sup>.

Otros usos del romero son: en el alivio de las enfermedades del corazón <sup>(1)</sup>; como insecticida y herbicida <sup>(3)</sup>; promueve el flujo menstrual <sup>(3)</sup> y como abortivo <sup>(26)</sup>. Se utiliza para mejorar la función mental y la memoria <sup>(26)</sup>. La maceración en etanol es utilizada en México para aliviar el dolor reumático <sup>(37)</sup>.

### 3.4.3 Actividades biológicas

Las actividades biológicas del romero han sido ampliamente estudiadas. En el cuadro N°2 se describen dichas actividades y el tipo de análisis (*in vitro* o *in vivo*) mediante el cual se han estudiado.

Cuadro N°2. Actividades biológicas estudiadas del romero.

<b>Actividades biológicas</b>	<b>Tipo de análisis</b>	<b>Referencias</b>
<b>Antiinflamatorio</b>	<i>in vivo</i>	(4, 11, 58, 70)
	<i>in vitro</i>	(48, 93)
<b>Actividad neurofarmacológica</b>	<i>in vivo</i>	(66)
<b>Antidepresivo</b>	<i>in vivo</i>	(52, 54)
<b>Antiulcerogénico</b>	<i>in vivo</i>	(69)
<b>Antibacteriano, insecticida, antifúngico, citotóxico</b>	<i>in vitro</i>	(6, 18, 45, 68, 91, 94)
<b>Acaricida</b>	<i>in vitro</i>	(91)
<b>Antioxidante</b>	<i>in vitro</i>	(11, 12, 31, 46, 73, 92, 93)
<b>Antiproliferador de tumores, anticancerígeno, quimiopreventivo</b>	<i>in vivo</i>	(11, 41, 46, 77, 90)
<b>Inhibidor de diacilglicerol acetiltransferasa</b>	<i>in vitro</i>	(24)
<b>Antinociceptivo</b>	<i>in vivo</i>	(37)
<b>Antiespasmódico</b>	<i>in vivo</i>	(93)
<b>Antidiabético</b>	<i>in vivo</i>	(1, 11)
<b>Antihiperactivo, anti-déficit de memoria, regulador de glucosa y acetilcolinesterasa</b>	<i>in vivo</i>	(53)
<b>Antihipotensivo</b>	<i>in vivo</i>	(29)
<b>Gastroprotector</b>	<i>in vitro</i>	(67)
<b>Regulador de glucosa y lípidos</b>	<i>in vitro</i>	(91)

En la tabla N°1, se presentan distintos resultados de concentración inhibitoria mínima de romero. Se pueden observar los distintos métodos para determinar la CIM y sus valores entre los que se encuentran la dilución en disco, microdilución en caldo, y macrodilución en caldo, principalmente. Además varían las cepas utilizadas en los análisis y el tipo de extracto. Los datos muestran que se obtienen diferentes datos de CIM dependiendo del método de análisis. Vale resaltar que en el artículo elaborado por el Klancnik y colaboradores, 2009 <sup>(45)</sup>, se obtuvo una CIM mayor mediante el método de difusión en disco (DIF) en comparación a la obtenida por los otros tres métodos utilizados. En el artículo de Castaño y

colaboradores, 2010<sup>(18)</sup>, la diferencia en los valores de CIM obtenidos reside en el tipo de extracto de romero utilizado, obteniéndose que el aceite esencial ejerce una mayor actividad bactericida que el ejercido por el extracto etanólico, el cual, no presentó actividad bactericida. Por último, para determinar cómo afecta la cepa utilizada, Pesavento y colaboradores, 2015<sup>(68)</sup>, en su artículo presentó la CIM<sub>90</sub> y CIM<sub>100</sub> para dos cepas de colecciones de cultivo diferentes, una cepa es de la Colección de Cultivos de Tipo Americano (ATCC, por su siglas en inglés) y otra del Departamento de Ciencias de la Salud (HSD, por su siglas en inglés); la diferencia se obtiene sobre todo en los valores presentados a una CIM<sub>100</sub>, ya que la cepa HSD necesita una menor concentración respecto a la cepa ATCC.

Tabla N°1. CIM de romero frente a cepas de *S. aureus*

Artículo	Tipo de cepa	Tipo de extracto	CIM y método utilizado		
<b>In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of Commercial Rosemary Extract Formulations.</b> <sup>(45)</sup>	ATCC 25923	Solubles en agua	DIF <sup>1</sup>	20.0 mg/mL	
			DIL <sup>1</sup>	5.0 mg/mL	
			MDIL <sup>1</sup>		
			MADIL <sup>1</sup>		
		Solubles en aceite	DIF <sup>1</sup>	0.625 mg/mL	
			DIL <sup>1</sup>	0.156 mg/mL	
			MDIL <sup>1</sup>		
			MADIL <sup>1</sup>		
<b>Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de <i>Rosmarinus officinalis L.</i> sobre algunas bacterias de interés alimentario.</b> <sup>(18)</sup>	ATCC 6538	Etanólico	microdilución en caldo <sup>2</sup>		
		Aceite esencial	1,024 mg/mL microdilución en caldo		
<b>Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oil against <i>Staphylococcus aureus</i> and <i>Listeria monocytogenes</i> in beef meatballs.</b> <sup>(68)</sup>	ATCC 25923 HSD 3623	Aceite esencial	Dilución en caldo		
			ATCC	CIM <sub>100</sub> 5µL/mL	
				CIM <sub>90</sub> 1µL/mL	
			HSD	CIM <sub>100</sub> 2µL/mL	
CIM <sub>90</sub> 1µL/mL					

1. DIF: difusión en disco; DIL: dilución en disco; MDIL: microdilución en caldo; MADIL: macrodilución en caldo

2. No presentó inhibición.



### 3.4.4 Metabolitos secundarios

El aceite esencial de romero se encuentra en una proporción de 1-2% en las muestra frescas y contiene 0.8-6% de ésteres y 8-20% de alcoholes <sup>(28)</sup>. Los principales compuestos son: 1,8-cineol (12.3%) <sup>(3, 28)</sup>, borneol (4.0%) <sup>(3, 28, 76)</sup>, linalol (1.91%) <sup>(28)</sup>, acetato de bornilo (14.8%) <sup>(28)</sup>, alcanfor (6.73%) <sup>(78)</sup>,  $\alpha$ -pineno (33.3%) <sup>(3)</sup>, canfeno (13.8%) <sup>(3)</sup>, limoneno (4.15%) <sup>(76)</sup>, 2-hexen-1-ol (7.67%) <sup>(76)</sup>, triciclono (0.60%) <sup>(76)</sup>,  $\alpha$ -tujeno (0.72%) <sup>(76)</sup>. Las hojas de romero también contienen los alcoholes triterpénicos  $\alpha$ -amirina y  $\beta$ -amirina, ácido rosmarínico, patulina y  $\beta$ -sitosterol <sup>(28)</sup>.

Los marcadores químicos del romero son: ácido rosmarínico <sup>(28)</sup>, rosmanol <sup>(62)</sup>, ácido carnósico <sup>(3, 62)</sup> y carnosol <sup>(3, 62)</sup>. Aparte de dichos metabolitos, el romero también produce los siguientes compuestos: ácido caféico <sup>(3, 57)</sup>, ácido clorogénico <sup>(3)</sup>, rosmaridifenol <sup>(3, 57)</sup>, rosmariquinona <sup>(3, 57)</sup>, ácido ursólico <sup>(57)</sup>, rosmaricina <sup>(3, 62)</sup>, epirosmanol <sup>(62)</sup>, cryptotanshinona <sup>(62)</sup>, isorosmanol <sup>(57)</sup>, rosmadial <sup>(57)</sup>, cirsimarina <sup>(57)</sup>, diosmina <sup>(57)</sup>, hesperidina <sup>(57)</sup>, homoplantiginina <sup>(57)</sup>, fegopolina <sup>(57)</sup>, ácido oleanólico <sup>(57)</sup> y ésteres 3-acetilo <sup>(57)</sup>. Algunas de las estructuras de estos compuestos se muestran en la figura N°5.

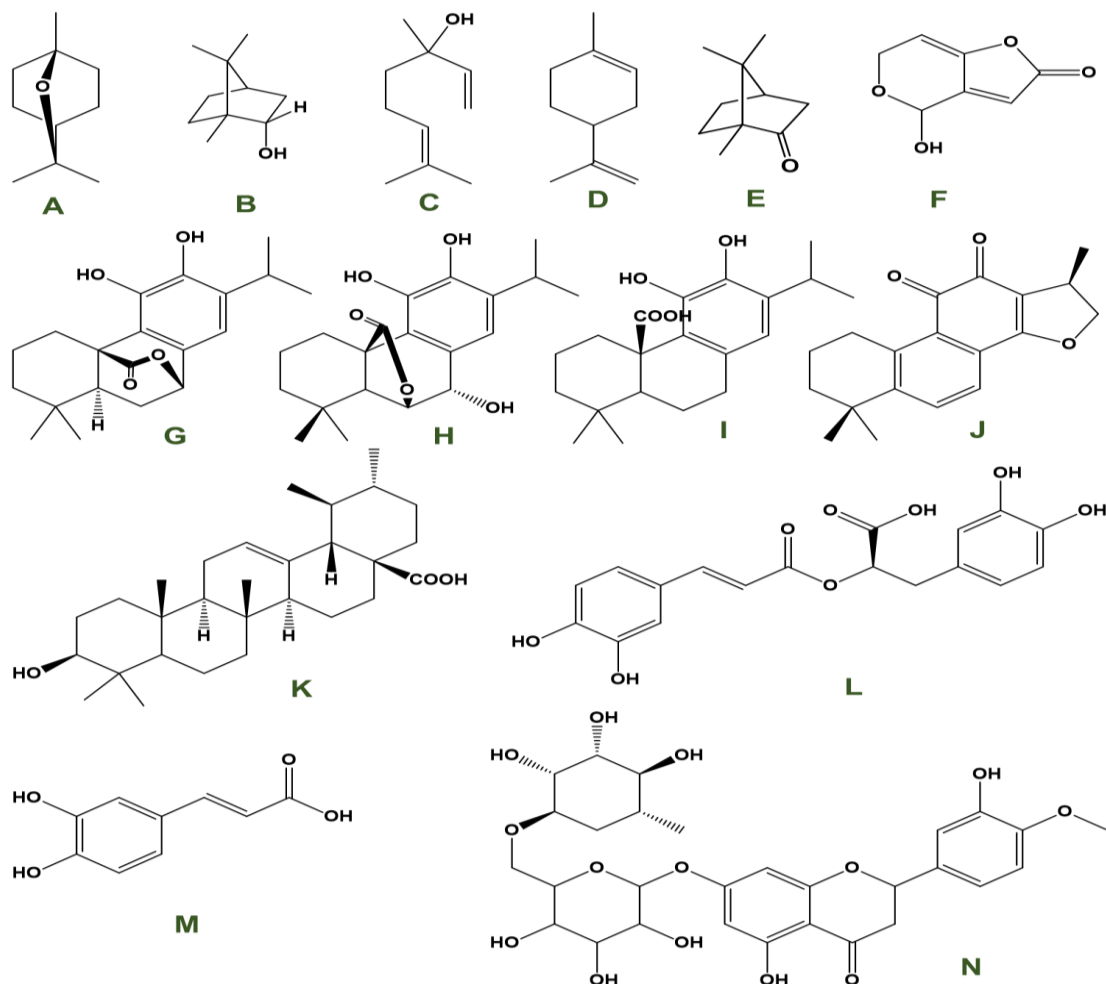


Figura N°5: Metabolitos secundarios presentes en el romero: A) 1,8-cineol (eucalyptol), B) borneol, C) linalol, D) limoneno, E) alcanfor, F) patulina, G) carnosol, H) rosmanol, I) ácido carnósico, J) cryptotanshinona, K) ácido ursólico, L) ácido rosmarínico, M) ácido caféico, N) hesperidina.

### 3.4.5 Indicaciones y usos

Los usos aprobados por la Comisión E (Comisión de Alemania encargada de elaborar una guía terapéutica de plantas medicinales) incluyen: para problemas de presión sanguínea, quejas dispépticas, pérdida de apetito y reumatismo.

También señala otros usos no aprobados tales como: para síntomas digestivos, dolores de cabeza y migraña, dismenorrea, amenorrea y oligomenorrea, mareos y mala memoria, como cataplasma en heridas de difícil cicatrización, para eczemas y como analgésico en lesiones de boca y garganta <sup>(57)</sup>.

### 3.4.6 Métodos reportados para el estudio de los metabolitos del romero

Para el estudio de las actividades biológicas que presentan los metabolitos del romero, se han utilizado diferentes métodos y solventes de extracción, como los que se presentan en el cuadro N°3.

Cuadro N°3. Métodos de extracción utilizados para el estudio de metabolitos de romero.

<b>Método de extracción</b>	<b>Solvente utilizado</b>	<b>Referencias</b>
<b>Percolación</b>	Etanol 50%	(66)
<b>Maceración</b>	Metanol 80%	(92)
	Etanol 70%	(77)
	Diclorometano:metanol (1:1)	(81)
	Hexano y etanol	(37, 83)
	Etanol 96%	(11,24, 52, 53, 54)
<b>Hidrodestilación</b>	Agua	(6, 73, 92, 94)
<b>Soxhlet</b>	Agua, metanol	(91)
	Hexano y acetato de etilo	(46)
	Etanol 95%	(11)
	Etanol 100%	(69)
<b>Destilación por vapor</b>	Agua	(1, 31)
<b>Sonicado</b>	Metanol	(44)

### 3.4.7 Toxicidad

En general, el uso de romero no presenta riesgos para la salud del paciente. No obstante, se deben de tomar en cuenta las siguientes contraindicaciones <sup>(9)</sup>:

- En las mujeres embarazadas puede ser abortivo.

- En personas alérgicas al alcanfor.
- En dosis altas tiende a ser mutagénico y genotóxico (demostrado en análisis *in vivo*).
- Se recomienda no utilizar el aceite de romero en pacientes con: gastritis aguda, úlcera gastroduodenal, hepatopatías, epilepsia y Parkinson.

Las sobredosis de romero pueden provocar coma, espasmos, vómitos, gastroenteritis, sangrado uterino, irritación en los riñones e incluso la muerte <sup>(57)</sup>.

### **3.4.8 Preparaciones tradicionales del romero**

A continuación se describen formas de preparación tradicionales de romero y las dosis diarias para cada una de las preparaciones <sup>(57)</sup>:

- Infusión: verter hirviendo agua sobre 2 gramos de droga finamente cortada y colar después de 15 minutos (1 cucharadita corresponde aproximadamente a 2 gramos de droga). Dosis diaria: una taza varias veces al día.
- Vino de romero: agregar 20 gramos de droga en un 1 litro de vino, dejar reposar por 5 días, agitar ocasionalmente.
- Tintura: 1:5 con etanol al 70% (V/V). Dosis única: 20 a 50 gotas.
- Extracto líquido: 1:1 con etanol al 45% (V/V). Dosis única: 2 a 4 mL.
- Externamente: formas semisólida y líquida con 6 a 10% de aceite esencial.
- Aditivo de baño: 50 gramos de droga a 1 litro de agua caliente.
- Lavados: usando 1% de infusión.

### **3.5 Método de determinación de la concentración inhibitoria mínima: Microdilución en caldo**

La concentración inhibitoria mínima (CIM) puede ser definida como “la concentración más baja de droga que previene el crecimiento visible de microorganismos luego de entre 18 y 24 horas de cultivo” <sup>(27)</sup>, es decir, si un antibiótico posee una concentración mayor que la CIM de un microorganismo, este antibiótico será capaz de inhibir el desarrollo de la bacteria <sup>(27)</sup>.

La concentración inhibitoria mínima es, junto con concentración máxima alcanzada ( $C_{max}$ ) y el área bajo la curva (ABC), uno de los tres parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos determinantes a la hora de escoger un antibiótico y su posología. Esto se debe a que existen antibióticos que dependen de la concentración, del tiempo y de la vía de administración <sup>(17)</sup>.

El método de microdilución en caldo se utiliza para determinar la CIM de una sustancia frente a un microorganismo. Consiste en agregar volúmenes de diferentes concentraciones de la sustancia a analizar en 96 pocillos de plástico estéril con fondo en forma de U. El medio de cultivo a utilizar en este método es el caldo Mueller Hinton (MH) <sup>(42)</sup>.

Con esta técnica se pueden determinar dos valores: concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida mínima. Hay que tomar en cuenta que el volumen total que debe haber en el pocillo es de 0.1 mL contando caldo de cultivo, sustancia a analizar e inóculo <sup>(40)</sup>.

En el análisis se debe llevar un control positivo y uno negativo. El control positivo estará compuesto de caldo más inóculo, mientras que el control negativo estará compuesto de caldo más sustancia a analizar. La placa luego de ser llenada, se incuba generalmente a 35°C/18-24 horas. Ésta debe estar cubierta, ya sea con la tapa de la placa o con plástico que sea adhesivo y permeable al oxígeno <sup>(40)</sup>.

Para determinar la CIM, se observa el pocillo con la menor concentración que no muestra crecimiento microbiano, esto se hace comparándolo con el control positivo; y para obtener la CMB se inoculan 10  $\mu\text{L}$  de los pocillos en los que no se muestra crecimiento, luego se cuentan las colonias que crecen y se comparan con el conteo del inóculo bacteriano inicial. La CMB es generalmente dos diluciones mayores que la CIM <sup>(40)</sup>.

**CAPITULO IV**  
**DISEÑO METODOLOGICO**

## 4.0 DISEÑO METODOLOGICO

### 4.1 Tipo de estudio

Exploratorio: debido a que se evaluó en qué tipo de extracto de romero se obtiene una mejor actividad bactericida sobre cepas sensibles y resistentes de *S. aureus*. Estos resultados permitirán guiar futuros estudios en el desarrollo de extractos para el tratamiento de infecciones por dichas cepas.

Experimental: Se realizaron ensayos microbiológicos para determinar la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico e hidroalcohólico de romero sobre dos cepas de *S. aureus*, una sensible y otra resistente a meticilina, comparando con vancomicina como antibiótico de referencia.

Prospectivo: debido a que los resultados de dicho estudio puede servir de referencia para estudios posteriores.

### 4.2 Investigación bibliográfica

La investigación bibliográfica se realizó en:

- Biblioteca Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Recursos On-line de la Biblioteca Central de la Universidad de El Salvador.
- Biblioteca Central Hugo Lindo, Universidad José Matías Delgado.
- Biblioteca Virtual de la Universidad Wisconsin-Madison, Estados Unidos.
- Biblioteca de la Universidad Salvadoreña Alberto Masferrer (USAM).
- Internet.



### **4.3 Investigación de campo**

La investigación de campo se llevó a cabo en el Jardín Botánico La Laguna. Se llevó una muestra fresca de romero para su identificación y certificación taxonómica. Además, se obtuvo por parte del Laboratorio Nacional de Referencia, la cepa SARM utilizada en la investigación.

### **4.4 Parte experimental**

#### **4.4.1 Obtención del material vegetal**

Las muestras fueron obtenidas a través de la Asociación de Promotores Comunales Salvadoreños (APROCSAL), a partir del proveedor Herboristería “Delicia Natural”. Las muestras fueron trasladadas desde Quezaltenango, Guatemala hacia El Salvador. El proveedor presentó una carta firmada y sellada haciendo constar que las muestras provienen de Guatemala (ver anexo N°15). El material vegetal se recibió en estado seco, producto de un proceso de secado a una temperatura de 40°C por 48 horas.

#### **4.4.2 Identificación taxonómica y certificación del material vegetal**

El material vegetal fue identificado y posteriormente certificado a través del Jardín Botánico La Laguna, que extendió un certificado haciendo constar que el material vegetal corresponde y ha sido identificado como *R. officinalis* L. (ver anexo N°16)

#### **4.4.3 Obtención de los extractos** (93)

Los extractos fueron obtenidos por el método de maceración. Para preparar el extracto etanólico de romero (ver anexo N°2), se utilizó como solvente etanol al 90% y el procedimiento realizado fue el siguiente:

1. Pesar 908.0 g de hojas secas de romero.

2. Colocarlas en un recipiente de acero inoxidable denominado "EtOH-romero".
3. Medir 6.0 L de etanol al 90% v/v.
4. Colocar el etanol en el recipiente EtOH-romero.
5. Dejar en reposo durante 18 días a temperatura ambiente protegido de la luz.
6. Posterior al tiempo de reposo, filtrar el extracto.
7. Evaporar el extracto utilizando un rotavapor a una temperatura no mayor de 60°C hasta sequedad o volumen reducido, durante 38 horas.
8. Secar completamente los extractos en una estufa durante dos semanas a una temperatura de no mayor de 60°C.
9. Triturar el extracto.
10. Pesar y calcular el porcentaje de rendimiento.
11. Colocar en desecador a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

Para preparar el extracto hidroalcohólico de romero (ver anexo N°1), se utilizó una mezcla de agua:etanol en proporciones de 1:2, por lo que la concentración final del etanol fue de 70% v/v. El procedimiento realizado fue el siguiente:

1. Pesar 908.0 g de hojas secas de romero.
2. Colocarlas en un recipiente de acero inoxidable denominado "Hidro-EtOH-romero".
3. Medir 2.0 L de agua destilada.
4. Colocar el agua en el recipiente Hidro-EtOH-romero
5. Medir 4.0 L de etanol al 90% v/v.
6. Colocar el etanol en el recipiente Hidro-EtOH-romero.
7. Dejar en reposo durante 18 días a temperatura ambiente protegido de la luz.
8. Posterior al tiempo de reposo, filtrar el extracto.
9. Evaporar el extracto utilizando un rotavapor a una temperatura no mayor de 60°C hasta sequedad o volumen reducido, durante 38 horas. Utilizar alcohol isoamílico como antiespumante.

10. Secar completamente los extractos en una estufa durante dos semanas a una temperatura no mayor de 60°C.
11. Triturar el extracto.
12. Pesar y calcular el porcentaje de rendimiento.
13. Colocar en desecador a temperatura ambiente hasta su posterior uso.

#### **4.4.4 Prueba de solubilidad de los extractos**

Se verificó la solubilidad de los extractos aplicando el siguiente procedimiento:

1. Pesar 0.64 g de extracto etanólico e hidroalcohólico en un beaker de 50 mL respectivamente. Elaborar por duplicado.
2. Agregar 1 mL de caldo MH o MHS y disolver.
3. Comprobar que el extracto se haya disuelto completamente.
4. En caso de no haber disolución completa, disminuir la cantidad de extracto a diluir en 1 mL de caldo MH o MHS, comprobando a 0.32 g, 0.16 g y 0.08 g de ambos extractos.

#### **4.4.5 Medios de cultivo y reactivos a utilizar**

La preparación y composición de los medios de cultivo y reactivos a utilizar, se describen en el anexo N°3.

#### **4.4.6 Concentración inhibitoria mínima por el método de microdilución en caldo**

Para el ensayo de CIM, se realizaron diluciones de los extractos y de vancomicina cercanas a las CIM descritas en la literatura <sup>(59, 86)</sup>; luego se evaluó su acción mediante el método de microdilución en caldo, frente a microorganismos estandarizados a una densidad de  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

#### 4.4.6.1 Preparación de diluciones de los extractos de *R. officinalis* <sup>(87)</sup>

Los extractos alcohólico e hidroalcohólico se evaluaron a las siguientes concentraciones 64 mg/mL, 32 mg/mL, 16 mg/mL, 8 mg/mL, 4 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL y 0.125 mg/mL. En el proceso de microdilución, la concentración de los extractos disminuye al ser agregada en los pocillos, por lo que se deben elaborar a una concentración doble para obtener la concentración deseada. El proceso fue el siguiente: (ver anexo N°4):

1. Preparar una solución stock de 640 mg/mL pesando 6.4 g de extracto y disolverlo en 10 mL de caldo MH + 0.5% v/v de dimetilsulfóxido (DMSO).
2. Agitar durante 20 minutos.
3. Filtrar en papel filtro en flujo laminar y realizar una segunda filtración en filtro para jeringa con poro de diámetro de 0.45 µm.
4. Para obtener las distintas concentraciones a analizar, se realizó una serie de diluciones teniendo en cuenta el siguiente cuadro:

Tabla N°2. Diluciones de los extractos de *R. officinalis*.

Soln	[ ] del extracto (mg/mL)	Fuente	Volumen de solución de extracto (mL)	Volumen de caldo estéril (mL)	[ ] obtenida de extracto (mg/mL)	[ ] final de extracto final en prueba (mg/mL)
1	640	Stock	2	8	128	64
2	128	Soln 1	1	1	64	32
3	128	Soln 1	1	3	32	16
4	128	Soln 1	1	7	16	8
5	16	Soln 4	1	1	8	4
6	16	Soln 4	1	3	4	2
7	16	Soln 4	1	7	2	1
8	2	Soln 7	1	1	1	0.5
9	2	Soln 7	1	3	0.5	0.25
10	2	Soln 7	1	7	0.25	0.125

Soln: solución, [ ]: concentración.

5. La serie de disoluciones se prepara tanto en caldo MH + 0.5% v/v de DMSO, como con MHS + 0.5% v/v de DMSO para cada extracto.

#### **4.4.6.2 Preparación de las diluciones de vancomicina**

La CIM reportada de la vancomicina frente a SARM es de 1  $\mu\text{g/mL}$  <sup>(59)</sup>, lo que corresponde a 0.001 mg/mL.

Las primeras diluciones que se prepararon fueron las siguientes: 32 mg/mL, 16 mg/mL, 8 mg/mL, 4 mg/mL, 2 mg/mL, 1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.125 mg/mL y 0.062 mg/mL. El frasco de vancomicina rotula 0.5 g de este antibiótico en términos de la base.

El proceso para preparar las diluciones es el siguiente (ver anexo N°5):

1. Diluir el contenido de un vial de vancomicina que rotula 0.5 g con 7.81 mL de caldo MH + 0.5% de DMSO, obteniendo una concentración de 64 mg/mL. Ésta será la solución 1v (32 mg/mL). El caldo deberá contener dimetilsulfóxido a una concentración de 0.5% v/v del volumen total.
2. Agitar el vial hasta completa disolución.
3. Para las demás concentraciones, elaborar una serie de diluciones teniendo en cuenta el siguiente cuadro:

Tabla N°3. Primera dilución de vancomicina.

Soln	[ ] de vancomicina (mg/mL)	Fuente	Volumen de solución de vancomicina (mL)	Volumen de caldo estéril (mL)	[ ] obtenida de vancomicina (mg/mL)	[ ] final de vancomicina final en prueba (mg/mL)
2v	64	1v	1	1	32	16
3v	64	1v	1	3	16	8
4v	64	1v	1	7	8	4
5v	8	4v	1	1	4	2
6v	8	4v	1	3	2	1
7v	8	4v	1	7	1	0.5
8v	1	7v	1	1	0.5	0.25
9v	1	7v	1	3	0.25	0.125
10v	1	7v	1	7	0.125	0.062

Soln: solución, [ ]: concentración.

4. Preparar la serie de diluciones tanto con caldo MH como con caldo MHS.

Luego de la primera dilución de vancomicina, se realizó una segunda dilución para analizar concentraciones más pequeñas que las analizadas en la primera serie. El proceso de dilución es el siguiente <sup>(23, 87)</sup> (ver anexo N°6):

1. En un vial que contenga 0.5 g de vancomicina sólida, diluir en 7.81 mL de agua desmineralizada estéril, obteniendo una concentración de 64 mg/mL.
2. Tomar 1 mL de la solución anterior y diluir en 7 mL de buffer fosfato monobásico de potasio estéril (pH= 4.5), obteniendo una concentración de 8 mg/mL. Dicha disolución será denominada Stock.
3. Realizar una serie de diluciones teniendo en cuenta el siguiente cuadro, utilizando como solvente los caldos MH y MHS + 0.5% de DMSO.

Tabla N°4. Segunda dilución de vancomicina.

Soln	[ ] de vancomicina (µg/mL)	Fuente	Volumen de soln madre (mL)	Volumen de caldo (mL)	[ ] obtenida de vancomicina (µg/mL)	[ ] final de vancomicina en prueba (µg/mL)
1v	8,000	Stock	1	3	2,000	1,000
2v	8,000	Stock	1	7	1,000	500
3v	1,000	Soln 2	1	1	500	250
4v	1,000	Soln 2	1	3	250	125
5v	1,000	Soln 2	1	7	125	62.5
7v	125	Soln 5	1	1	62.5	31.2
7v	125	Soln 5	1	3	31.2	15.6
8v	125	Soln 5	1	7	15.6	7.8
9v	15.6	Soln 8	1	1	7.8	3.9
10v	15.6	Soln 8	1	3	3.9	1.9
11v	15.6	Soln 8	1	7	1.9	0.98
12v	0.98	Soln 11	1	1	0.98	0.49
13v	0.98	Soln 11	1	3	0.49	0.24
14v	0.98	Soln 11	1	7	0.24	0.12
15v	0.12	Soln 14	1	1	0.12	0.061
16v	0.12	Soln 14	1	3	0.061	0.03
17v	0.12	Soln 14	1	7	0.03	0.015
18v	0.015	Soln 17	1	1	0.015	0.007
19v	0.015	Soln 17	1	3	0.007	0.003
20v	0.015	Soln 17	1	7	0.003	0.001

Soln: solución, [ ]: concentración.

#### 4.4.6.3 Obtención, mantenimiento y verificación de la identidad de cepas de trabajo (SARM y SASM)

La cepa SARM fue obtenida del cepario del área de bacteriología del Laboratorio Nacional de Referencia. Esta cepa fue aislada en el Hospital de Niños Benjamín

Bloom por parte de profesionales de dicho hospital. La cepa lleva el siguiente número de identificación: 691231.

Se guardó en crioviales para su conservación y posterior uso. El método para la preservación es el siguiente (Ver anexo N°7):

1. En dos tubos con medio TSA inclinado, inocular una asada de la cepa contenida en el medio de transporte.
2. Incubar por 48 horas a 35°C.
3. A cada tubo de TSA agregar aproximadamente 600 µL de Tween 2% v/v para obtener las colonias en forma de suspensión
4. En cada criovial (cuatro en total), agregar 200 µL de la suspensión bacteriana preparada en el paso anterior.
5. Por último, a cada criovial agregar 200 µL de glicerol al 40% v/v.
6. Almacenar a una temperatura entre -4 y -10 °C hasta su posterior uso.

La cepa SASM que se utilizó fue proporcionada por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia con código ATCC 6538, contenida en crioviales, y se realizó el mismo procedimiento de conservación para conservar las cepas de trabajo que serán utilizadas durante el estudio.

Se realizaron las siguientes pruebas microbiológicas convencionales para confirmar la identidad de las cepas de *S. aureus* utilizadas. Estas pruebas se realizaron tanto para la cepa SARM como para la cepa SASM. La cepa sensible fue cultivada en agar MH, y la cepa resistente, en agar MHS; a partir de ellas se realizaron las pruebas:

**Morfología microscópica** <sup>(51)</sup>: se verificó mediante tinción de Gram. Se elaboró para determinar a qué grupo (grampositivos o gramnegativos) pertenecen los microorganismos contenidos en los viales SARM y SASM, El proceso fue el siguiente:



1. En un portaobjeto limpio, colocar una gota de cloruro de sodio. Un portaobjeto para la cepa SARM y uno para la cepa SASM.
2. En la gota de cloruro de sodio, colocar una asada de una colonia (SARM O SASM). Homogenizar.
3. Fijar en mechero Bunsen.
4. Agregar cristal violeta a cubrir. Reposar por un minuto.
5. Lavar con agua destilada.
6. Agregar lugol a cubrir. Reposar por un minuto.
7. Lavar con agua destilada.
8. Agregar la solución alcohol-acetona a cubrir.
9. Lavar con agua destilada.
10. Agregar safranina a cubrir. Reposar por un minuto.
11. Lavar con agua destilada.
12. Secar cuidadosamente con papel toalla y con mechero Bunsen.
13. Observar al microscopio.
14. La observación de cocos morados dispuestos en racimos o en tétradas, indica bacteria grampositiva.

**Prueba de catalasa** <sup>(51)</sup>: *S. aureus* posee una enzima denominada catalasa que descompone el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua.

1. En un portaobjetos colocar dos gotas de peróxido de hidrógeno.
2. Tomar una asada a partir de las placas con las cepas inoculadas y colocarla sobre las gotas de peróxido de hidrógeno, agitar suavemente.
3. La aparición de burbujeo inmediato indica que la prueba es positiva.

**Morfología macroscópica en agar Baird-Parker** <sup>(51)</sup>: mediante este agar, se puede identificar *S. aureus* a partir de las características macroscópicas que presentan las colonias.

En una placa de Petri que contenga agar de Baird-Parker, inocular de forma estriada, una asada a partir de una placa de Mueller Hinton. Incubar la placa durante 24 horas. La prueba es positiva para *S. aureus* si se observan colonias negras brillantes con un halo alrededor de ellas.

**Morfología macroscópica en agar Manitol Salado** <sup>(51)</sup>: en dicho agar, se observa la fermentación de carbohidratos, una característica de *S. aureus*.

En una placa de Petri que contenga agar Manitol Salado, inocular mediante estriado, una asada a partir de las placas que contienen las cepas. Incubar durante 24 horas. La presencia de colonias que han tornado la coloración del medio de rosa a color amarillo se considera positiva para *S. aureus*.

**Morfología macroscópica en agar Sangre** <sup>(51)</sup>: *S. aureus* es una bacteria  $\beta$ -hemolítica, por lo que provoca lisis completa en todos los eritrocitos.

En una placa de Petri que contenga Agar Sangre, inocular mediante estriado, una asada de microorganismo, a partir de una placa de Mueller Hinton. Incubar durante 24 horas. La presencia de colonias betahemolíticas se considera positiva para *S. aureus*.

**Resistencia a cefoxitina** <sup>(20)</sup>: según el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés), para determinar la resistencia de *S. aureus* a la meticilina/oxacilina, el antibiograma se realiza con discos de cefoxitina.

En una placa con agar MH, inocular la cepa SARM sobre toda la superficie del agar. Colocar 2 discos estandarizados de cefoxitina. Incubar a 37°C/24h. Repetir el procedimiento para la cepa de *S. aureus* sensible a la meticilina (SASM). La cepa se considera es resistente a la cefoxitina y por ende a la meticilina si los diámetros de los halos en mm son menores o iguales a 21mm, y sensible si los diámetros de los halos en mm son mayores o iguales a 22mm.

**Resistencia a diversos antibióticos** <sup>(80)</sup>: “El fenotipo de resistencia de *Staphylococcus* frente a la meticilina (y a la oxacilina), se da por la adquisición del gen *mecA*. La resistencia a la meticilina mediada por este gen, implica la resistencia a todas las penicilinas, cefalosporinas (exceptuando las dos nuevas cefalosporinas, ceftobiprole y ceftarolina), 1,2, carbapenems y asociaciones de beta-lactámico con inhibidor de beta-lactamasa” <sup>(80)</sup>. El cuadro N°4 muestra diferentes fenotipos y mecanismos de resistencia a los antibióticos betalactámicos que presenta el género *Staphylococcus*, así como niveles de incidencia de estos diferentes tipos de resistencia.

Cuadro N°4. Antibiogramas y mecanismos de resistencia en *Staphylococcus* <sup>(80)</sup>.

B-lactámicos					Mecanismo de resistencia	Incidencia
PEN	OXA	AMP	AMC	FOX		
S	S	S	S	S	Ninguno	Baja
R	S	R	S	S	Penicilinasa	Muy alta
R	R	R	R	R	PBP2a (gen <i>mecA</i> )	Alta-moderada
I/R	I/R	I/R	S	S	Hiperproducción de penicilinasas o modificación de PBP 1, 2 o 4	Muy baja

S: sensible; I: intermedio; R: resistente.

Para verificar la resistencia a la meticilina en el laboratorio, se utilizan discos de cefoxitina de 30 µg. En el caso de *S. aureus* y de *S. lugdunensis*, un halo de <21 mm indica la presencia del gen *mecA*.

#### 4.4.6.4 Preparación de cultivo de trabajo

Las cepas estaban contenidas en crioviales por lo que fue necesario reconstituirlas para su posterior uso, para ello se ejecutaron las siguientes acciones (ver anexo N° 8):

1. Tomar una asada de cada criovial conteniendo las cepas, estriar en placas separadas de agar MH e incubar a 37°C por 18-24 horas.
2. Verificar mediante la observación de las placas y tinción de Gram de una colonia aislada de cada una de las placas la pureza de cada una de ellas y luego proceder a realizar las pruebas de identificación indicadas en la sección 4.6.3.
3. Habiendo verificado la pureza, inocular la cepa sensible en agar MH, y la cepa resistente en agar MHS. Incubar a 37°C por 18-24 horas.

Estandarizar las cepas espectrofotométricamente a 625 nm, a un rango de absorbancia entre 0.08-0.13, que equivale a una densidad óptica de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL <sup>(87)</sup>.

Para la estandarización se seguirá el siguiente proceso (Ver anexo N° 9):

1. Utilizar tubos con caldo MH y tubos con caldo MHS.
2. Configurar en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 625 nm.
3. Llevar el espectrómetro a una absorbancia de 0, usando como blanco, caldo MH.
4. A partir de las placas que contienen las colonias de la cepa SARM, seleccionar 3 a 5 colonias morfológicamente similares, utilizando un asa de plástico estéril.
5. Transferir las colonias a un tubo que contenga caldo MH a un volumen de 5 mL y mezclar utilizando un agitador vortex.
6. Medir la absorbancia de esta suspensión.
7. Ajustar la turbidez de la solución a un valor entre 0.08 y 0.13 utilizando caldo MH, en caso de que la turbidez sea demasiado alta, o agregando más inóculo, si la turbidez es demasiado baja.

8. Para determinar si se ha obtenido la concentración deseada ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL) se prepararán diluciones seriadas duplicadas, siguiendo el procedimiento que se muestra en el anexo N°10.
9. Una vez obtenida la absorbancia deseada (que corresponde a  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL), diluir la suspensión bacteriana en un factor 1:100. Para ello tomar 200  $\mu$ L de la suspensión previamente estandarizada y agregar a 19.8 mL de caldo MH en un Erlenmeyer de 50 mL estéril, obteniéndose así 20 mL de inóculo, (concentración aproximada  $1.5 \times 10^6$  UFC/mL); a esta suspensión se le llamará suspensión de prueba.
10. Repetir el proceso para la cepa SASM.
11. Se harán suspensiones de SARM y SASM en MH y MHS, es decir, al final se tendrán 4 suspensiones de prueba.

A la hora de agregar el inóculo a los pocillos se obtendrán concentraciones de  $5 \times 10^5$  UFC/mL.

#### **4.4.6.5 Determinación de la concentración inhibitoria mínima por el método de microdilución en caldo** <sup>(87)</sup>

Primer ensayo para la determinación de CIM mediante el método de microdilución en caldo (ver anexo N° 11).

1. Se utilizarán ocho microplacas en total. La microplaca está dividida de la siguiente manera: 12 columnas x 8 filas.
2. Las microplacas serán denominadas de la siguiente manera:
  - EtSMH: extracto etanólico + SASM + caldo MH.
  - EtRMH: extracto etanólico + SARM + caldo MH.
  - EtSMHS: extracto etanólico + SASM + caldo MHS.
  - EtRMHS: extracto etanólico + SARM + caldo MHS.
  - HiSMH: extracto hidroalcohólico + SASM + caldo MH.
  - HiRMH: extracto hidroalcohólico + SARM + caldo MH.

- HiSMHS: extracto hidroalcohólico + SASM + caldo MHS.
  - HiRMHS: extracto hidroalcohólico + SARM + caldo MHS.
3. Las filas de cada microplaca fueron utilizadas de la siguiente manera:
    - Fila A: blanco de vancomicina.
    - Fila B: diluciones de prueba de vancomicina (ver tabla N°1).
    - Fila C: blanco del extracto.
    - Filas D-G: análisis del extracto.
  4. Agregar 50 µL de las diluciones de los extractos y la primera serie de diluciones de vancomicina a distintas concentraciones en los pocillos de las columnas 1 a la 10 de tal manera que la concentración vaya disminuyendo a medida que avanzan los pocillos.
  5. Utilizar la columna 11 como control positivo. Agregar 100 µL de suspensión de prueba. Dicha suspensión de prueba contiene el microorganismo a analizar más el medio de cultivo (caldo MH o MHS).
  6. Para determinar que la concentración de la suspensión de prueba es la correcta ( $5 \times 10^5$  UFC/mL), se elaborará el siguiente proceso (ver anexo N° 13)
    - Inmediatamente después de inocular la columna 11, con la cepa de prueba, tomar 10 µL en un tubo que contenga 990 µL de medio de cultivo MH. Homogenizar mediante vortex.
    - Tomar 100 µL y agregarlos a un tubo que contenga 900 µL de medio de cultivo (MH o MHS). Homogenizar mediante vortex.
    - De los 4 tubos inoculados, pipetear 100 µL a placas con agar MH.
  7. La columna 12 será utilizada como control negativo (esterilidad), por ello se agregarán 100 µL de medio de cultivo MH o MHS según corresponda.
  8. Agregar 50 µL de la suspensión de prueba de la cepa correspondiente para cada microplaca.

9. Antes de proceder a incubar las microplacas, leer la absorbancias de los pocillos en un equipo lector de ELISA a una longitud de onda de 630 nm (ver anexo N°13).
10. Proceder a incubar las microplacas y las placas con agar a 35°C por 24 horas.
11. Proceder a verificar visualmente los resultados de crecimiento en las microplacas y a leer nuevamente las absorbancias de cada una de ellas.

Segundo ensayo para determinación de CIM de vancomicina mediante el método de microdilución en caldo (ver anexo N° 12).

1. Se utilizarán cuatro microplacas en total. La microplaca está dividida de la siguiente manera: 12 columnas x 8 filas.
2. Las microplacas serán denominadas de la siguiente manera:
  - VSMH: vancomicina + SASM + caldo MH.
  - VRMH: vancomicina + SARM + caldo MH.
  - VSMHS: vancomicina + SASM + caldo MHS.
  - VRMHS: vancomicina + SARM + caldo MHS.
3. Las filas de cada microplaca fueron utilizadas de la siguiente manera:
  - Fila A: primer blanco de vancomicina.
  - Filas B-D: análisis de vancomicina (Ver tabla N°4).
  - Fila E: segundo blanco de vancomicina.
  - Filas F-H: análisis de vancomicina.
4. Agregar 50 µL de la segunda serie de diluciones de la vancomicina a distintas concentraciones en los pocillos de las columnas 1 a la 10, siendo en las filas A-D las mayores concentraciones, y las filas E-H, las de menor concentración.
5. Utilizar la columna 11 como control positivo agregando 100 µL de suspensión de prueba. Dicha suspensión de prueba contiene el microorganismo a analizar más el medio de cultivo (caldo MH o MHS).

6. Para determinar que la concentración de la suspensión de prueba es la correcta ( $5 \times 10^5$  UFC/mL), elaborar el mismo proceso que para el primer ensayo de determinación de CIM (ver anexo N° 13).
7. La columna 12 será utilizada como control negativo (esterilidad), por ello se agregarán 100  $\mu$ L de medio de cultivo MH o MHS según corresponda.
8. Agregar 50  $\mu$ L de la suspensión de prueba de la cepa correspondiente a cada microplaca.
9. Antes de proceder a incubar las microplacas, leer la absorbancias de cada microplaca en un equipo lector de ELISA a una longitud de onda de 630 nm (ver anexo N°14).
10. Proceder a incubar las microplacas y las placas con agar a 35°C por 24 horas.
11. Proceder a verificar visualmente los resultados de crecimiento en las microplacas y a leer nuevamente las absorbancias de cada una de ellas.

#### **4.5 Análisis estadístico**

Luego de haber elaborado por cuadruplicado el ensayo de microdilución en caldo para determinar la concentración inhibitoria mínima, se tabularon los datos obtenidos tomando en cuenta los siguientes factores: extractos de romero (etanólico e hidroalcohólico), cepas utilizadas (SARM y SASM) y los medios de cultivo (MH y MHS), para luego comparar con vancomicina.

Para obtener las diferencias que existen entre concentraciones inhibitorias mínimas de los extractos y vancomicina, y también entre las cepas SARM y SASM, se utilizó el método estadístico análisis multifactorial. El análisis multifactorial consiste en describir el impacto que presentan dos o más factores frente a una variable dependiente <sup>(89)</sup>. Dicho análisis estadístico será elaborado en el programa Statgraphics Centurion, en el mismo programa se utilizó la prueba LSD de Fisher para calcular la menor diferencia significativa entre las variables



independientes. Se utilizó un nivel de confianza de 95% para todos los análisis. Se utilizó el análisis factorial debido a que todos los factores (extractos, cepas, medios y concentración) que fueron analizados, influyen en el crecimiento microbiano; se evaluó el efecto que provocan estos factores en los resultados obtenidos.

## **CAPITULO V**

### **RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS**

## 5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

### 5.1 Obtención e identificación del material vegetal

El proveedor, Herboristería “Delicia Natural”, llevó el material vegetal al laboratorio de APROCSAL, y posteriormente entregó la carta firmada y sellada haciendo constar que las muestras provienen de Guatemala. (Ver anexo N° 15)

Además, el curador del Herbario del Jardín Botánico La Laguna, entregó un certificado haciendo constar que el material vegetal utilizado corresponde a la especie vegetal *R. officinalis* L. (Ver anexo N° 16).

### 5.2 Preparación de los extractos

El material vegetal se lavó y se colocó durante 10 minutos en estufa para secarlo a 60°C. Se pesaron 908.0 g por duplicado y se agregaron a dos contenedores de acero inoxidable respectivamente. Luego, en uno de los recipientes se colocaron 6 L de etanol al 90%; en el segundo recipiente, 4 L de etanol y 2 L de agua destilada. Los recipientes se cerraron y se dejaron reposar (ver anexo N° 17). Los extractos se agitaron durante los días 4 y 7 después de haber sido elaborados. El día 11, se midió el volumen de extracto de cada recipiente, los datos se muestran en la tabla N°5:

Tabla N°5. Volumen de los extractos de romero (*R. officinalis*) al día 11.

Extracto	Volumen inicial	Volumen al día 11	Volumen a reponer
Etanólico	6.0 L	4.7 L	1.3 L alcohol 90 % v/v
Hidroalcohólico	6.0 L	4 L	1.34 L alcohol 90 % v/v, 0.66 L agua destilada

En el día 18 se filtraron los extractos con filtro de cocina y se guardaron en frascos de plástico de 1 galón para ser llevados a los laboratorios de Biotecnología y Fitoquímica del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD).

Se utilizaron dos rotavapores, uno para cada extracto a una temperatura no mayor de 60°C. A ambos extractos se le agregó acetona con el fin de agilizar el proceso de evaporación. El primer día se dejaron evaporar durante 5 horas con 15 min. Del segundo al quinto día se evaporaron durante 8 horas cada día. Entre cada día, los extractos fueron colocados en estufa a 60°C. Para el extracto hidroalcohólico se utilizó alcohol isoamílico como antiespumante, en total se usaron 80 mL.

El proceso de evaporación del extracto hidroalcohólico fue más difícil, esto se debe al contenido de agua utilizada como solvente (30%). Además, se extendió el tiempo de evaporación en ambos extractos, debido a que no se contaba con un enfriador que permitiera incrementar el vacío y acelerar la evaporación del solvente sin incrementar la temperatura, ya que la temperatura ideal es de 40°C o menor. El vacío hubiese acelerado el proceso de secado, y lo ideal hubiese sido secar los extractos en condiciones de liofilización. En el anexo N°18 se muestra el proceso de evaporación de los extractos.

Posterior a la evaporación con rotavapor (ver anexo N° 18), los extractos fueron dejados en estufa a una temperatura de 60°C durante dos semanas para evaporar completamente los solventes. Estando completamente secos, fueron triturados en mortero y pistilo.

Se pesó cada uno de los extractos para obtener su porcentaje de rendimiento mediante la siguiente fórmula:

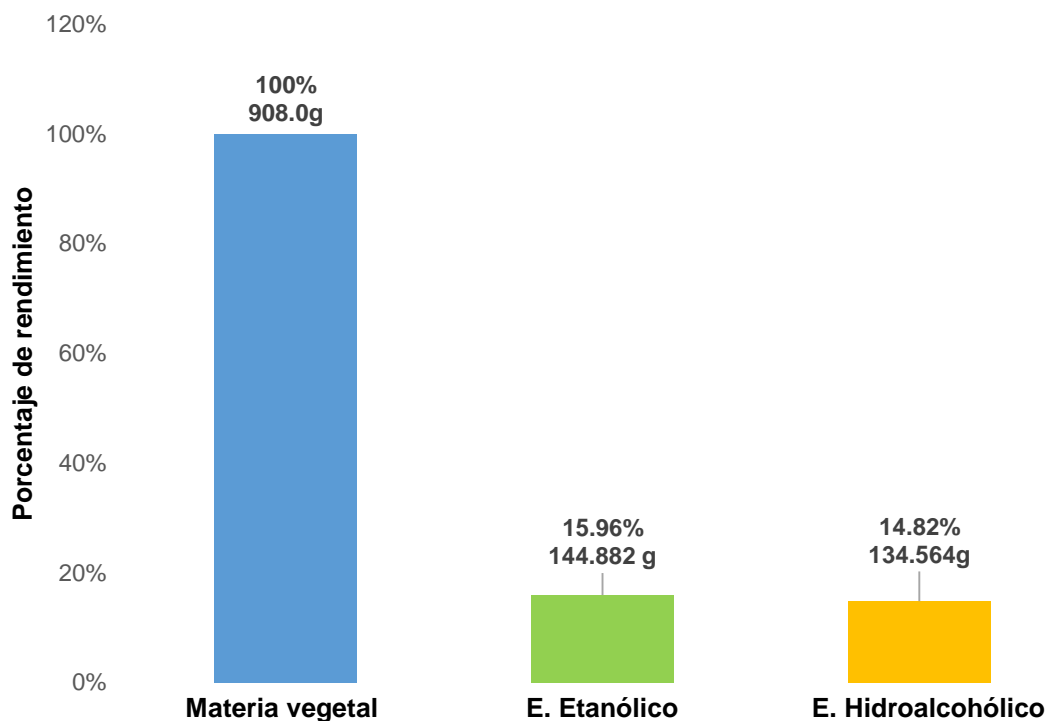
$$\% = \frac{\text{Cantidad de extracto seco en gramos}}{\text{Material vegetal seco en gramos}} \times 100\%$$

El porcentaje de rendimiento de cada extracto se muestra en la tabla N°6.

Tabla N°6. Porcentaje de rendimiento de los extractos de romero (*R. officinalis*).

Extracto	Peso del extracto	Porcentaje de rendimiento
Etanólico	144.882 g	15.96 %
Hidroalcohólico	134.564 g	14.82 %

Posterior al cálculo del porcentaje de rendimiento, se guardaron los extractos en un desecador a temperatura ambiente.



E. Etanólico: extracto etanólico; E. Hidroalcohólico: extracto hidroalcohólico

Figura N°6. Gráfico de porcentaje de rendimiento obtenido en los extractos etanólico e hidroalcohólico de romero (*R. officinalis*).

En la figura N°6 se observa la cantidad de material vegetal utilizado para elaborar los extractos (908.0 g), también se muestra la cantidad de material que fue extraído durante el proceso de maceración para cada extracto. Los resultados revelan que el etanol a 90% v/v tiene capacidad de extraer relativamente una mayor cantidad de material extractable en comparación al utilizar etanol al 70% v/v, pero es una diferencia pequeña entre ambos solventes (1.14%).

### 5.3 Prueba de solubilidad de los extractos

De las pruebas realizadas con los diferentes solventes se observó que no se disolvían completamente en los medios de cultivo. Dichos resultados se muestran en el cuadro N°5.

Cuadro N°5. Prueba de solubilidad de los extractos etanólico e hidroalcohólico de romero (*R. officinalis*).

Extractos	Resultado de solubilidad en 1 mL de disolvente MH				Resultado de solubilidad en 1 mL de disolvente MHS			
	0.64 g	0.32 g	0.16 g	0.08 g	0.64 g	0.32 g	0.16 g	0.08 g
<b>Etanólico</b>	+	++	++	+++	+	++	++	+++
<b>Hidroalcohólico</b>	+	+	++	+++	+	+	++	++

Mayor número de cruces indica mayor solubilidad.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se utilizó dimetilsulfóxido a una concentración de 0.5% v/v para favorecer una mayor solubilidad en los caldos MH y MHS. La adición de dimetilsulfóxido establecida anteriormente, aumentó la solubilidad de los extractos (ver cuadro N°6). Adicionalmente, fue necesaria la filtración de ambos extractos para obtener una disolución sin turbidez, debido a que ésta afectaría la observación de la CIM y la toma de absorbancias por espectrofotometría.

Cuadro N°6. Solubilidad de las soluciones Stock de los extractos etanólico e hidroalcohólico de romero (*R. officinalis*).

Extracto	Peso	Volumen de solvente	Solubilidad
<b>Etanólico</b>	6.4 g	10 mL	++++
<b>Hidroalcohólico</b>	6.4 g	10 mL	++++

Mayor número de cruces indica mayor solubilidad.

### 5.4 Preparación de diluciones de los extractos y vancomicina

Además de agregar 0.5% v/v de dimetilsulfóxido, se siguieron una serie de pasos para garantizar que las diluciones de los extractos quedaran libres de partículas.

Dichos pasos son los siguientes:

- Se agitó durante 20 minutos para obtener la máxima solubilidad de las soluciones Stock.
- Dichas soluciones Stock fueron sometidas a un proceso de doble filtración, mediante papel filtro y por filtro de jeringa de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ .

A partir de la solución Stock ya filtrada, se procedió a obtener las diluciones de los extractos.

En el caso de la vancomicina se realizaron dos series de diluciones, la primera en diluciones comparables con los extractos, y la segunda, que involucró tanto las primeras utilizadas, como las segundas que son más cercanas a las CIM de las cepas reportadas en la literatura.

En la primera serie de diluciones solo se utilizó como solventes los caldos MH y MHS a los cuales se les agregó 0.5% v/v de DMSO. Mientras que para la segunda serie, se realizó una primera disolución en agua desmineralizada estéril, seguido de una disolución en buffer fosfato monobásico de potasio a un pH de 4.5 <sup>(23)</sup>. Dicho proceso se elaboró con el fin de obtener una máxima solubilidad de la vancomicina, debido a que las absorbancias obtenidas en la primera disolución mostraban turbidez en las concentraciones más altas no debidas a la presencia del microorganismo de ensayo, lo cual sugería un cierto nivel de insolubilidad del antibiótico tal y como se observa en la figura N°7.

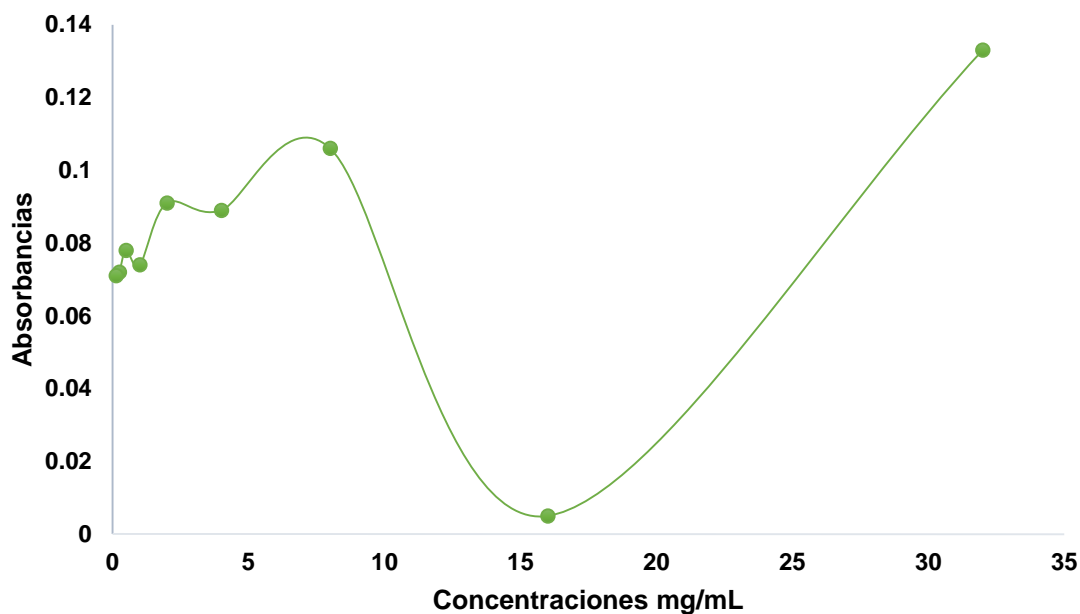


Figura N°7. Absorbancias de vancomicina obtenidas en: placa del extracto hidroalcohólico más cepa sensible más caldo MHS (HiSMHS).

En la figura N°8 se observa una mayor homogeneidad de los valores de absorbancia de las concentraciones mayores, lo cual indica completa solubilidad de la vancomicina en las concentraciones altas, y completa inhibición del microorganismo de ensayo, y con ello, resultado más confiables para poder realizar el análisis estadístico. Es necesario recordar que las absorbancias altas que presentan las concentraciones menores, se deben a que a esas concentraciones, se presenta crecimiento del microorganismo de análisis.



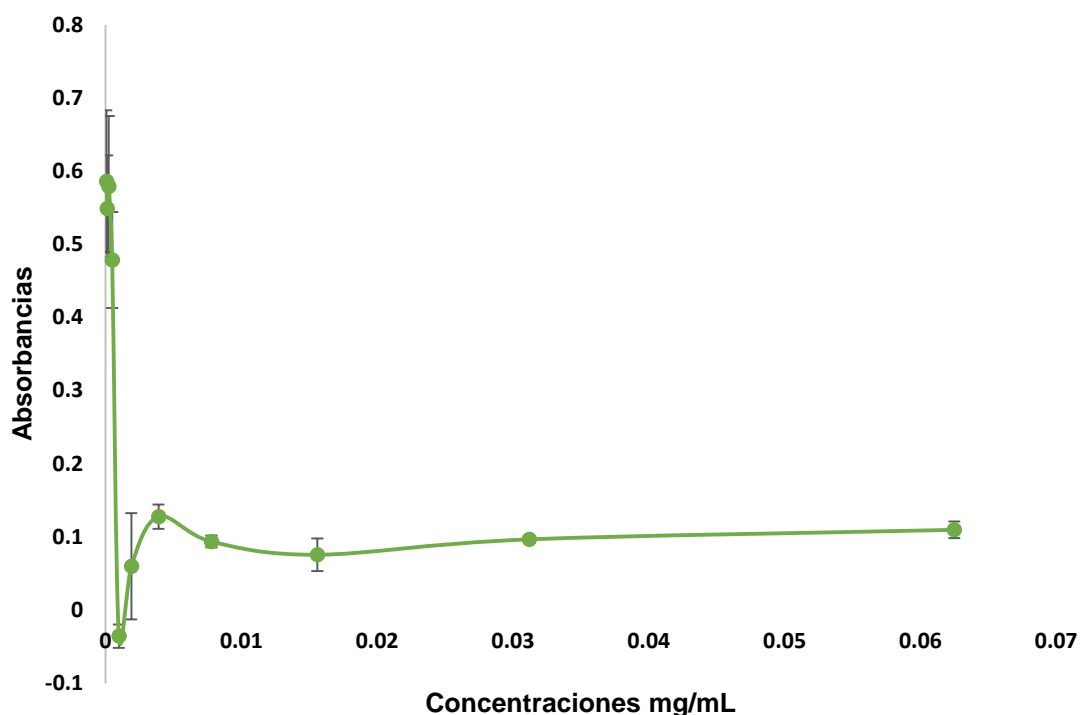


Figura N°8. Gráfica de segundo análisis de vancomicina en: placa vancomicina más cepa resistente más caldo MHS (VRMHS).

### 5.5 Reanimación y pruebas de identidad de las cepas a utilizar

Para la reanimación de ambas cepas, se utilizaron agar MH y MHS. Los resultados obtenidos a 24 horas y 48 horas son los siguientes:

-SARM: Se inoculó en agar MHS. A las 24 horas de incubar, se mostraron colonias pequeñas color crema amarillenta. Se obtuvo una pequeña cantidad de colonias, esto puede deberse a que se inactivaron las cepas susceptibles y solo crecieron las cepas heterorresistentes. A 48 horas de incubación, las colonias crecieron y se muestran más cremosas.

-SASM: Se sembró en agar MH. A las 24 horas de incubar, se mostraron colonias pequeñas color crema amarillenta, con una mayor presencia de colonias en comparación a la cepa SARM en MHS.

La tinción de Gram mostró que ambas cepas son cocos gram positivos dispuestos en racimos en forma de uva o en tétradas. En la prueba de catalasa, se observó burbujeo inmediato al entrar en contacto ambas cepas con el peróxido de hidrógeno, por tanto, ambas cepas dieron positivo para dicha prueba. Para la prueba en agar Manitol Salado, ambas cepas dieron positivo decolorando el agar de un color rosa a un color amarillo, tanto alrededor de las colonias, como en el resto del agar.

Los resultados obtenidos en agar Sangre, indican prueba positiva para la cepa SASM a 24 horas de incubación dando colonias grises con halos  $\beta$ -hemolíticos alrededor de ellas. Para la cepa SARM, si hubo crecimiento a las 24 horas de cultivo dando colonias grises, pero no se observaron halos de hemólisis, por tanto se dejó incubar a 48 horas, dando en este tiempo los halos  $\beta$ -hemolíticos alrededor de las colonias. Una diferencia entre ambas cepas, es la decoloración que provoca la cepa SARM en toda la placa, se observó que dicha cepa decoloraba el agar hasta un tono rojo claro-naranja, mientras la cepa SASM no provocó dicha decoloración.

Por último en la prueba de agar Baird-Parker, dicha prueba fue positiva para ambas cepas, dando colonias negro brillante, con halos alrededor de las colonias. En la cepa SARM se obtuvieron unos halos pequeños alrededor de las colonias por lo que era necesario utilizar un cuenta colonias para observarlos, en cambio, para la cepa SASM los halos obtenidos eran más grandes, por lo que no era necesario utilizar cuenta colonias.

Los resultados de las pruebas de reanimación y de identidad descritas se muestran en la figura N°9.

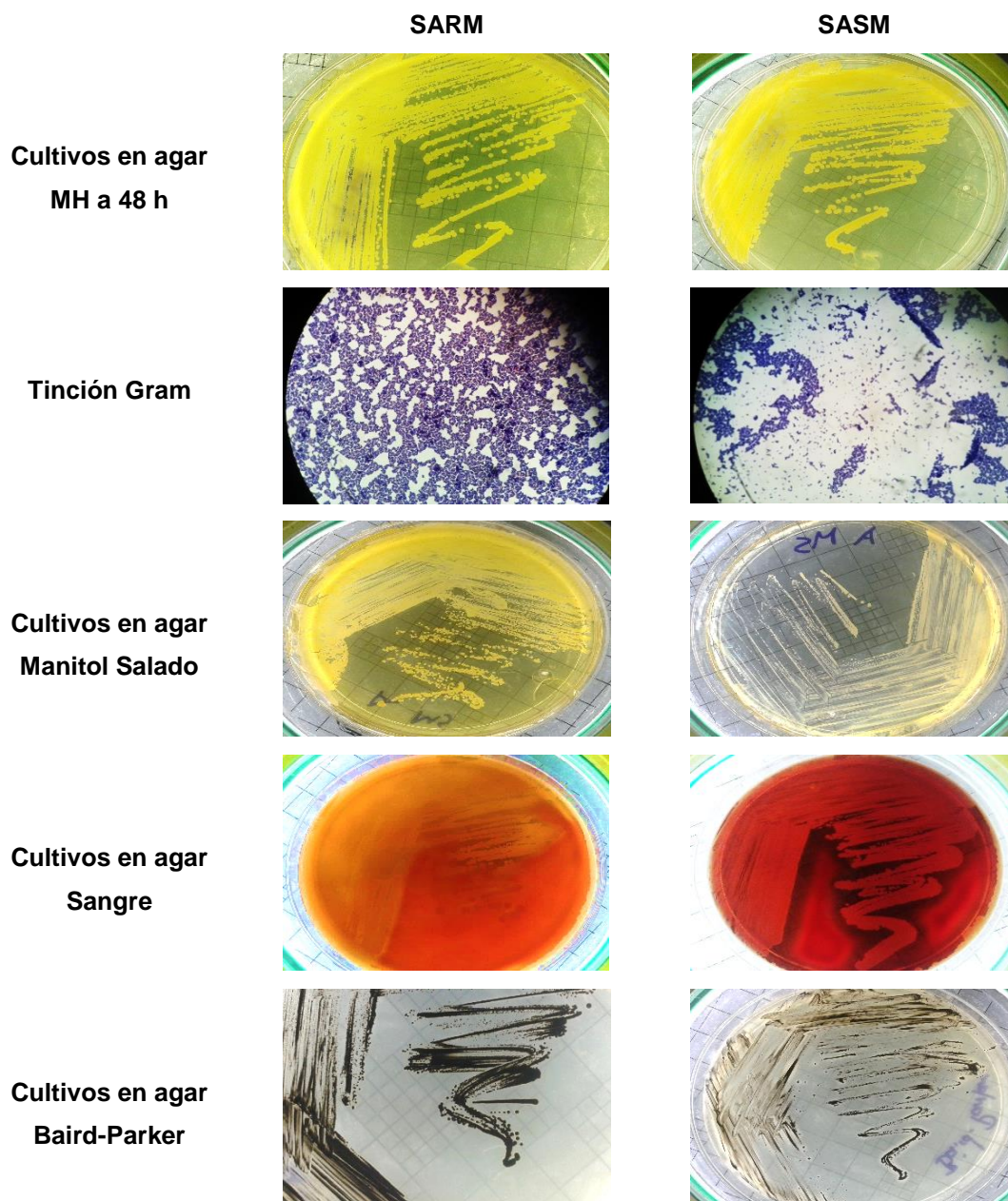


Figura N°9. Reanimación y pruebas de identidad de cepas de *S. aureus*.

Para la prueba de antibiograma, se utilizaron los discos de cefoxitina, penicilina, penicilina G, ampicilina y amoxicilina más ácido clavulánico. Los halos obtenidos por cada cepa se muestran en la tabla N°7.

Tabla N°7. Halos de inhibición obtenidos en segunda prueba de antibiograma.

Antibiótico	Cepa SARM	Cepa SASM
Cefoxitina	16 mm, resistente	26 mm, sensible
Penicilina	8 mm, resistente	27-30 mm, sensible
Penicilina G	0 mm, resistente	15 mm, resistente
Ampicilina	9 mm, resistente	15 mm, resistente
Amoxicilina más ácido clavulánico	12-15 mm, resistente	35 mm, sensible

Teniendo en cuenta las pruebas de identificación, se puede establecer que ambas cepas son *S. aureus*, debido a que se obtuvieron resultados positivos en todas pruebas de identificación a las cuales fueron sometidas.

Por otro lado, en las pruebas de antibiograma, la cepa SARM dio como resultado, resistencia a la cefoxitina según la CDC, ya que los halos de inhibición obtenidos fueron de 16 mm; además, presentó resistencia a los demás antibióticos a los cuales fue analizado <sup>(80)</sup>. Esto resultados sugieren que el mecanismo de resistencia de la cepa SARM es mediado por el gen *mecA* y la proteína PBP2a, que indican resistencia a la meticilina. En cuanto a la cepa SASM, los resultados muestran que presenta sensibilidad a la cefoxitina, debido a que sus halos de inhibición fueron de 26 mm, además obteniendo sensibilidad a la penicilina y a la amoxicilina más ácido clavulánico <sup>(80)</sup>. Todo ello indica que ambas cepas son respectivamente *S. aureus* resistente y sensible a la meticilina respectivamente.

### 5.6 Verificación del método de estandarización a utilizar

Para la verificación del método de estandarización, se realizó un recuento de la suspensión estandarizada por duplicado con un intervalo de 24 horas entre cada medición. Los resultados de la primera y segunda dilución seriada se muestran

en la tabla N°8, el resultado en UFC/mL es el promedio de las dos placas más la desviación estándar mostrada en cada dilución.

Tabla N°8. Verificación del método de estandarización.

Ensayo	Absorbancia	Caldo	Dilución	Resultados en UFC/mL			
				SARM		SASM	
				Recuento	Desv.	Recuento	Desv.
1	SARM 0.092 SASM 0.122	MHS	10 <sup>-4</sup>	DNPC	0	DNPC	0
			10 <sup>-5</sup>	1.8x10 <sup>7</sup>	4.2x10 <sup>5</sup>	1.9x10 <sup>7</sup>	1.2 x10 <sup>7</sup>
			10 <sup>-6</sup>	7.5x10 <sup>7</sup>	7.1x10 <sup>6</sup>	8.1x10 <sup>7</sup>	2.8 x10 <sup>6</sup>
			10 <sup>-7</sup>	1.0x10 <sup>8</sup>	1.4 x10 <sup>7</sup>	3.1x10 <sup>8</sup>	4.2 x10 <sup>7</sup>
	SARM 0.112 SASM 0.128	MH	10 <sup>-4</sup>	DNPC	0	3.0x10 <sup>6</sup>	9.2 x10 <sup>4</sup>
			10 <sup>-5</sup>	1.3x10 <sup>7</sup>	5.0 x10 <sup>5</sup>	8.5x10 <sup>6</sup>	6.7 x10 <sup>5</sup>
			10 <sup>-6</sup>	6.3x10 <sup>7</sup>	4.2x10 <sup>5</sup>	5.1x10 <sup>7</sup>	3.5 x10 <sup>6</sup>
			10 <sup>-7</sup>	1.1x10 <sup>8</sup>	2.1x10 <sup>7</sup>	8.0x10 <sup>7</sup>	4.2 x10 <sup>7</sup>
2	SARM 0.129 SASM 0.103	MHS	10 <sup>-6</sup>	4.2x10 <sup>7</sup>	3.5x10 <sup>6</sup>	4.4x10 <sup>7</sup>	5.0x10 <sup>6</sup>
			10 <sup>-7</sup>	7.5x10 <sup>7</sup>	7.1x10 <sup>6</sup>	1.1x10 <sup>8</sup>	3.5x10 <sup>7</sup>
	SARM 0.132 SASM 0.154	MH	10 <sup>-6</sup>	4.7x10 <sup>7</sup>	3.5x10 <sup>6</sup>	6.1x10 <sup>7</sup>	7.8x10 <sup>6</sup>
			10 <sup>-7</sup>	1.6x10 <sup>8</sup>	3.5x10 <sup>7</sup>	1.1x10 <sup>8</sup>	4.2x10 <sup>7</sup>

DNPC: demasiado numerosas para contar > 6,500 veces el valor recíproco del volumen de muestra usado.

Desv.: Desviación estándar

Para la segunda prueba de verificación del método de estandarización, sólo se realizó recuento de las diluciones 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-7</sup>, debido a que en estas diluciones se obtuvieron recuentos contables. Teniendo en cuenta que en el primer ensayo la cepa SASM en caldo MH obtuvo concentraciones muy alejadas de la concentración deseada, para la siguiente verificación, se estableció una absorbancia mayor a la establecida inicialmente (0.08-0.13) cercana a 0.15 solo para esta cepa en dicho caldo.

Debido a los datos de las diluciones seriadas, se delimitaron nuevos rangos para cada cepa en cada caldo, siendo los siguientes:

- SARM en MH: 0.13-0.14
- SARM en MHS: 0.14-0.15
- SASM en MH: 0.15-0.16
- SASM en MHS: 0.14-0.15

La literatura expresa que el rango de absorbancia entre 0.08-0.13 <sup>(87)</sup>, da lugar esos recuentos a una concentración de  $10^8$  UFC/mL, sin embargo, en trabajo de investigación, se decidió aumentar los rangos de absorbancia para cada cepa, ya que los valores obtenidos reportaban unas concentraciones menores a la reportada por la literatura.

### 5.7 Determinación de la CIM por el método de microdilución en caldo

En la tabla N°9 se describen las CIM obtenidas en los ensayos de los extractos, se debe tener en cuenta que el resultado mostrado, no varió en las cuatro veces en que se elaboró el análisis.

Tabla N°9. Concentraciones inhibitorias mínimas de los extractos de romero y recuento de los controles positivos.

Cepa	Caldo	CIM de extracto etanólico (mg/mL)	CIM de extracto hidroalcohólico (mg/mL)	Resultados de control positivo (UFC/mL)	
				Recuento	Desv.
SARM	MH	2	1	$1.9 \times 10^5$	$5.7 \times 10^3$
	MHS	2	1	$2.1 \times 10^5$	$9.9 \times 10^3$
SASM	MH	2	2	$2.2 \times 10^5$	$2.1 \times 10^3$
	MHS	4	2	$2.0 \times 10^5$	$3.54 \times 10^3$

Al realizar las distintas pruebas de determinación de CIM de los extractos, se pudo observar que el extracto hidroalcohólico presenta las CIM más bajas para la cepa SARM, siendo ésta, 1 mg/mL en los medios de cultivo de prueba; mientras que para la cepa SASM, en el extracto hidroalcohólico, se obtuvo una

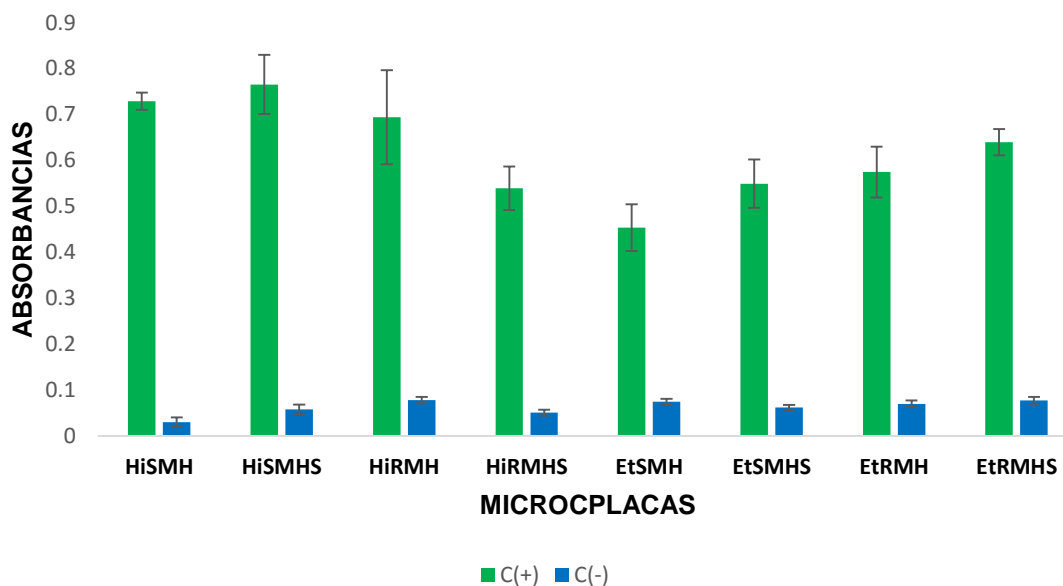
CIM de 2 mg/mL en ambos medios de cultivo. En cuanto al extracto etanólico, para la cepa SARM, se obtuvo una CIM de 2 mg/mL independientemente del medio de cultivo utilizado. Solo para la cepa SASM en el extracto etanólico se observa una diferencia de CIM entre los dos medios de cultivos utilizados, siendo de 2 mg/mL para caldo MH y de 4 mg/mL para caldo MHS.

En un estudio elaborado en Palestina por Jarrar y colaboradores (2010) <sup>(43)</sup>, evaluaron la actividad antimicrobiana de un extracto etanólico, utilizando como solvente etanol al 80%, sobre 5 cepas de SARM. Las CIM para el extracto varían entre 0.78-3.13 mg/mL. Comparando con los datos obtenidos en el presente trabajo, el extracto etanólico a una CIM de 2 mg/mL y el hidroalcohólico a una CIM de 1 mg/mL, los valores coinciden con el rango obtenido en el artículo citado. No se encontró estudios evaluando la actividad antimicrobiana de extracto hidroalcohólico sobre cepas SARM.

En cuanto a la actividad de extractos de romero sobre cepas de *S. aureus* sensible a los antibióticos, se encontró un estudio elaborado en Irak por Ahmed y colaboradores (2011) <sup>(2)</sup>, donde determinaron la CIM de un extracto etanólico de romero sobre cepas de la colección de cultivos del Departamento de Biología del Colegio de Medicina de la Universidad de Bagdad, en donde se obtuvo una CIM de 160 µg/mL (0.16 mg/mL). Al comparar con lo encontrado en el presente trabajo, las CIM encontradas son mucho mayores a la expresada en referencia citada anteriormente, siendo de 2 mg/mL, a excepción del extracto etanólico en caldo MHS, que fue de 4 mg/mL. Esta diferenciación entre los datos obtenidos y los presentados en el artículo citado, se puede deber a la diferencia de método utilizado, ya que ellos utilizaron el método de difusión en disco; además, de las diferencias en las cepas de estudio, ya que las de ellos provenían de una colección diferente a la utilizada en el presente trabajo, que era la cepa ATCC 6538. Además, también se debe tener en cuenta el origen de la planta utilizada, el clima y calidad del suelo donde fue cultivada. Esto afecta, debido a la diferencia

de nutrientes, sol, temperatura, cantidad de agua, a la que estuvieron sometidas las plantas, lo cual puede dar lugar a diferentes metabolitos.

Los menores valores de CIM de los extractos mostrados por la cepa SARM frente a la cepa SASM podrían estar sugiriendo diferencias entre cepas interesantes de ser estudiadas. En cuanto a los extractos, el hidroalcohólico, a manera visual, es donde se obtienen menores CIM, y por tanto, presenta una mayor capacidad antimicrobiana frente a ambas cepas. Esto se puede deber a que el extracto hidroalcohólico presentaba un 30% de agua como solvente, lo que limitó la extracción de lípidos que son muy afines al etanol, además se favorece la extracción de glicósidos, aunque por lo general son poco activos.



**HiSMH:** hidroalcohólico + cepa sensible + caldo MH.

**HiRMH:** hidroalcohólico + cepa resistente + caldo MH.

**EtSMH:** etanólico + cepa sensible + caldo MHS

**EtRMH:** etanólico + cepa resistente + caldo MH

**HiSMHS:** hidroalcohólico + cepa sensible + caldo MHS.

**HiRMHS:** hidroalcohólico + cepa resistente + caldo MHS.

**EtSMHS:** etanólico + cepa sensible + caldo MHS

**EtRMHS:** etanólico + cepa resistente + caldo MHS

Figura N°10. Absorbancias de controles positivos y negativos de cada microplaca.



En la tabla N°9, también se indican los resultados del recuento de control para cada cepa. Los valores se encuentran cercanos al valor ideal que es  $5.0 \times 10^5$  UFC/mL, ello indica, que el proceso de estandarización al momento de elaborar el análisis de microdilución para los extractos, es correcto. Además, el control negativo, el cual estaba constituido por medio de cultivo (caldos MH y MHS), cumplió con los requisitos, debido a que no se obtuvo crecimiento microbiano. Las diferencias de absorbancias entre los controles positivos y negativos se muestran en la figura N°10, notándose una marcada diferencia en todas las microplacas.

En esta primera prueba, el análisis de la vancomicina no mostró CIM en ninguna de las concentraciones analizadas, por ello, se elaboró una segunda prueba con concentraciones menores con el fin de obtener un resultado de CIM.

En el segundo ensayo para determinar la CIM de la vancomicina, se analizaron 20 concentraciones, siendo la mayor 1 mg/mL, y la menor,  $1.0 \times 10^{-6}$  mg/mL. Los datos se muestran en la tabla N°10 tanto en mg/mL como en  $\mu\text{g/mL}$ .

Tabla N°10. Concentraciones inhibitorias mínimas de la vancomicina y recuento de los controles positivos.

Cepa	Caldo	Vancomicina ( $\mu\text{g/mL}$ )	Resultados de control positivo (UFC/mL)	
			Recuento	Desv.
SARM	MH	0.49	$2.0 \times 10^5$	$2.8 \times 10^3$
	MHS	0.98	$2.1 \times 10^5$	$4.2 \times 10^3$
SASM	MH	0.98	$2.1 \times 10^5$	$1.4 \times 10^3$
	MHS	0.98	$2.2 \times 10^5$	$1.4 \times 10^3$

Desv.: Desviación estándar.

Los valores de CIM obtenidos para vancomicina determinados en las cepas SARM y SASM, se encontraron en el rango de corte clínico establecido por Mensa y colaboradores (2013) <sup>(59)</sup>, debido a que se obtienen concentraciones menores a  $1 \mu\text{g/mL}$ , por tanto se considera que ambas cepas son sensibles a la vancomicina. En cuanto a la cepa SARM, hay que tener en cuenta que el

mecanismo de resistencia a la metilina no es el mismo mecanismo de resistencia a la vancomicina <sup>(19)</sup>.

Al comparar los resultados de CIM obtenidos en los extractos con los de la vancomicina, se concluye que la vancomicina posee mejor eficacia frente a ambas cepas de *S. aureus*, debido a que las CIM obtenidas por la vancomicina son menores en comparación con los datos de CIM obtenidos para los extractos de romero, lo que viene a confirmar la sensibilidad de ambas cepas reportada en la literatura anteriormente descrita, mientras que los extractos presentan una variedad de metabolitos en las que su actividad antimicrobiana puede estar afectada por ciertos factores: baja concentración de dichos metabolitos, compuestos antagonistas o la presencia de metabolitos secundarios mayoritarios que enmascaran la actividad de los compuestos secundarios minoritarios.

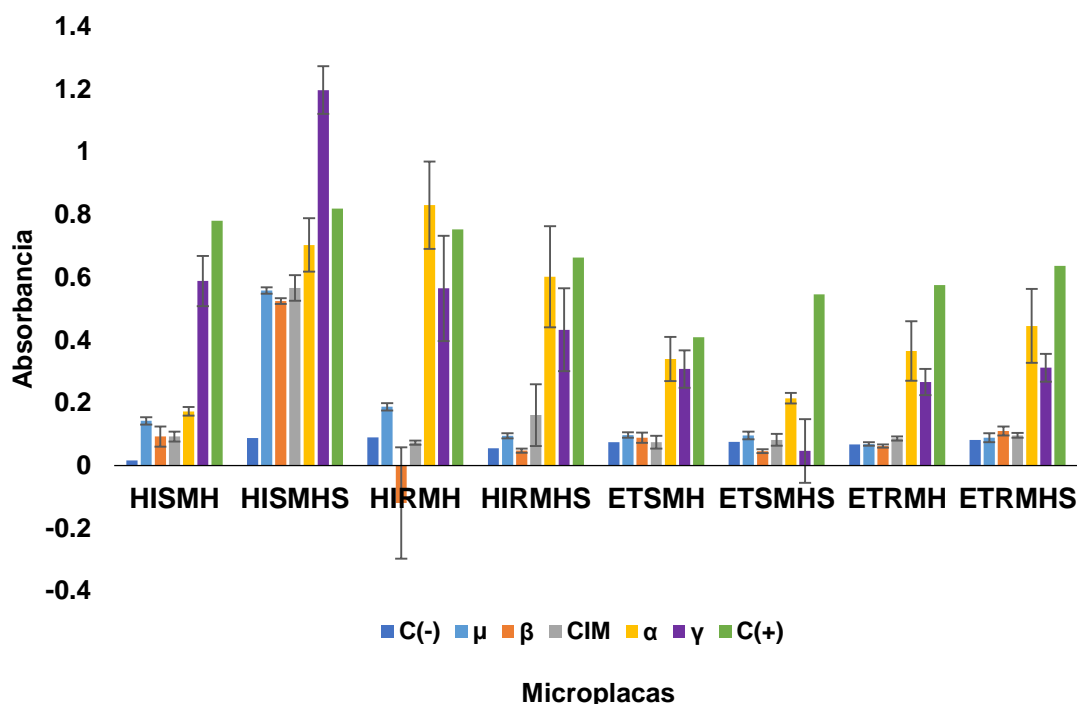
Wang y colaboradores (2006) <sup>(86)</sup>, demostraron que 12 cepas de SARM y 11 cepas de SASM originarias de Estados Unidos, obtuvieron una CIM  $\geq 2 \mu\text{g/mL}$  frente a la vancomicina, dichas cepas fueron recolectadas durante un período de 5 años, entre 2000 y 2004. Silvestre y colaboradores (2013) <sup>(75)</sup>, obtuvieron la CIM de vancomicina frente a 93 cepas de SARM originarias de Portugal, obteniendo valores de CIM entre  $0.75 \mu\text{g/mL}$  a  $2 \mu\text{g/mL}$ . Comparando los valores obtenidos con los reportados en los artículos anteriores, se observa que estos valores de CIM para vancomicina obtenidos en el presente estudio ( $0.49 \mu\text{g/mL}$  y  $0.98 \mu\text{g/mL}$ ) se encuentran dentro de los valores de CIM obtenidos en los estudios anteriormente descritos.

En un estudio elaborado en España por Ramos y colaboradores (2013) <sup>(71)</sup>, analizaron muestras clínicas de *S. aureus* obtenidas en el período 2004-2012. Los datos muestran que el 14.53% de cepas estudiadas presentan una CIM a vancomicina  $\geq 2 \mu\text{g/mL}$ . Al comparar los datos obtenidos con el presentado en el artículo, se observa que las cepas estudiadas en España presentan una CIM mayor que las analizadas en el presente trabajo, debido que a la CIM obtenida

fue de 0.98  $\mu\text{g/mL}$ , que está dentro del límite de corte clínico establecido por Mensa y colaboradores (2013).

Además de observar visualmente el pozo donde hay inhibición del crecimiento de los microorganismos, la medición en el equipo de espectrofotometría permitió obtener los datos mostrados en el de gráfico de barras para extractos (Figura N°11) y para vancomicina (Figura N°12).

Como se puede apreciar, se presentan cinco absorbancias para cada microplaca; la CIM observada visualmente en cada condición (establecida en el centro de cada grupo de barras), dos concentraciones mayores siguientes a la CIM ( $\mu$ ,  $\beta$ ) y dos concentraciones menores a la CIM ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ), a las cuales se les han agregado barras de error. El método de tabulación de los datos de absorbancia se especifica en el anexo N°19 y en el anexo N°20 se reportan los datos tabulados. Además, se han agregado las absorbancias del control positivo (C+) y control negativo (C-). De esta manera se puede observar como varían las absorbancias de los pocillos en cada microplaca. Ejemplos de microplacas luego de incubar se presentan en el anexo N°21. En ellas se describe el crecimiento del microorganismo hasta una concentración específica, y se puede distinguir, que los extractos a mayor concentración, presentan un cierto precipitado sobre los pocillos, que va disminuyendo a medida disminuye la concentración del extracto. Las gráficas revelan como la menor concentración del extracto de cada microplaca ( $\gamma$ ) presenta valores cercanos a los obtenidos por el control positivo (C+). Por otro lado, además en varios casos se puede observar que las concentraciones menores a la CIM ( $\alpha$ ,  $\gamma$ ), sobrepasan en valor de absorbancia al control positivo, esto sugiere, que pueden existir factores diferentes al crecimiento del microorganismo que afecten la lectura de absorbancia, como la coloración propia de los extractos (el extracto hidroalcohólico presenta una coloración más oscura que el etanólico), calidad de las microplacas, algoritmos de lectura del equipo, y el desempeño del personal de análisis.



**HISMH:** hidroalcohólico + cepa sensible + caldo MH.

**HIRMH:** hidroalcohólico + cepa resistente + caldo MH.

**ESMH:** etanólico + cepa sensible + caldo MHS

**ETRMH:** etanólico + cepa resistente + caldo MH

**HiSMHS:** hidroalcohólico + cepa sensible + caldo MHS.

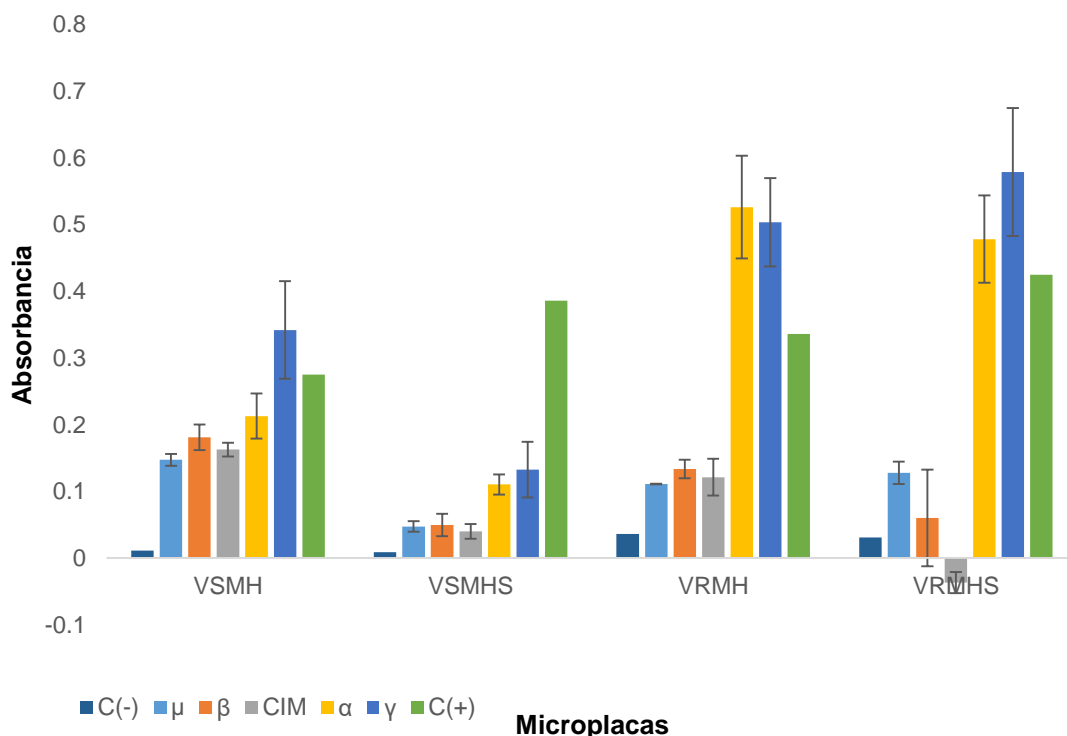
**HiRMHS:** hidroalcohólico + cepa resistente + caldo MHS.

**EtSMHS:** etanólico + cepa sensible + caldo MHS

**EtRMHS:** etanólico + cepa resistente + caldo MHS

Figura N°11. Absorbancias obtenidas en ensayo CIM de los extractos.

Se observa en la Figura N°11, que el extracto etanólico presenta unas absorbancias menores al ser comparadas con las absorbancias del extracto hidroalcohólico, posiblemente debido a que el extracto hidroalcohólico presentaba una coloración mucho más oscura al ser diluido, por tanto, esto influye directamente en los resultados del análisis estadístico, ya que dicha diferencia de coloración presenta diferencias de absorbancias muy marcadas entre los extractos. Además se observa que las absorbancias de los controles negativos a pesar de ser menor a todas presento un valor positivo, esto se debe a que se utilizó como blanco el aire.



**VSMH:** hidroalcohólico + cepa sensible + caldo MH.

**VRMH:** hidroalcohólico + cepa resistente + caldo MH.

**VSMHS:** hidroalcohólico + cepa sensible + caldo MHS.

**VRMHS:** hidroalcohólico + cepa resistente + caldo MHS.

Figura N°12. Absorbancias obtenidas en ensayo CIM de vancomicina.

En la figura N°12 se muestra que la cepa SARM presenta una mayor sensibilidad a la vancomicina, debido a que se refleja en los valores de absorbancia. Ello sugiere que la cepa SASM, si bien presenta una CIM sensible a la vancomicina, estas diferencias sugieren diferencias entre cepas interesantes de ser estudiadas para poder establecer los riesgos de mutación de las cepas a fenotipos resistentes a diferentes antibióticos.

### 5.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, se trabajó con las absorbancias que se obtuvieron en cada análisis de cada extracto y de la vancomicina. Se utilizaron las absorbancias

de 5 concentraciones por cada análisis, entre 0.5 mg/mL y 8 mg/mL, debido a que en estas concentraciones se observa una relación lineal entre los datos en la relación absorbancia-concentración. Además, se tienen datos cuantitativos con los cuales determinar si hay o no diferencias significativas en los resultados obtenidos de las absorbancias, es decir, el crecimiento respecto a los diferentes extractos.

En la tabla N° 11, se expresan los resultados obtenidos para el análisis de varianza de las absorbancias de los extractos. En el cuadro se analizan combinaciones de factores para determinar si dicha combinación es significativa a la hora de obtener las absorbancias de cada pocillo.

Tabla N°11. Análisis de la varianza para absorbancias de los extractos.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A:EXTRACTO</b>	1.0582	1	1.0582	57.45	0.0000
<b>B:MICROORGANISMO</b>	0.480925	1	0.480925	26.11	0.0000
<b>C:MEDIO</b>	0.616529	1	0.616529	33.47	0.0000
<b>D:CONCENTRACION</b>	4.07838	4	1.0196	55.35	0.0000
<b>INTERACCIONES</b>					
<b>AB</b>	0.701985	1	0.701985	38.11	0.0000
<b>AC</b>	0.556724	1	0.556724	30.22	0.0000
<b>AD</b>	1.27452	4	0.31863	17.30	0.0000
<b>BC</b>	0.479829	1	0.479829	26.05	0.0000
<b>BD</b>	0.114111	4	0.0285277	1.55	0.1916
<b>ABC</b>	0.831169	1	0.831169	45.12	0.0000
<b>ABD</b>	0.219532	4	0.054883	2.98	0.0214
<b>RESIDUOS</b>	2.50509	136	0.0184198		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>12.917</b>	<b>159</b>			

Teniendo en cuenta que se ha utilizado un nivel de confianza de 95%, todos aquellos valores-P que son menores a 0.05, son estadísticamente significativos

a la hora de obtener los datos de absorbancias, es decir tienen un efecto significativo sobre el crecimiento del microorganismo. De esta manera, se observa que la interacción microorganismo-medio (BD) no es significativa sobre los datos de absorbancias debido a que el valor-P obtenido es mayor que 0.05, lo que sugiere que independientemente del medio de cultivo y la cepa utilizada, los datos que se obtendrán serán similares. En cambio, el resto de interacciones, junto a los efectos principales, sí son significativos sobre las absorbancias, debido a que se obtuvieron valores-P menores que 0.05, y por tanto, si es necesario tener en cuenta dichos factores para poder obtener resultados similares.

En las tablas N°12, 13, 14 y 15, se analizan los resultados de la prueba LSD obtenidos a partir de las absorbancias de las CIM presentadas por los extractos. Además de los datos correspondientes a la CIM, también se toman en cuenta las absorbancias de dos concentraciones mayores y dos concentraciones menores a ésta.

Tabla N° 12. Resultados de prueba LSD para absorbancias por extracto.

<b>Extractos</b>				
	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
ET	80	0.178638	0.0151739	X
HI	80	0.341287	0.0151739	X
<b>Contraste</b>	<b>Sig.</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>	
ET - HI	*	-0.16265	0.0424368	

\* Indica diferencia significativa

En tabla N°12, se observa la mínima diferencia significativa entre los extractos. La posición de las X's en la columna grupos homogéneos indica que quienes comparten la misma columna de las X no poseen diferencia significativa, en este caso existe diferencia significativa la cual es de -0.16265 lo que indica que los valores de absorbancia del extracto etanólico son menores que los obtenidos por el extracto hidroalcohólico, es decir, que el extracto etanólico presenta una mayor

eficacia al inhibir ambas cepas en ambos medios de cultivo que el extracto hidroalcohólico.

Este resultado puede ser interpretado como que a mayor absorbancia del extracto hidroalcohólico, presenta una menor eficacia antimicrobiana comparada con el extracto etanólico. Sin embargo, al observar la Figura N°11, se muestra que las absorbancias de las concentraciones mayores de dicho extracto, superan los resultados de absorbancia del control positivo, esto se debe a la diferencia de coloración que presentan los extractos, ya que el extracto hidroalcohólico presentó una coloración más oscura al ser diluido, y a pesar de haber realizado la corrección de los valores con el valor de la absorbancia de los extractos solos, parece no haber sido suficiente para poder estandarizar de mejor manera los resultados, ya que los resultados visuales arrojaron una mayor efectividad (menor CIM) del extracto hidroalcohólico.

Tabla N° 13. Resultados de prueba LSD para absorbancias por microorganismos.

<b>Microorganismos</b>				
	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
SARM	80	0.205138	0.0151739	X
SASM	80	0.314788	0.0151739	X
<b>Contraste</b>	<b>Sig.</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>	
SARM - SASM	*	-0.10965	0.0424368	

\* Indica diferencia significativa

El análisis LSD de los resultados de absorbancia de las diferentes cepas señaló que fueron significativamente diferentes, y a la vez, indicó que los valores menores fueron los de la cepa SARM, lo cual sugiere, que dicha cepa presenta una mayor sensibilidad en ambos extractos en ambos medios de cultivo, lo cual es consistente con los resultados de las CIM determinadas visualmente, que se encontraron entre 1 y 2 mg/mL para la cepa SARM, y entre 2 y 4 mg/mL para la cepa SASM.



Tabla N°14. Resultados de prueba LSD para absorbancias por medios de cultivo.

Medios				
	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
MH	80	0.197887	0.0151739	X
MHS	80	0.322038	0.0151739	X
<b>Contraste</b>	<b>Sig.</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>	
MH - MHS	*	-0.12415	0.0424368	

\* Indica diferencia significativa

Los resultados del análisis LSD para absorbancias de medios de cultivo, indica que los resultados fueron significativamente diferentes, mostrando que los valores más bajos se observaron en el caldo MH, lo que revela que en dicho medio se obtuvo una mayor inhibición de ambas cepas. Dichos resultados son consistentes con los observados en la CIM, sobre todo en la cepa SASM en extracto etanólico, ya que se obtiene una CIM de 2 mg/mL en caldo MH y una CIM de 4 mg/mL en caldo MHS.

Tabla N°15. Resultados de prueba LSD para absorbancias por concentración.

Concentración				
mg/mL	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos homogéneos
2	32	0.132344	0.023992	X
4	32	0.155375	0.023992	X
8	32	0.163531	0.023992	X
1	32	0.288406	0.023992	X
0.5	32	0.560156	0.023992	X
<b>Contraste</b>	<b>Sig.</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>	
0.5 - 1	*	0.27175	0.0670985	
0.5 - 2	*	0.427813	0.0670985	
0.5 - 4	*	0.404781	0.0670985	
0.5 - 8	*	0.396625	0.0670985	
1 - 2	*	0.156062	0.0670985	
1 - 4	*	0.133031	0.0670985	
1 - 8	*	0.124875	0.0670985	
2 - 4		-0.0230312	0.0670985	
2 - 8		-0.0311875	0.0670985	
4 - 8		-0.00815625	0.0670985	

\* Indica diferencia significativa

La tabla N° 15 muestra los resultados del análisis LSD de los promedios de las absorbancias obtenidas a las diferentes concentraciones de los extractos estudiados. Muestra que los valores obtenidos a las concentraciones 2, 4 y 8 mg/mL, al ser contrastados entre sí, no poseen una diferencia significativa, lo que revela que dichas concentraciones se obtuvieron resultados similares, es decir, al alcanzar la CIM, ya no se observa disminución significativa del crecimiento, porque a partir de dicha CIM, las concentraciones mayores, presentan igual eficacia. En cuanto al comparar las concentraciones 1 y 0.5 mg/mL entre sí, y con el resto de concentraciones, se obtienen diferencias significativas entre ellos, lo que significa que a concentraciones menores presenta mayor diferencia en las absorbancias, siendo la más grande entre 0.5-2 mg/mL, concluyendo que a 2 mg/mL se tiene una mayor inhibición.

En cuanto al análisis estadístico de la vancomicina, al elaborar el análisis de varianza, solo se toman en cuenta si el medio, el microorganismo o la concentración influyen en la absorbancia, dichos datos se muestran en tabla N°16.

Tabla N°16. Análisis de varianza para absorbancias de vancomicina.

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
<b>EFFECTOS PRINCIPALES</b>					
<b>A:MICROORGANISMO</b>	0.107486	1	0.107486	5.97	0.0179
<b>B:MEDIO</b>	0.0424094	1	0.0424094	2.36	0.1308
<b>C:CONCENTRACION</b>	0.95053	5	0.190106	10.57	0.0000
<b>RESIDUOS</b>	0.93548	52	0.01799		
<b>TOTAL (CORREGIDO)</b>	<b>2.20369</b>	<b>59</b>			

Gl: grados de libertad

Se observa que solo los microorganismos y la concentración muestran un efecto significativo a la hora de obtener las absorbancias para la vancomicina. El efecto del medio de cultivo sobre el crecimiento del microorganismo de prueba no se

considera significativo, ya el análisis de varianza mostró una  $P > 0.05$  en el análisis de las medias relacionadas con esta variable. Por tanto, independiente del medio que se utilice, los valores obtenidos serán similares. En cambio el microorganismo y la concentración si influyen significativamente en el crecimiento microbiano, y por tanto, si importa la cepa utilizada y la concentración de vancomicina para obtener diferencias en las absorbancias.

De los resultados de la CIM de vancomicina, se debe de tomar en cuenta que la cepa resistente presenta una CIM menor que la obtenida por la cepa sensible.

En las tablas N°17 y 18, se muestran los datos de la prueba LSD para las absorbancias obtenidas en el análisis de la vancomicina.

Tabla N°17. Resultados de prueba LSD para absorbancias por microorganismos.

<b>Microorganismos</b>				
	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
SASM	30	0.183538	0.0282311	X
SARM	30	0.271385	0.025362	X
<b>Contraste</b>	<b>Sig.</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>	
SARM - SASM	*	0.0878462	0.0721164	

\* Indica diferencia significativa

En la tabla N°17, se muestra el análisis de LSD para los promedios de absorbancia mostrados en los análisis por los dos tipos de microorganismos ensayados, en ella se observa que al ser positiva la diferencia, revela que los resultados obtenidos por la cepa SASM presentan menores absorbancias que los obtenidos por la cepa SARM, lo que sugiere en términos generales, que la cepa SASM presenta una mayor sensibilidad a la vancomicina que la cepa SARM, tanto en ambos medios de cultivo, como en las concentraciones analizadas.

Dichos datos presentan una discordancia con los datos de CIM obtenidos visualmente, debido a que la cepa resistente, obtiene en el caldo MH, una CIM

de 0.49 µg/mL, en cambio, la cepa sensible, mostró una CIM de 0.98 µg/mL; mientras que en el caldo MHS, ambas cepas obtienen la misma CIM (0.98 µg/mL). Sin embargo, es necesario recordar que los recuentos obtenidos en los controles positivos de la cepa SARM fueron ligeramente mayores que los de la SASM (Tabla 5), por lo que a pesar de los cálculos de estandarización realizados podría haber influido al momento del análisis estadístico.

Tabla N°18. Resultados de prueba LSD para absorbancias por concentración.

<b>Concentración</b>				
<b>µg/mL</b>	<b>Casos</b>	<b>Media LS</b>	<b>Sigma LS</b>	<b>Grupos homogéneos</b>
0.98	12	0.0751667	0.0387191	X
1.9	12	0.100417	0.0387191	X
3.9	9	0.131282	0.0455606	XX
0.49	12	0.23075	0.0387191	X
0.24	12	0.395	0.0387191	X
0.12	3	0.432154	0.0817838	X
<b>Contraste</b>	<b>Sig.</b>	<b>Diferencia</b>	<b>+/- Límites</b>	
0.12 - 0.24		0.0371538	0.181574	
0.12 - 0.49	*	0.201404	0.181574	
0.12 - 0.98	*	0.356987	0.181574	
0.12 - 1.9	*	0.331737	0.181574	
0.12 - 3.9	*	0.300872	0.192739	
0.24 - 0.49	*	0.16425	0.109878	
0.24 - 0.98	*	0.319833	0.109878	
0.24 - 1.9	*	0.294583	0.109878	
0.24 - 3.9	*	0.263718	0.119979	
0.49 - 0.98	*	0.155583	0.109878	
0.49 - 1.9	*	0.130333	0.109878	
0.49 - 3.9		0.0994679	0.119979	
0.98 - 1.9		-0.02525	0.109878	
0.98 - 3.9		-0.0561154	0.119979	
1.9 - 3.9		-0.0308654	0.119979	

\* Indica diferencia significativa

En la tabla N°18, se muestran las diferencias significativas presentes en los promedios de absorbancia obtenidos para las distintas concentraciones de vancomicina estudiadas. Se observa que aquellas concentraciones que presentan una X a un mismo nivel, no presentan diferencias significativas entre sí. En dicho cuadro se muestra que la mayor diferencia se obtiene entre 0.12-0.98  $\mu\text{g/mL}$ , siendo a 0.98  $\mu\text{g/mL}$  en donde se tiene una mayor inhibición de las cepas.

### **5.9 Presentación de los resultados**

Los resultados de CIM obtenidos por parte de los extractos etanólico e hidroalcohólico y de la vancomicina, fueron presentados al Laboratorio Nacional de Referencia y a APROCSAL. El formato de presentación de los resultados se observa en el anexo N°22.

**CAPITULO VI**  
**CONCLUSIONES**

## 6. CONCLUSIONES

1. Utilizando etanol al 90 % v/v como solvente de extracción, se obtuvo un porcentaje de rendimiento levemente mayor que al utilizarlo al 70% v/v, sin embargo, esta diferencia de porcentaje de rendimiento no afecta la capacidad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico, ya que en éste, se obtuvieron menores concentraciones inhibitorias mínimas.
2. Las pruebas realizadas a las cepas provistas por el Laboratorio Nacional de Referencia y el Laboratorio de Microbiología, demostraron que corresponden a *Staphylococcus aureus*. Además, la prueba de agar Sangre reveló ciertas diferencias en la lisis de eritrocitos, indicando diferencias a nivel bioquímico entre ellas.
3. La cepa proporcionada por el Laboratorio Nacional de Referencia, presentó un halo de 16 mm en ensayo de sensibilidad con discos de cefoxitina por lo que se considera resistente a este antibiótico y en consecuencia, a la meticilina; mientras que la cepa provista por el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, presentó un halo de 26 mm lo cual indica su sensibilidad a la meticilina.
4. Para inhibir el crecimiento de la cepa resistente, el extracto etanólico presenta una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 2 mg/mL; mientras que para inhibir el crecimiento de la cepa sensible, se necesita una concentración de 4 mg/mL, en las condiciones experimentales utilizadas en este estudio.
5. El extracto hidroalcohólico inhibe el crecimiento de la cepa resistente a una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 1 mg/mL, mientras que para la cepa sensible, dicha concentración fue de 2 mg/mL.

6. El extracto hidroalcohólico presenta una menor concentración inhibitoria mínima (CIM) de 1 mg/mL frente a la cepa resistente que la presentada por el extracto etanólico, que fue de 2 mg/mL.
7. La vancomicina presenta una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 0.49 µg/mL frente a la cepa resistente; mientras que para la cepa sensible, se obtuvo una concentración inhibitoria mínima (CIM) de 0.98 µg/mL. Ello sugiere que la vancomicina sigue siendo efectiva frente a ambas cepas.
8. Los resultados del análisis estadístico indicaron que los extractos a unas concentraciones mayores de 2 mg/mL, presentan actividad bactericida frente a ambas cepas de *Staphylococcus aureus* analizadas; mientras que, dicha actividad se observa a concentraciones mayores de 0.98 µg/mL cuando se realiza el ensayo con vancomicina.



**CAPITULO VII**  
**RECOMENDACIONES**

## 7.0 RECOMENDACIONES

1. Para próximos ensayos, los investigadores deben contar con un equipo de evaporación de extractos vegetales que presente todo el instrumental requerido, para asegurar que en dicho proceso los factores de temperatura y presión, se adecúen al proceso establecido.
2. Elaborar extractos de romero utilizando distintos métodos de extracción, con el objetivo de determinar con cuál método es posible obtener diferencias en metabolitos y actividad antimicrobiana.
3. Realizar pruebas de concentración inhibitoria mínima de los extractos frente a diversos microorganismos, tanto sensibles como resistentes a los antibióticos, y con ello, determinar el espectro de acción de los extractos de romero.
4. Comprobar las concentraciones inhibitorias mínimas de los extractos utilizando los métodos dilución en agar y macrodilución en caldo, teniendo en cuenta las características que presenta cada método.
5. Realizar pruebas de toxicidad agudas, crónicas y pruebas de toxicidad a largo plazo a los extractos para poder determinar si dichos extractos son inocuos para su posible uso en humanos.
6. Identificar los metabolitos responsables de la actividad antimicrobiana, además de una estandarización química de ambos extractos, como base para la posterior determinación de su toxicidad, concentración inhibitoria mínima (CIM), y la dosis letal al 50% (LD<sub>50</sub>), con el fin de establecer si dichos extractos pueden ser considerados en investigaciones posteriores.

## BIBLIOGRAFIA

1. Abu-Al-Basal, M. A. (2010). Healing potential of *Rosmarinus officinalis* L. on full-thickness excision cutaneous wounds in alloxan-induced-diabetic BALB/cmice. *Journal of Ethnopharmacology*, 131, 443-450.
2. Ahmed, S. J.; Rashid, K. I.; Al-Azawee, R. K.; Abdel-Karim, M. M. (2011). Study of the antimicrobial activity of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) callus extract and selected types of antibiotics against some bacterial species. *Al-Taqani*, 24(4), 128-138.
3. Al-Sereiti, M. R.; Abu-Amer, K. M.; Sen, P. (1999). Pharmacology of rosemary (*Rosmarinus officinalis* Linn.) and its therapeutic potentials. *Indian Journal of Experimental Biology*, 37, 124-130.
4. Altinier, G.; Sosa, S.; Aquino, R. P.; Mencherini, T.; Della Loggia, R.; Tubaro, A. (2007). Characterization of Topical Antiinflammatory Compounds in *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 1718-1723.
5. Álvarez Lam, I.; Ponce Bittar, J. (2012). *Staphylococcus aureus*, evolución de un viejo patógeno. *Revista Cubana de Pediatría*, 84(2), 383-391.
6. Angioni, A.; Barra, A.; Cereti, E.; Barile, D.; Coïson, J. D.; Arlorio, M.; Dessi, S.; Coroneo, V.; Cabras, P. (2004). Chemical Composition, Plant Genetic Differences, Antimicrobial and Antifungal Activity Investigation of the Essential Oil of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3530-3535.
7. Argueta Cañas, Z. N.; Vázquez Rivera, M. V. (2009). *Aplicación del método Mitscher en la determinación de la actividad antimicrobiana de un preservante natural patentado sobre Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa y Candida albicans*. Universidad de El Salvador.
8. Arredondo E., R. (2009). *Staphylococcus* de la comunidad meticilino resistente (descripción de un caso). <http://www.imt.edu.py/admin/uploads/Documento/samr.pdf>, visto el día 16/19/2015.

9. Ávila-Sosa, R.; Navarro Cruz, A. R.; Vera-López, O.; Dávila-Márquez, R. M.; Melgoza-Palma, N.; Meza-Pluma, R. (2011). Romero (*Rosmarinus officinalis* L.): una revisión de sus usos no culinarios. *Ciencia y mar*, 15(43), 23-26.
10. Bakirel, T.; Bakirel, U.; Keleş, O. Ü.; Ülgen, S. G.; Yardibi, H. (2008). In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 64-73.
11. Ben Jemia, M.; Tundis, R.; Maggio, A.; Rosselli, S.; Senatore, F.; Menichini, F.; Bruno, M.; Kchouk, M.E.; Loizzo, M.R. (2013). NMR-based quantification of rosmarinic and carnosic acids, GC–MS profile and bioactivity relevant to neurodegenerative disorders of *Rosmarinus officinalis* L. extracts. *Journal of Functional Foods*, 5, 1873-1882.
12. Beretta, G.; Artali, R.; Maffei Facino, R.; Gelmini, F. (2011). An analytical and theoretical approach for the profiling of the antioxidant activity of essential oils: The case of *Rosmarinus officinalis* L. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 55, 1255-1264.
13. Besinis, A.; De Peralta, T.; Handy, R. D. (2014). The antibacterial effects of silver, titanium dioxide and silica dioxide nanoparticles compared to the dental disinfectant chlorhexidine on *Streptococcus mutans* using a suite of bioassays. *Nanotoxicology*, 8(1), 1-16.
14. Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos. (2014). Shock séptico. <https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000668.htm>, visto el día 16/10/2015.
15. Brooks, G. F.; Carrol, K. C.; Butel, J. S.; Morse, S. A.; M., Timothy A. (2011). *Microbiología médica*. 25ª Edición. México, Distrito Federal. McGraw-Hill Interamericana Editores. Pag: 185-188.
16. Cantrell, C. L.; Richeimer, S. L.; Nicholas, G. L.; Schmidt, B. K.; Bailey, D. T. (2005). seco-Hinokiol, a New Abietane Diterpenoid from *Rosmarinus officinalis*. *Journal of Natural Products*, 68(1), 98-100.

17. Carrillo Esper, R.; Zavaleta Bustos, M.; Álvarez Alcántara, H.; Carrillo Córdova, D. M.; Carrillo Córdova, C. A. (2013). La importancia de los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos en la prescripción de antibióticos. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*, 53(3), 5-11.
18. Castaño P., H. I.; Ciro G., G.; Zapata M., J. E.; Jiménez R., S. L. (2010). Actividad bactericida del extracto etanólico y del aceite esencial de hojas de *Rosmarinus Officinalis* L. sobre algunas bacterias de interés alimentario. *Vitae*, (2), 149-154.
19. Castellano González, M. J.; Perozo-Mena, A. J. (2010). Mecanismos de resistencia a Glicopéptidos en *Staphylococcus aureus*. *Kasmera*, 38(1), 36-44.
20. Centers of Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/mrsa/index.html>. *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Infections, Laboratory*. <http://www.cdc.gov/mrsa/lab/#a7>. Visto el día 27/04/2015.
21. Centros para el Control y Prevención de las Enfermedades. (2014). Historia de los CDC. <http://www.cdc.gov/Spanish/acercaCDC/historia.html>, visto el día 16/10/2015.
22. Cervantes-García, E.; García González, R.; Salazar Schettino, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica y Medicina de Laboratorio*, 61(1), 28-40.
23. Convención de Farmacopea de los Estados Unidos de Norteamérica, Farmacopea de los Estados Unidos de América 35 y Formulario Nacional 30. <81> Antibióticos y Valoraciones Microbiológicas. Páginas: 81-88.
24. Cui, L.; Kim, M. O.; Seo, J. H.; Kim, I. S., Kim, N. Y.; Lee, S. H.; Park, J.; Kim, J.; Lee, H. S. (2012). Abietane diterpenoids of *Rosmarinus officinalis* and their diacylglycerol acyltransferase-inhibitory activity. *Food Chemistry*, 132, 1775-1780.

25. Disability guidelines. [www.mdguidelines.com](http://www.mdguidelines.com). *Methicillin Resistant Staphylococcus aureus (MRSA)*. <http://www.mdguidelines.com/methicillin-resistant-staphylococcus-aureus-mrsa>. Visto el día 05/05/2015.
26. [www.drugs.com](http://www.drugs.com). Wolters Kluwer Health, Rosemary. <http://www.drugs.com/npc/rosemary.html>. Visto el día 27/04/2015.
27. Errecalde, J. O.; Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2004). *Uso de antimicrobianos en animales de consumo*. Capítulo 16, página 36.
28. Evans, W. C. (2002). *Pharmacognosy*. 15° Edición. Saunders Elsevier. Páginas: 33, 34, 52, 76, 153, 221, 256, 260, 474.
29. Fernández, L.F; Palomino, O.M.; Frutos, G. (2014). Effectiveness of *Rosmarinus officinalis* essential oil as antihypotensive agent in primary hypotensive patients and its influence on health-related quality of life. *Journal of Ethnopharmacology*, 151, 509-516.
30. Flores Solano, A. L.; Hernández Escobar, A. L.; Valladares Reyes, M. G. (2004). *Determinación de la actividad antifúngica de los aceites esenciales extraídos de Lippia graveolens (Orégano), Rosmarinus officinalis (Romero) y Eucalyptus globulus (Eucalipto) en Microsporum canis, Trichophyton rubrum y Epidermophyton floccosum*. Universidad de El Salvador.
31. Gachkar, L.; Yadegari, D.; Bagher Rezaei, M.; Taghizadeh, M.; Alipoor Astaneh, S.; Rasooli, I. (2007). Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, 102, 898-904.
32. Gadea Carrera, E. (1991). NTP 269: Cancerígenos, mutágenos y teratógenos: Manipulación en el laboratorio.
33. García Lujan, C.; Alonso Rojo, S. E.; Rodríguez Martínez, R.; Martínez Romero, A.; Ramírez Baca, P.; Moreno Reséndez, A. (2009). Susceptibilidad *in vitro* de una cepa de *Staphylococcus aureus* resistente a diferentes extractos vegetales. *Revista Agraria Nueva Época*, 6(1, 2, 3), 19-24.

34. García Martos, P.; Fernández del Barrio, M. T.; Paredes Salido, F. (1994). *Microbiología práctica clínica*. 2ª Edición. Servicio Publicaciones UCA. España. Pag: 114-115.
35. Gobernado, M. (2002). Resistencia en *Staphylococcus aureus*, ahora a la vancomicina. *Revista Española de Quimioterapia*, 15(3), Editorial.
36. González, K. (2010). Factor de virulencia. <http://es.slideshare.net/kgonzalez3/11-factor-de-virulencia02>, visto el día 16/10/2015.
37. González-Trujano, M.E.; Peña, E.I.; Martínez, A.L.; Moreno, J.; Guevara-Fefer, P.; Déciga-Campos, M.; López-Muñoz, F.J. (2007). Evaluation of the antinociceptive effect of *Rosmarinus officinalis* L. using three different experimental models in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 476-482.
38. Herbario Nacional de México. (2010). *Rosmarinus officinalis* L. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/URN:catalog:IBUNAM:MEXU:PV1154538>. Visto el día 12/04/2015.
39. Hernández, O. (2013). Caracterización del gen *mecA* de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina aislados de tres grupos poblacionales de la ciudad de Medellín. *Infectio Asociación Colombiana de Infectología*, 17(2), 66-72.
40. Herrera, M. L. (1999). Pruebas de sensibilidad antimicrobiana. Metodología de laboratorio. *Revista Médica del Hospital Nacional de Niños Dr. Carlos Sáenz Herrera*, 34(0), 33-41.
41. Ho, C.T.; Ferraro, T.; Chen Q.; Rosen, R. T.; Huang, M.T. (1994). Phytochemicals in Teas and Rosemary and Their Cancer-Preventive Properties. *Food Phytochemicals for Cancer Prevention*, 547, 2-19
42. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. (2001). *Manual de Procedimientos para la Determinación de la Sensibilidad de los*

*Antimicrobianos en Bacterias Aisladas en Humanos*. Buenos Aires, Argentina. Pag: 32-34

43. Jarrar, N.; Abu-Hijleh, A.; Adwan, K. (2010). Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. alone and in combination with cefuroxime against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 121-123.
44. Johnson, B. M.; Bolton, J. L.; van Breemen, R. B. (2001). Screening Botanical Extracts for Quinoid Metabolites. *Chemical Research in Toxicology*, 14, 1546-1551.
45. Klancnik, A.; Guzej, B.; Hadolin Kolar, M.; Abramovic, H.; Smole Mozina, S. (2009). In Vitro Antimicrobial and Antioxidant Activity of Commercial Rosemary Extract Formulations. *Journal of Food Protection*, 72(8), 1744-1752.
46. Kontogianni, V. G.; Tomic, G.; Nikolic, I.; Nerantzaki, A. A.; Sayyad, N.; Stosic-Grujicic, S.; Stojanovic, I.; Gerothanassis, I. P.; Tzakos, A. G. (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chemistry*, 136, 120-129.
47. Korman, R. Z. (1963). Coagulase-Negative mutants of *Staphylococcus aureus*: Genetic studies. *Journal of Bacteriology*, 86(3), 363-369.
48. Lai, C.S.; Lee, J. H.; Ho, C.T.; Lui, C. B.; Wang, J.M.; Wan, Y.J.; Pan, M.H. (2009). Rosmanol Potently Inhibits Lipopolysaccharide-Induced iNOS and COX-2 Expression through Downregulating MAPK, NF-KB, STAT3 and C/EBP Signaling Pathways. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(22), 10990-10998.
49. López Tricas, J. M. (2011). Vancomicina: Informe técnico. <http://www.informafarmacia.com/medico-farmaceuticos/informes-tecnicos/vancomicina-informe-tecnico>. Visto el día 01/05/2015.



50. Luján Roca, D. A. (2013). *Staphylococcus aureus* resistente a metilina asociado a la comunidad: aspectos epidemiológicos y moleculares. *Anales de la Facultad de Medicina* 74(1), 57-62.
51. MacFaddin, J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Editorial Médica Panamericana, 3° edición. Capítulos: 5, 6 y 33.
52. Machado, D. G.; Bettio, L. E.B.; Cunha, M. P.; Capra, J. C.; Dalmarco, J. B.; Pizzolatti, M. G.; Rodrigues, A. L. S. (2009). Antidepressant-like effect of the extract of *Rosmarinus officinalis* in mice: Involvement of the monoaminergic system. *Progress in Neuro Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 33, 642-650.
53. Machado, D. G.; Cunha, M.; Neis, V. B.; Balen, G. O.; Colla, A. R.; Grando, J.; Brocardo, P. S.; Bettio, L. E.B.; Dalmarco, J. B.; Rial, D.; Prediger, R. D.; Pizzolatti, M. G.; Rodrigues, A. L. S. (2012). *Rosmarinus officinalis* L. hydroalcoholic extract, similar to fluoxetine, reverses depressive-like behavior without altering learning deficit in olfactory bulbectomized mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 143, 148-159.
54. Machado, D. G.; Cunha, M.; Neis, V. B.; Balen, G. O.; Colla, A. R.; Bettio, L. E.B.; Oliveira, Á.; Pazini, F. L.; Dalmarco, J. B.; Simionatto, E. L.; Pizzolatti, M. G.; Rodrigues, A. L. S. (2013). Antidepressant-like effects of fractions, essential oil, carnosol and betulinic acid isolated from *Rosmarinus officinalis* L. *Food Chemistry*, 136, 999-1005.
55. Martínez Martínez, J. A.; Horcajada Gallego, J. P. (2001). Sepsis y bacteriemia. *Revista Española de Quimioterapia*, 14(3), Editorial.
56. Mascazzini, A. (2014). *Endocarditis y Staphylococcus aureus*. <http://antomascazzini.blogspot.com/2014/07/endocarditis-y-staphylococcus-aureus.html>
57. Medicals Economics Company, Inc. (2000). *PDR for Herbal Medicine*. 645-646.

58. Mengoni, E. S.; Vichera, G.; Rigano, L. A.; Rodríguez-Puebla, M. L.; Galliano, S. R.; Cafferata, E. E.; Pivetta, O. H.; Moreno, S.; Vojnov, A. A. (2011). Suppression of COX-2, IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  expression and leukocyte infiltration in inflamed skin by bioactive compounds from *Rosmarinus officinalis* L. *Fitoterapia*, 82 414-421.
59. Mensa, J.; Soriano, A.; Llinares, P.; Barberán, J.; Montejo, M.; Salavert, M.; Alvarez-Rocha, L.; Maseda, E.; Moreno, A.; Pasquau, J.; Gómez, J.; Parra, J.; Candel, J.; Azanza, J. R.; García, J. E.; Marco, F.; Soy, D.; Grau, S.; Arias, J.; Fortún, J.; Aristides de Alarcón, C.; Picazo, J.; Sociedad Española de Quimioterapia; Sociedad Española de Medicina Interna; GTIPO-Sociedad Española de Anestesiología y Reanimación. (2013). Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Revista Española de Quimioterapia*, 26(Suppl. 1), 1-84.
60. Mlynarczyk, G.; Kochman, M.; Lawrynowicz, M.; Fordymacki, P.; Mlynarczyk, A.; Jeljaszewicz, J. (1998). Coagulase-negative variants of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* subsp. aureus strains isolated from hospital specimens. *Zentralblatt für Bakteriologie*, 288(3), 373-381.
61. Noriega, L. M.; González, P.; Hormazábal, J. C.; Pinto, C.; Canals, M.; Munita, J. M.; Thompson, L.; Marcotti, A.; Pérez, J.; Ibáñez, D.; Araya, P.; Canals, C.; Vial, P. (2008). *Staphylococcus aureus* comunitario resistente a la cloxacilina: Comunicación de los primeros cinco casos descritos en Chile. *Revista Médica de Chile*, 136, 885-891.
62. Okamura, N.; Haraguchi, H.; Hashimoto, K.; Yagi, A. (1994). Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. *Phytochemistry*, 37(5), 1463-1466.
63. Organización Mundial de la Salud. (2013). *Resistencia a los antimicrobianos*. Nota descriptiva N°194.
64. Organización Mundial de la Salud. (2014). *Antimicrobial Resistance, Global Report on Surveillance*. Páginas: 1-2, 19-21, 37.

65. Organización Mundial de la Salud. (2001). *WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance*. Páginas: 11-16.
66. Ozarowski, M.; Mikolajczak, P. L.; Bogacz, A.; Gryszczynska, A.; Kujawska, M.; Jodynis-Liebert, J.; Piasecka, A.; Napieczynska, H.; Szulc, M.; Kujawski, R.; Bartkowiak-Wieczorek, J.; Cichocka, J.; Bobkiewicz-Kozłowska, T.; Czerny, B.; Mrozikiewicz, P. M. (2013). *Rosmarinus officinalis* L. leaf extract improves memory impairment and affects acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities in rat brain. *Fitoterapia*, 91, 261-271.
67. Pertino, M. W.; Theoduloz, C.; Rodríguez, J. A.; Yáñez, T.; Lazo, V.; Shmeda-Hirschmann, G. (2010). Gastroprotective Effect of Carnosic Acid  $\gamma$ -Lactone Derivatives. *Journal of Natural Products*, 73(4), 639-643.
68. Pesavento, G.; Calonico, C.; Bilia, A. R.; Barnabei, M.; Calesini, F.; Addona, R.; Mencarelli, L.; Carmagnini, L.; Di Martino, M. C.; Lo Nostro, A. (2015). Antibacterial activity of Oregano, Rosmarinus and Thymus essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in beef meatballs. *Food Control*, 54, 188-199.
69. Pires Amaral, G.; Rodrigues de Carvalho, N.; Pillon Barcelos, R.; Dobrachinski, F.; de Lima Portella, R.; Hinerasky da Silva, M.; Henrique Lugokenski, T.; Mundstock Dias, G. R.; Almeida da Luz, S. C.; Boligon, A. A.; Athayde, M. L.; Villetti, M. A.; Antunes Soares, F. A.; Fachinetto, R. (2013). Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 55, 48-55.
70. Pizzetti Beninca, J.; Bastos Dalmarco, J.; Pizzolatti, M. G.; Frode, T. S. (2011). Analysis of the anti-inflammatory properties of *Rosmarinus officinalis* L. in mice. *Food Chemistry*, 124, 468-475.
71. Ramos Vicente, N.; Raya Fernández, C.; González Pérez, M. (2013). Estudio retrospectivo de CMI a vancomicina en *S. aureus* en el hospital El Bierzo (2004-2012). *Revista Clínica Española*, 213(Espec Congr): 201.

72. Romero: Infojardín. <http://fichas.infojardin.com/condimentos/rosmarinus-officinalis-romero-romeo-rosmarino.htm>. Visto el día 01/05/2015.
73. Santana-Méridas, O.; Polissiou, M.; Izquierdo-Melero, M.E.; Astraka, K.; Tarantilis, Petros A.; Herraiz-Peñalver, D.; Sánchez-Vioque, R. (2014). Polyphenol composition, antioxidant and bioplague activities of the solid residue from hydrodistillation of *Rosmarinus officinalis* L. *Industrial Crops and Products*, 59, 125-134.
74. Scientific Committees. [http://ec.europa.eu/health/scientific\\_committees/opinions\\_layman/triclosan/es/glosario/pqrs/resistencia-bacteriana.htm](http://ec.europa.eu/health/scientific_committees/opinions_layman/triclosan/es/glosario/pqrs/resistencia-bacteriana.htm), visto el día 16/10/2015.
75. Silvestre, J.; Póvoa, P.; Gonçalves, E.; Martins, F. (2013). Is vancomycin creep a worldwide phenomenon? Assessment of *S. aureus* vancomycin MIC in tertiary university hospital. *Biomed Central Research Notes*, 6(65).
76. Szumny, A.; Figiel, A.; Gutiérrez-Ortíz, A.; Carbonell-Barrachina, Á. A. (2010). Composition of rosemary essential oil (*Rosmarinus officinalis*) as affected by drying method. *Journal of Food Engineering*, 97, 253-260.
77. Tai, J.; Cheung, S.; Wu, M.; Hasman, D. (2012). Antiproliferation effect of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) on human ovarian cancer cells in vitro. *Phytomedicine*, 19, 436-443.
78. Teicoplanina. <http://es.wikipedia.org/wiki/Teicoplanina>. Visto el día 01/05/2015.
79. Thermo Scientific. Agar Manitol Sal. <https://www.fishersci.com/shop/products/thermo-scientific-remel-mannitol-salt-agar-msa/p-4111388>.
80. Torres, C; Cercenado, E. (2010). Lectura interpretada del antibiograma de cocos gram positivos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(8), 541-553.
81. Tu, Z.; Moss-Pierce, T.; Ford, P.; Jiang, T. A. (2013). Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) Extract Regulates Glucose and Lipid Metabolism by Activating

AMPK and PPAR Pathways in HepG2 Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, 2803-2810.

82. Velasco, J.; Contreras, E.; Buitrago, D.; Velazco, E. (2005). Efecto antimicrobiano de *Virola sebifera* sobre *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. *Scientific Journal from the Experimental Faculty of Sciences*, 14(4), 411-415.
83. Ventura-Martínez, R.; Rivero-Osorno, O.; Gómez, C.; González-Trujano, M. E. (2011). Spasmolytic activity of *Rosmarinus officinalis* L. involves calcium channels in the guinea pig ileum. *Journal of Ethnopharmacology*, 127, 1528-1532.
84. Vila, J.; Soriano, A.; Mensa, J. (2008). Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(01), 48-55.
85. Walker, T. S. (2003). *Microbiología*. McGraw-Hill Interamericana Editores. Pag: 134-139.
86. Wang, G.; Hindler, J. F.; Ward, K. W.; Bruckner, D. A. (2006). Increased Vancomycin MICs for *Staphylococcus aureus* Clinical Isolates from a University Hospital during a 5-Year Period. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(11), 3883-3886.
87. Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163-175.
88. Wilson, G. J.; Seo, K. S.; Cartwright, R. A.; Connelley, T.; Chuang-Smith, O. N.; Merriman, J. A.; Guinane, C. M.; Park, J. Y.; Bohach, G. A.; Schlievert, P. M.; Morrison, W. I.; Ross Fitzgerald, J. (2011). A Novel Core Genome-Encoded Superantigen Contributes to Lethality of Community-Associated MRSA Necrotizing Pneumonia. *PLOS Pathogens*, 7(10), 1-16.

89. <http://www.statgraphics.net/wp-content/uploads/2011/12/tutoriales/ANOVA%20Multifactorial.pdf>. Visto el día 21/07/2015.
90. Yan, M.; Li, G.; Petiwala, S. M.; Householter, E.; Johnson, J. J. (2015). Standardized rosemary (*Rosmarinus officinalis*) extract induces Nrf2/sestrin-2 pathway in colon cancer cells. *Journal of Functional Foods*, 13, 137-147.
91. Yesil Celiktas, O.; Hames Kocabas, E.E.; Bedir, E.; Vardar Sukan, F.; Ozek, T.; Baser, K.H.C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chemistry*, 100, 553-559.
92. Yosr, Z.; Hnia, C.; Rim, T.; Mohamed, B. (2013). Changes in essential oil composition and phenolic fraction in *Rosmarinus officinalis* L. var. *typicus* Batt. organs during growth and incidence on the antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 43, 412-419.
93. Yu, M.H.; Choi, J.H.; Chae, I.G.; Im, H.G.; Yang, S.A.; More, K.; Lee, I.S.; Lee, J. (2013). Suppression of LPS-induced inflammatory activities by *Rosmarinus officinalis* L. *Food Chemistry*, 136, 1047-1054.
94. Zaouali, Y.; Bouzaine, T.; Boussaid, M. (2010). Essential oils composition in two *Rosmarinus officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3144-3152.

## GLOSARIO

**Agente mutágeno** <sup>(32)</sup>: se define como una sustancia que posee la capacidad de alterar el material genético presente en las células.

**Agente teratógeno** <sup>(32)</sup>: se define como una sustancia que presenta la capacidad de producir alteraciones en el feto durante su desarrollo intrauterino.

**Bacteriemia** <sup>(55)</sup>: es la presencia de microorganismos viables en la sangre, detectados por hemocultivo.

**Cassette cromosómico estafilocócico** <sup>(19)</sup>: es un elemento genético móvil del cual forma parte el gen *mecA*, los cuales son responsables de la producción de la proteína PBP2a, otorgando resistencia a la meticilina a las cepas de *Staphylococcus aureus*.

**Centro para el Control y Prevención de enfermedades (CDC)** <sup>(21)</sup>: es una agencia estadounidense de promoción de la salud, prevención y preparación del país, destinados a prevenir y controlar enfermedades crónicas e infecciosas y las amenazas para la salud.

**Choque séptico** <sup>(14)</sup>: es una afección que ocurre cuando una infección en todo el cuerpo conlleva a una disminución de la presión arterial a un nivel considerado peligroso.

**Concentración inhibitoria mínima** <sup>(27)</sup>: “es la concentración más baja de droga que previene el crecimiento visible de microorganismos luego de entre 18 y 24 horas de cultivo”

**Factores de virulencia** <sup>(36)</sup>: son componentes o sustancias presentes en los microorganismos que son necesarios para causar enfermedades.

**Gen *mecA*** <sup>(39)</sup>: es el gen responsable de la resistencia a la meticilina por parte de *Staphylococcus aureus*, dicho gen se encuentra integrado en el cromosoma bacteriano. Dicho gen se encuentra dentro de un elemento móvil heterogéneo denominado *Cassette cromosómico estafilocócico*.

**Mínima diferencia significativa** <sup>(89)</sup>: Conocida como prueba LSD, muestra la magnitud de diferencias que se presentan entre cada factor, es decir, indica la menor diferencia entre dos medias que representen una diferencia estadísticamente significativa.

**Proteína PBP2a** <sup>(8)</sup>: es una proteína que presenta muy baja afinidad por los  $\beta$ -lactámicos. Se obtiene por la transcripción del gen *mecA* y presenta actividad transpeptidasa.

**Proteínas MSCRAMMS** <sup>(84)</sup>: son adhesinas cuya función es la de ligar al microorganismo a las células del huésped y a la formación de una biocapa de *Staphylococcus aureus*.

**Resistencia** <sup>(74)</sup>: en microbiología, la resistencia presentada por una bacteria, se refiere a la capacidad que exhiben las bacterias para soportar los efectos de los antibióticos destinados a eliminarlas o controlarlas.



## **ANEXOS**

## **ANEXO N°1**

**Antibióticos actuales utilizados en el tratamiento de infecciones  
producidas por SARM**

Tabla N°19: Antibióticos actuales utilizados en el tratamiento de infecciones producidas por SARM<sup>(59)</sup>

Antibiótico o grupo de antibióticos	Concentraciones usadas o CIM	Sinergias o antagonismo	Efectos adversos y/u observaciones
<b>Betalactámicos</b>	Penicilina: CIM ≤0.06 mg/L	Sinergia: Betalactámico + aminoglucósido Betalactámico + fosfomicina o daptomicina Antagonismo: Betalactámico + vancomicina	Solo el 10% de las cepas son sensibles a penicilina. Estos antibióticos son recomendables sobretodo en infecciones por cepas sensibles a la meticilina (SASM)
<b>Clindamicina</b>	CIM <sub>90</sub> 0.25 mg/L	Sinergia: Utilizada con rifampicina como tratamiento alternativo al linezolid.	Su efecto es bacteriostático y presenta efecto postantibiótico. Disminuye la producción glicocálix y diferentes toxinas. Usado en infecciones de la piel y partes blandas de gravedad leve a moderada.
<b>Cotrimoxazol = Trimetoprim + sulfametoxazol</b>	CIM <sub>90</sub> ≤0.5 mg/L	Sinergia: <i>In vitro</i> : con daptomicina frente a cepas de SARM resistentes a la daptomicina	El efecto bactericida es dependiente de la concentración y disminuye la selección de cepas resistentes.
<b>Daptomicina</b>	CIM <sub>90</sub> 0.5 mg/L	Sinergia: En combinación con claritromicina, rifampicina o linezolid es activa frente a SARM en el seno de biopelículas	Efecto bactericida dependiente de la concentración. Tiene una ventaja frente a la vancomicina de que no presenta fenómeno de tolerancia.

Tabla N°19: Continuación.

Antibiótico o grupo de antibióticos	Concentraciones usadas o CIM	Sinergias o antagonismo	Efectos adversos y/u observaciones
<b>Fosfomicina</b>	CIM <sub>50</sub> 2-8 mg/L CIM <sub>90</sub> 16-32 mg/L	Sinergia: <i>In vitro</i> : con oxacilina, ampicilina, imipenem, cefmetazol, cefalotina, cefotaximina, cefradina, cefoxitina, cefpiroma, linezolid, daptomicina, minociclina, ofloxacino, vancomicina y gentamicina	Su acción bactericida depende del tiempo y se ve favorecida si se dan condiciones de anaerobiosis. No se debe emplear en casos de infección estafilocócica con CIM mayores a 1 mg/L en forma de monoterapia.
<b>Linezolid</b>	CIM <sub>90</sub> 2 mg/L	Sinergia: Fosfomicina, daptomicina, clindamicina.	Actividad bacteriostática que disminuye si la cepa está en biopelículas y en microorganismos intracelulares. Su actividad no se ve mermada por anaerobiosis o por variación de pH siempre que esté en un rango 5.4-7.4. Disminuye la producción de toxinas.
<b>Rifampicina</b>	CIM <sub>90</sub> ≤0.25 mg/L	Antagonismo y/o indiferente: Betalactámicos, glucopéptidos y quinolonas Sinergia: Daptomicina	Actividad bactericida dependiente de la concentración empleada, posee efecto postantibiótico prolongado e inhibe la producción de LPV. No es recomendable su uso en los primeros días de tratamiento.

Tabla N°19: Continuación.

Antibiótico o grupo de antibióticos	Concentraciones usadas o CIM	Sinergias o antagonismo	Efectos adversos y/u observaciones
<b>Teicoplanina</b>	CIM <sub>90</sub> 1 mg/L	Sinergia: Carbapenem o aminoglucósidos Con cefalosporina reduce la infección postoperatoria	Su acción bactericida depende de la concentración a la que se utilice. Presenta efecto postantibiótico de 2 horas. Si CIM es > 1,5 mg/L determinada E-test, la experiencia clínica y la mortalidad tienden a ser superiores. Presenta prolongada semivida de eliminación. No penetra de forma considerable en el líquido cefalorraquídeo.
<b>Tetraciclinas</b>	Doxiciclina y minociclina presentan CIM <sub>90</sub> de 1 mg/L y 0.25 mg/L respectivamente. Tigeciclina presenta CIM <sub>90</sub> de 0.25 mg/L.		Actividad bacteriostática que depende del tiempo con efecto postantibiótico prolongado. La acción de tigeciclina se ve reducida por el oxígeno. Efectos adversos: alteraciones gastrointestinales, hipersensibilidad y fotosensibilidad cutánea. Minociclina: también alteraciones vestibulares, y en tratamientos prolongados pigmentación de uñas, piel y/o conjuntivas. Las

Tabla N°19: Continuación.

Antibiótico o grupo de antibióticos	Concentraciones usadas o CIM	Sinergias o antagonismo	Efectos adversos y/u observaciones
			tetraciclinas se depositan en huesos y dientes por lo que retarda el crecimiento y tiende a pigmentar los dientes.
<b>Vancomicina</b>	CIM $\geq$ 1 mg/L Indicada como punto de corte válido para microdilución en caldo	Sinergia: Con rifampicina como alternativa al linezolid en neumonía, meningitis y oftalmitis	Actividad bactericida depende del tiempo de exposición, pierde su actividad si se da en anaerobiosis. Los efectos adversos se dan cuando se necesita aumentar la dosis para obtener eficacia terapéutica provocando nefrotoxicidad, incremento de mortalidad, síndrome del hombre rojo, neutropenia o trombocitopenia de naturaleza inmune.
<b>Aminoglucósidos</b>	Gentamicina: CIM <sub>90</sub> 1mg/L	Sinergia: <i>In vitro</i> : betalactámicos y glucopéptidos Gentamicina + rifampicina + vancomicina en endocarditis de la válvula protésica.	La acción bactericida de la gentamicina depende de la concentración en que se aplique, la CIM aumenta si se dan condiciones de anaerobiosis o pH ácido.

## Anexo N° 2

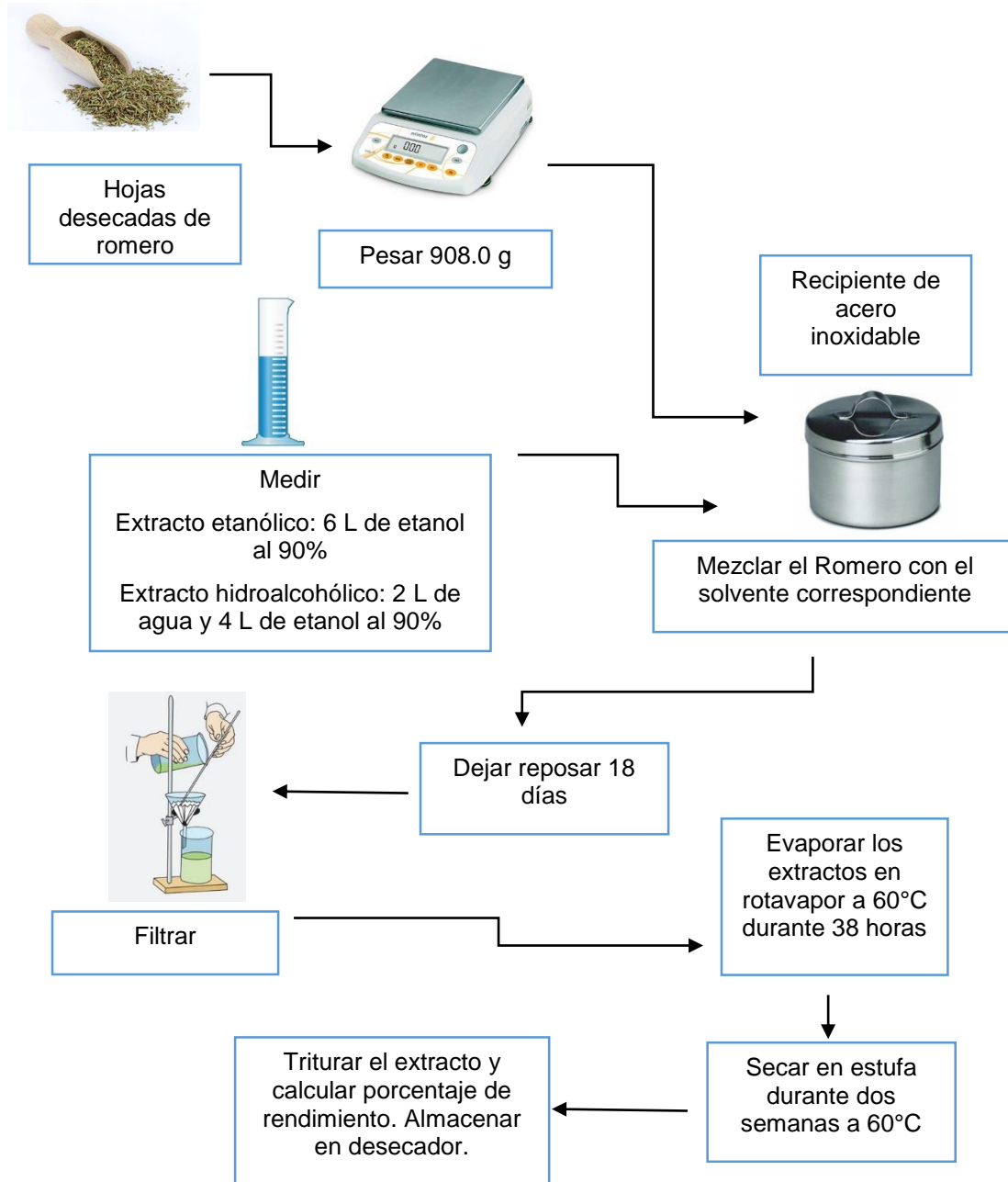


Figura N°13. Elaboración de los extractos de romero

### **Anexo N°3**

#### **Medios de cultivo y reactivos**

- Solución Casoy + Tween 2%
- Glicerol
- Agar TSA en tubo
- Solución Salina
- Cristal violeta
- Lugol
- Etanol-acetona
- Safranina
- Agua destilada
- Buffer fosfato monobásico de potasio
- Peróxido de hidrógeno
- Dimetilsulfóxido
- Acetona
- Agar Baird-Parker
- Agar Manitol Salado
- Agar Sangre
- Agar Mueller Hinton
- Agar Mueller Hinton Salino
- Caldo Mueller Hinton (MH)
- Caldo Mueller Hinton Salino (MHS)

#### **Caldo Mueller Hinton (MH)**

- Preparar cantidad suficiente según indica el fabricante.
- Almacenar hasta su uso.

#### **Caldo Mueller Hinton Salino (MHS)**

- Preparar cantidad suficiente según indica el fabricante.
- Dicho caldo debe contener 2% (P/V) de NaCl, por lo que se deben realizar cálculos para obtener la cantidad de NaCl a agregar.
- Almacenar hasta su uso.

A ambos medios se les agregó 0.5 % v/v de dimetilsulfóxido del volumen final de medio preparado. Dicho reactivo se agregó antes de autoclavar los medios de cultivo.



### Anexo N°4 <sup>(13)</sup>

Los solventes para diluir las soluciones serán caldo MH y MHS respectivamente

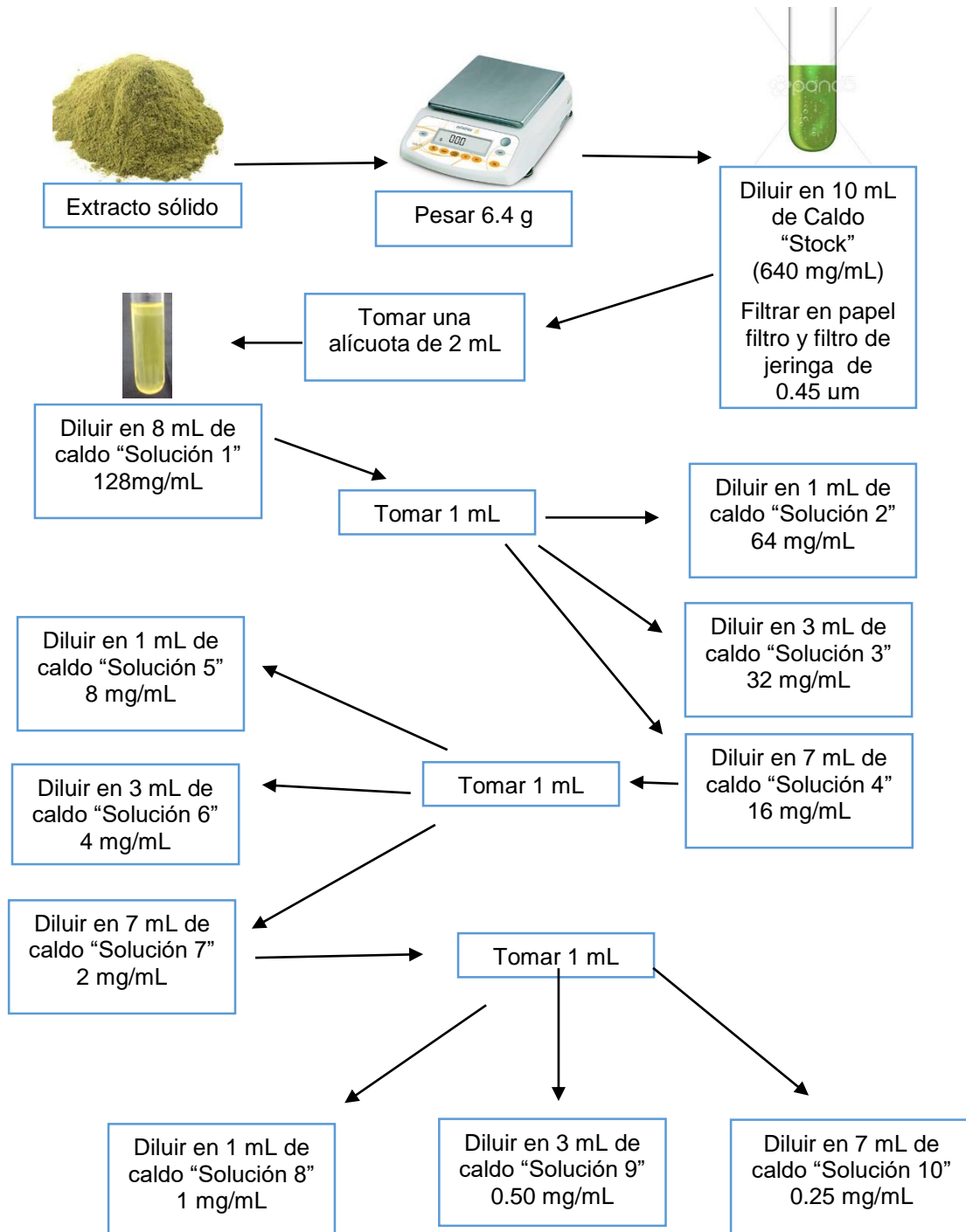


Figura N°14: Dilución de los extractos

### Anexo N°5 <sup>(13)</sup>

Los solventes para diluir las soluciones serán caldo MH y MHS respectivamente

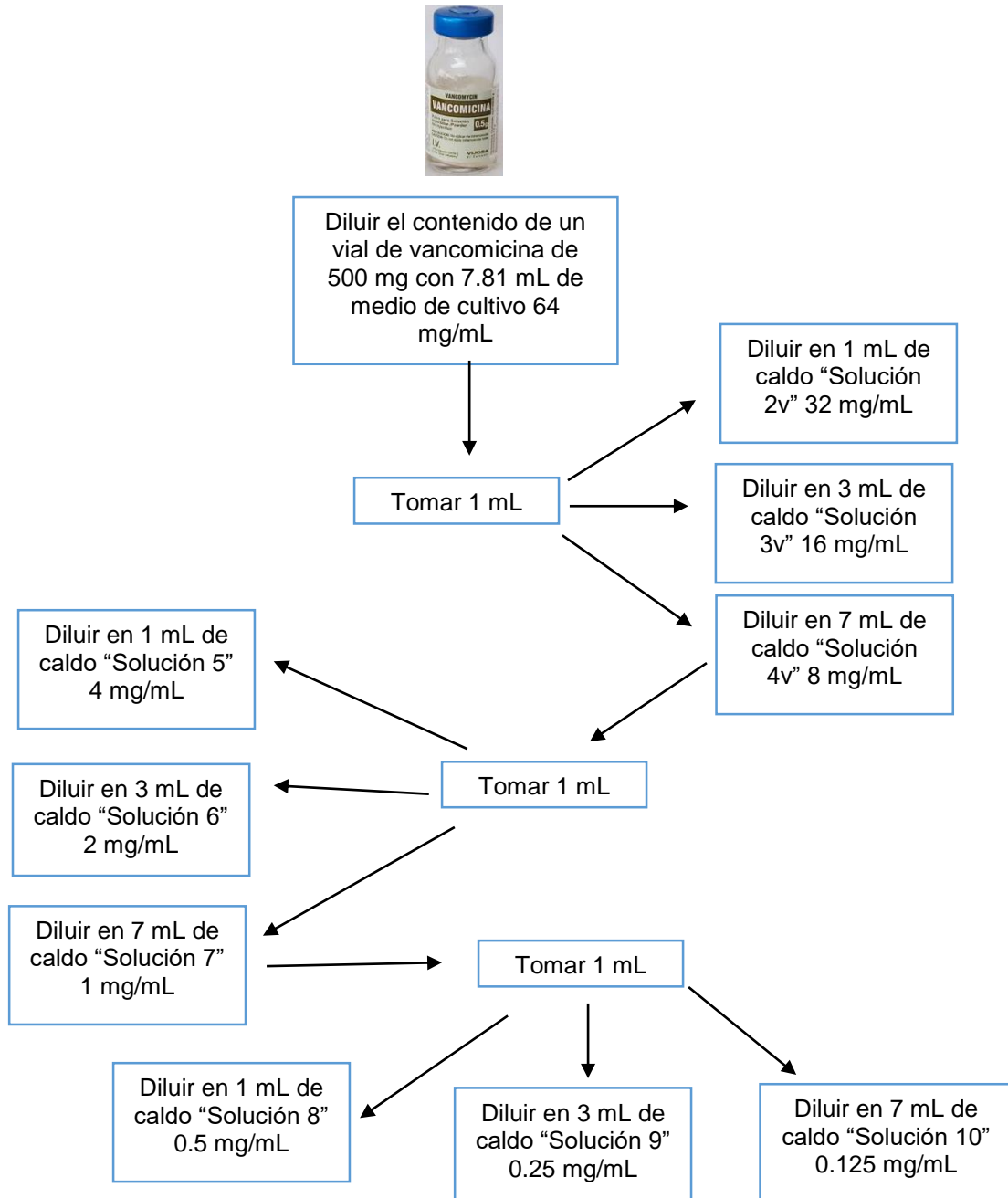


Figura N°15: Primera dilución de la vancomicina

## **Anexo N°6**

**Segundo proceso de dilución de vancomicina** (23, 87)

Los solventes para diluir las soluciones serán caldo MH y MHS respectivamente

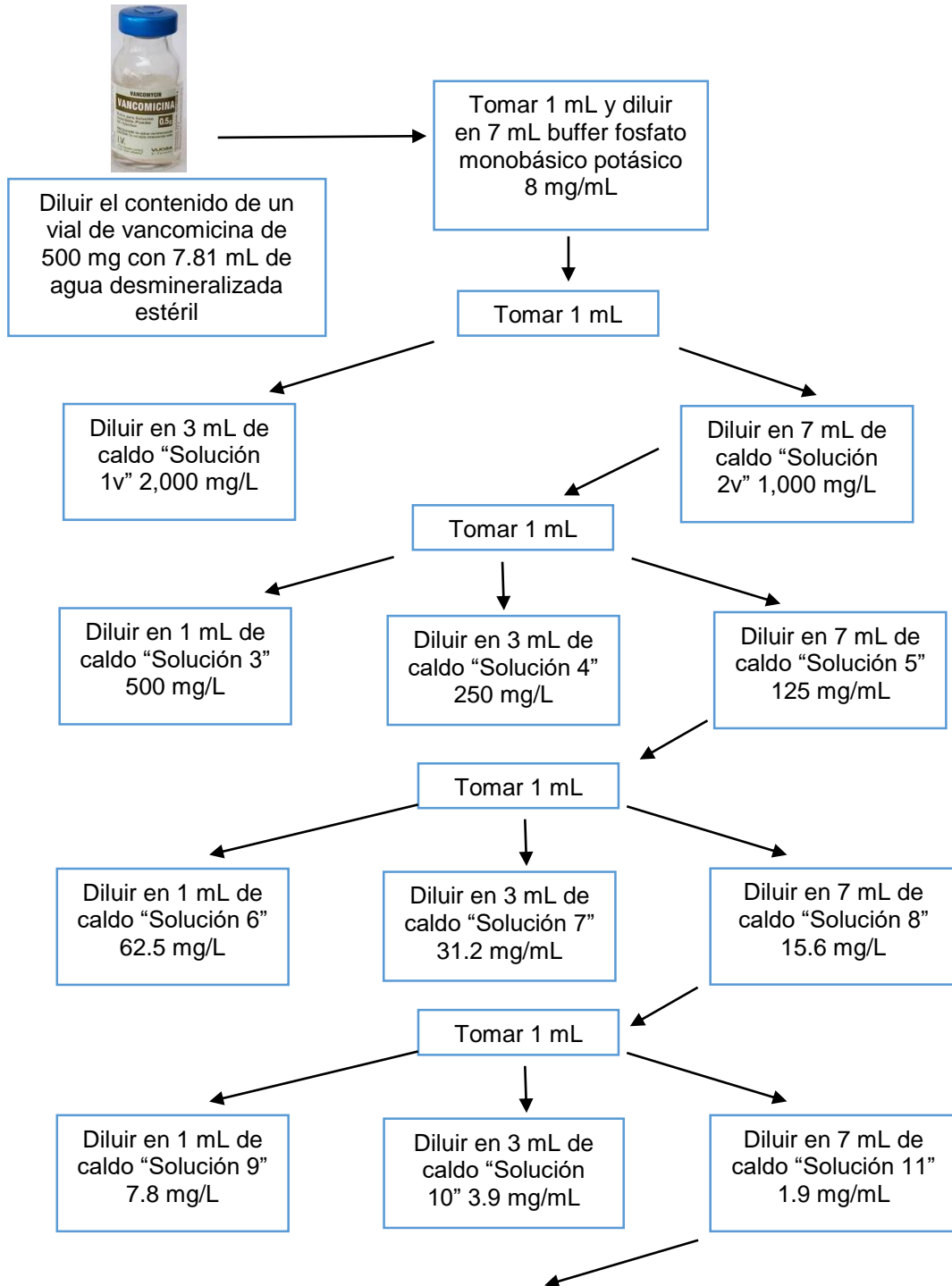


Figura N°16: Segunda dilución de la vancomicina

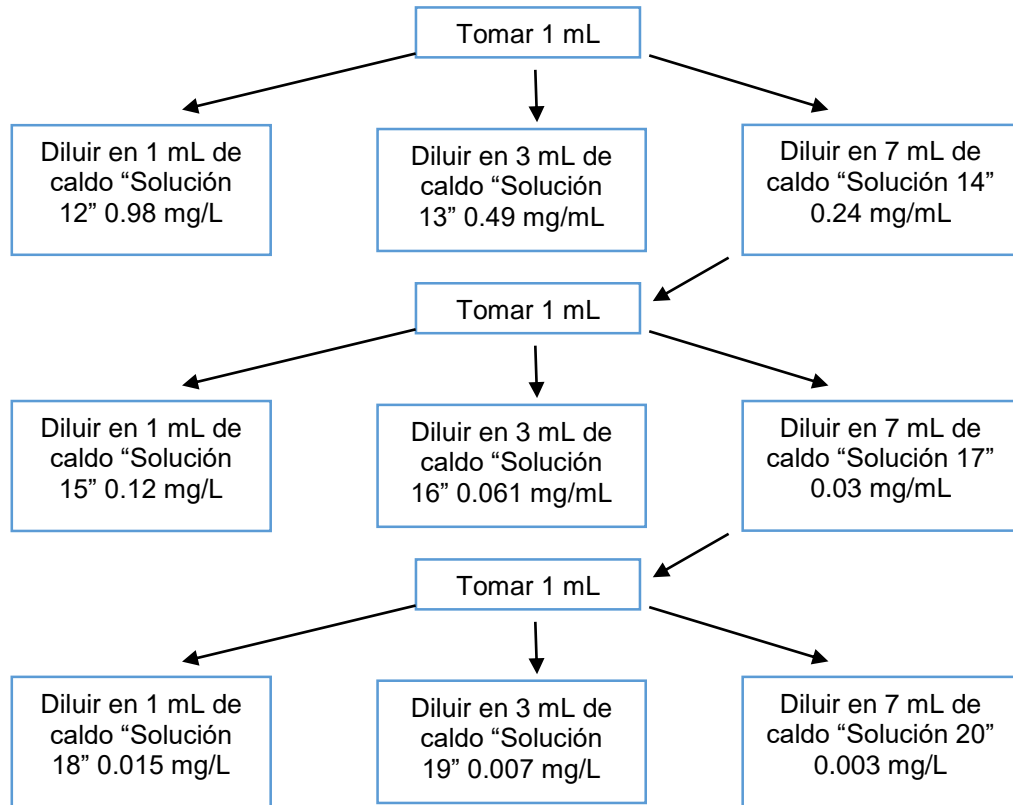


Figura N°16: Continuación

## Anexo N°7

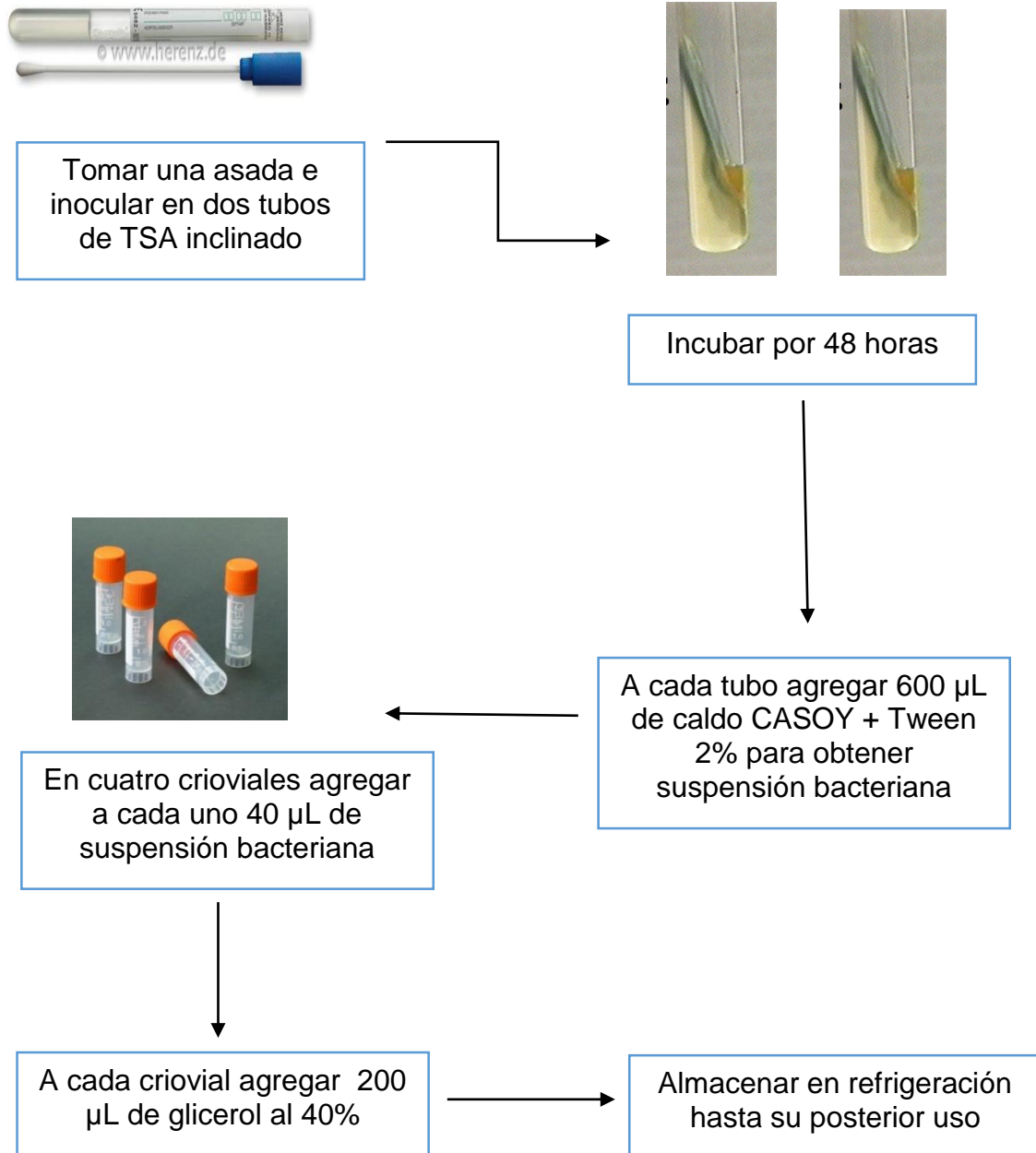


Figura N°17: Obtención de la cepa SARM

## Anexo N°8

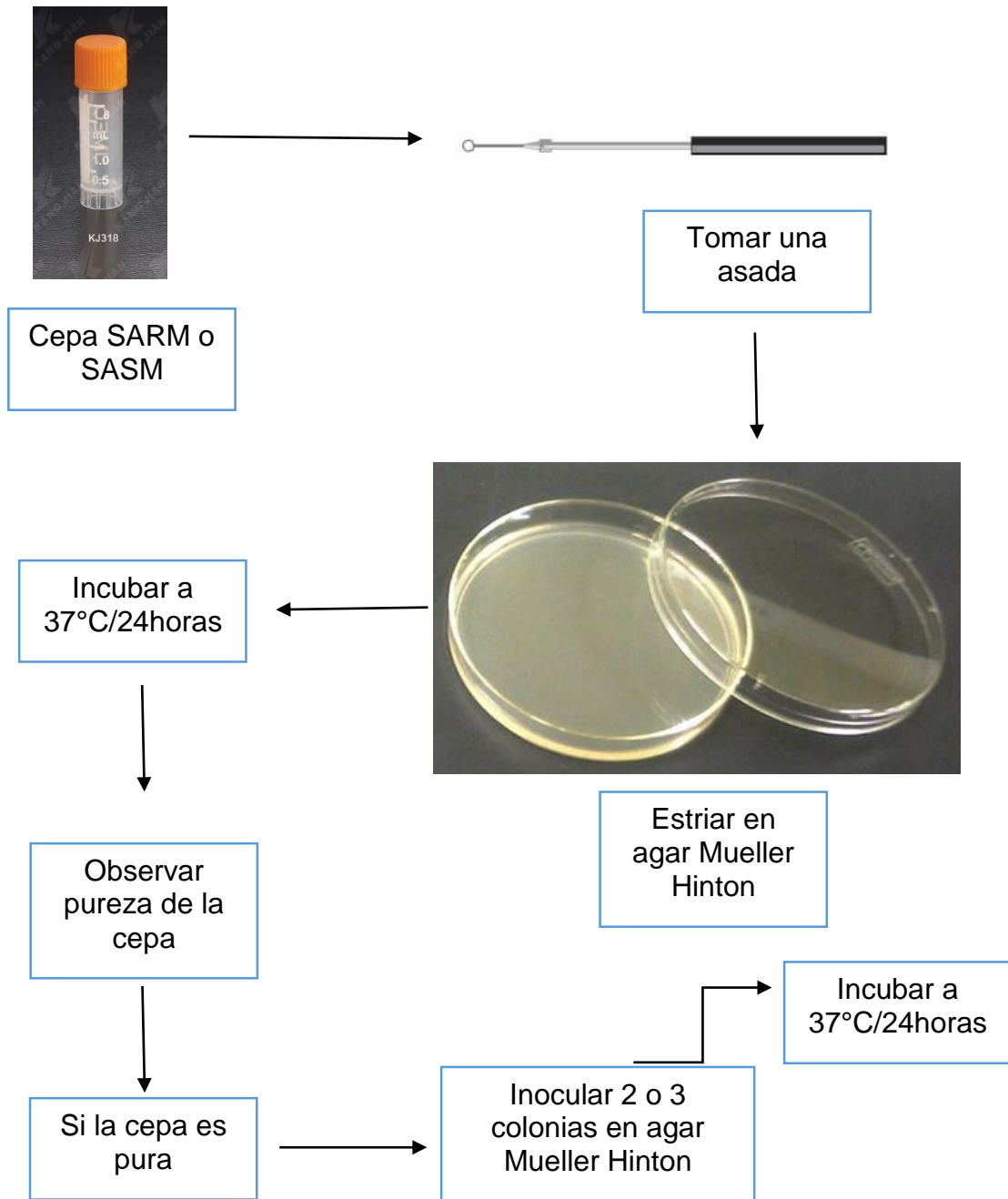


Figura N°18: Regeneración de cepas SARM y SASM

### Anexo N°9 <sup>(87)</sup>

Este proceso se hará tanto para caldo MH como para caldo MHS

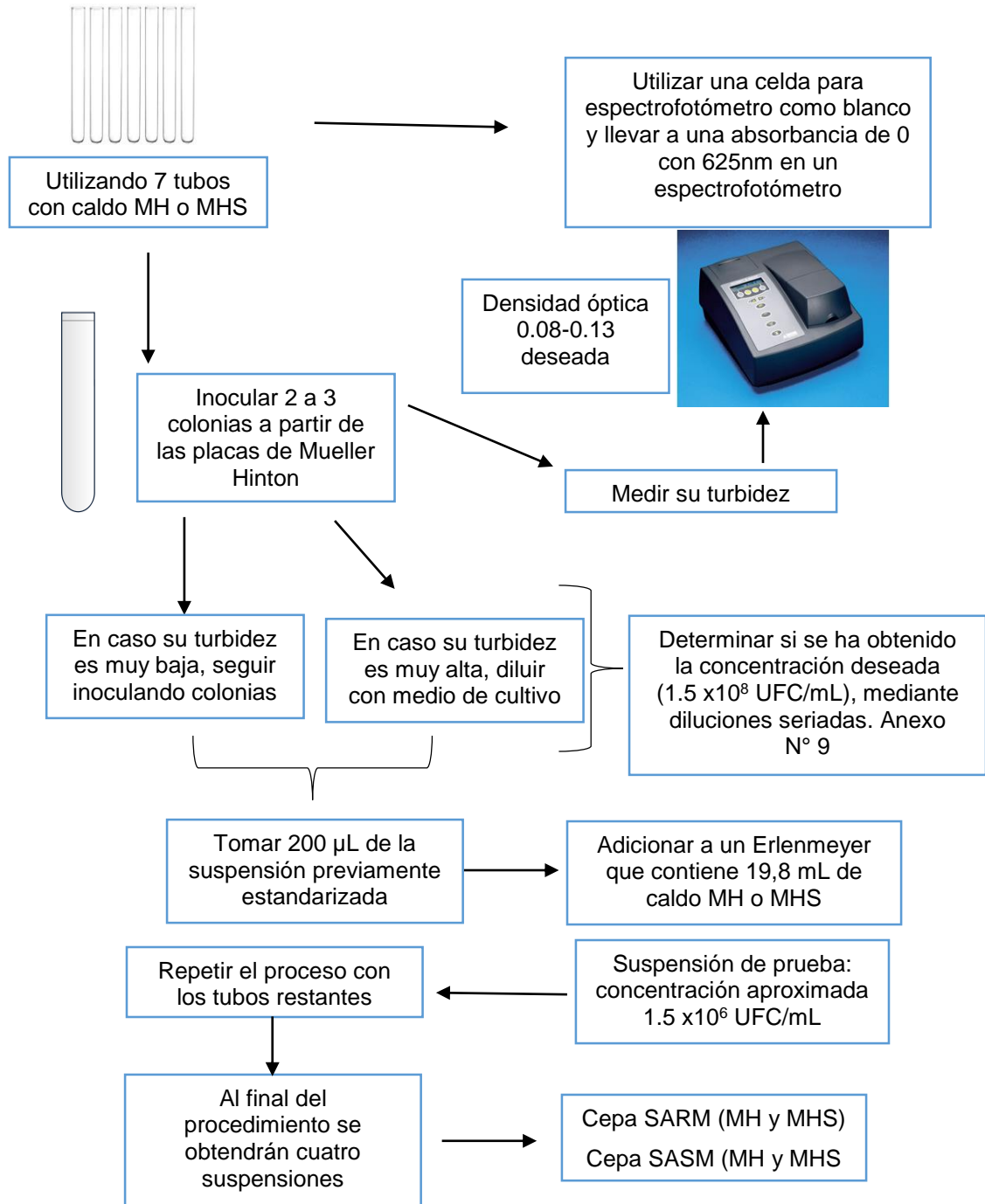
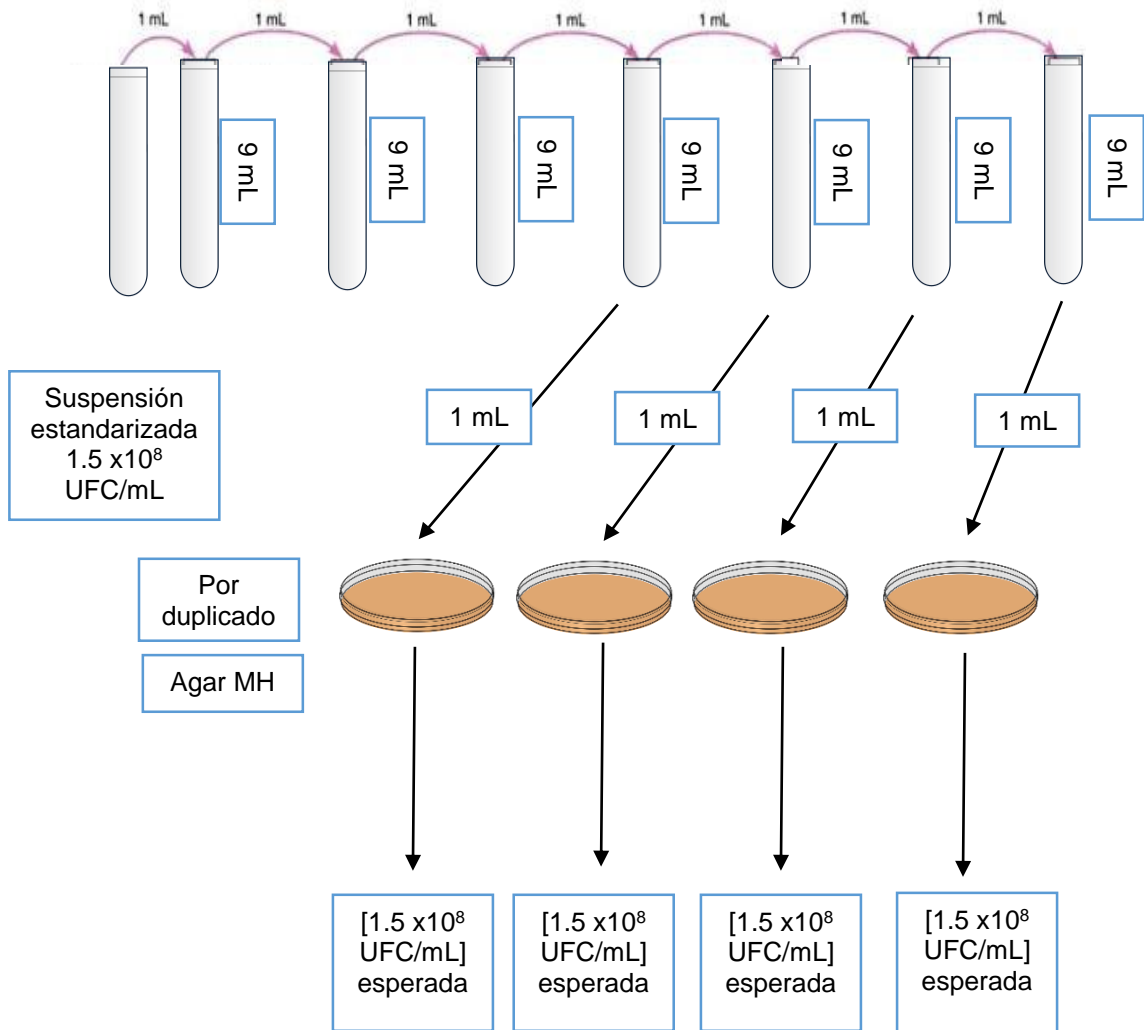


Figura N°19: Estandarización de cepas SARM y SASM



## Anexo N°10 <sup>(87)</sup>



Los diluyentes a utilizar serán caldo MH y MHS

Figura N°20: Diluciones seriadas

### Anexo N°11 <sup>(87)</sup>

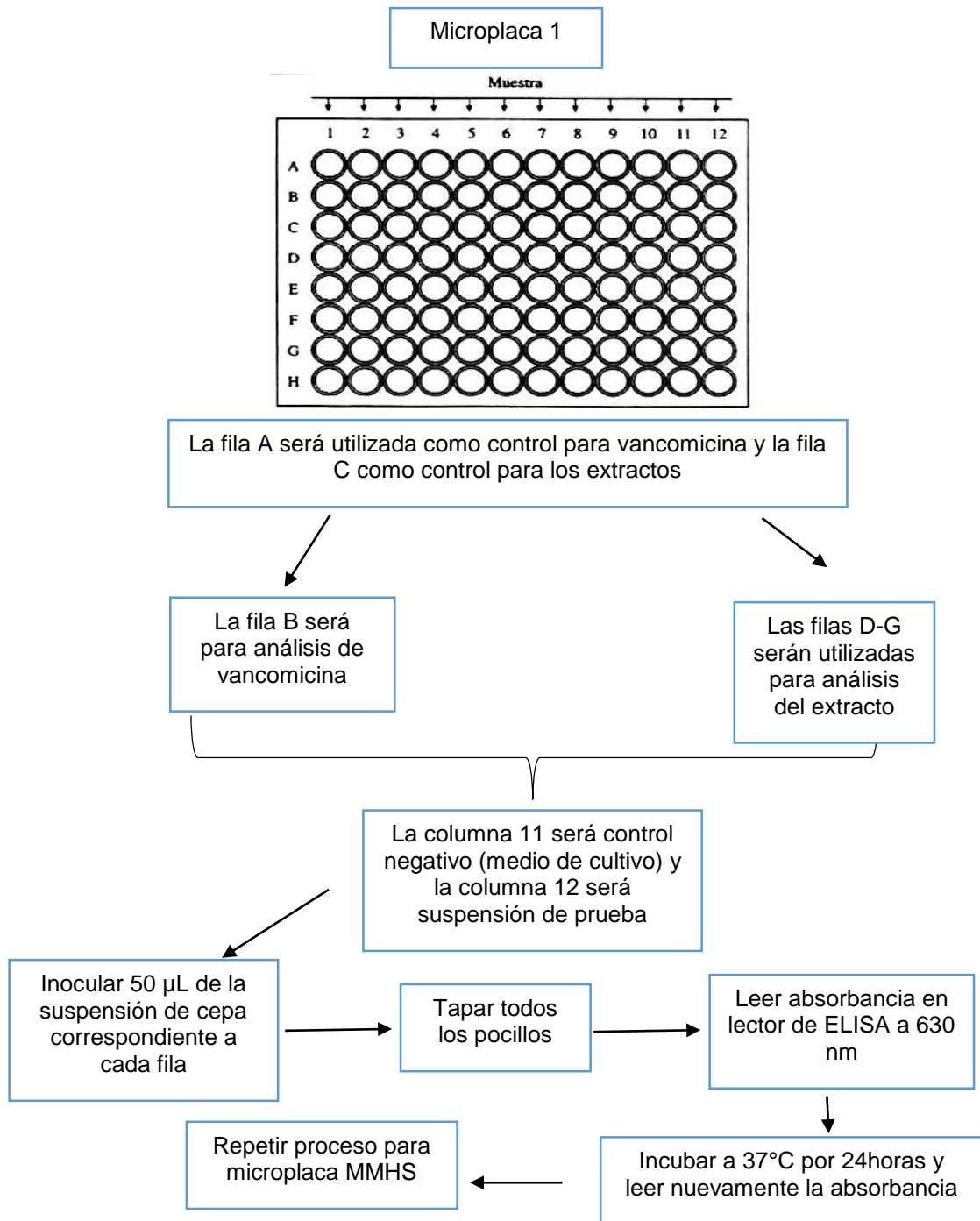


Figura N°21: Primera prueba de microdilución en caldo

## Anexo N°12 <sup>(87)</sup>

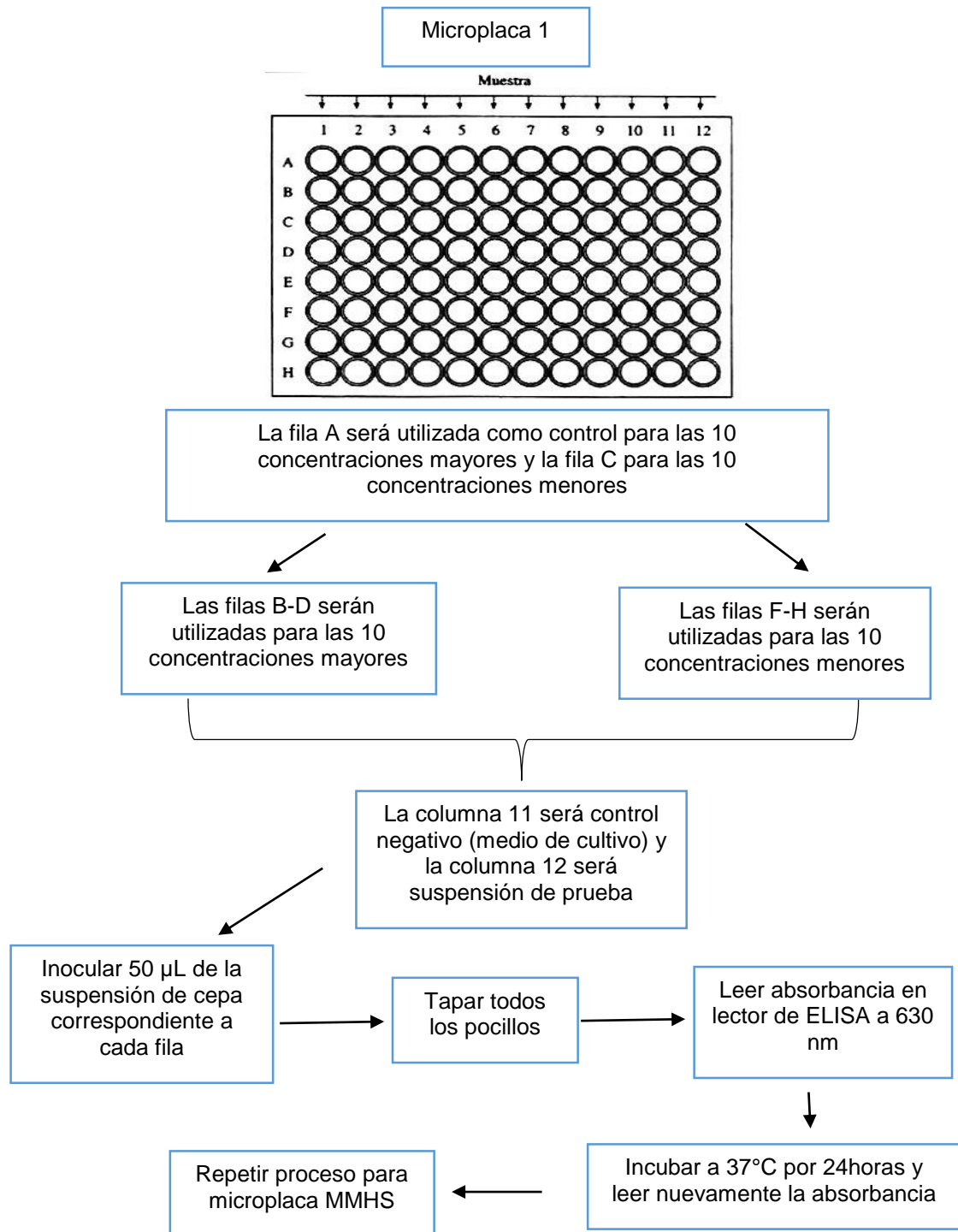


Figura N°22: Segunda prueba de microdilución en caldo

### Anexo N°13 <sup>(87)</sup>

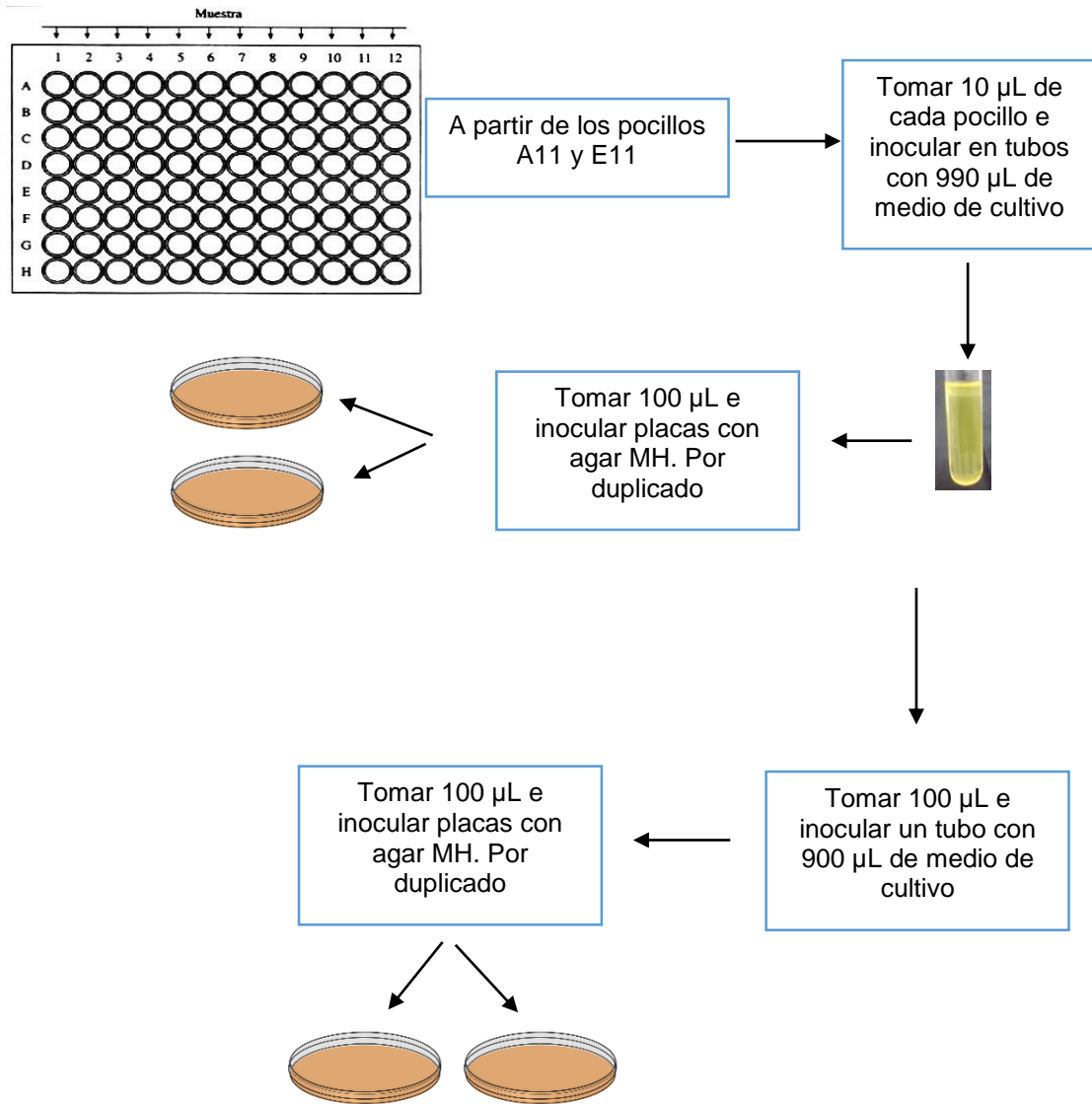


Figura N° 23: Control de concentración de suspensión de prueba.

## **Anexo N° 14**

### **Procedimiento de uso de Lector ELISA**

El procedimiento para utilizar el lector de ELISA (HUMAN Humareader modelo 2601) es el siguiente:

1. Encender el equipo, utilizando el botón ubicado en la parte posterior.
2. El equipo presenta en la pantalla el texto "SELECT MODE".
3. Seleccionar el formato con el que se leerá la placa de la siguiente manera: Presionar la tecla "H", el lector ofrecerá leer de A a H, responder No. De esta forma por defecto el equipo lee en formato de A1 a A12, y así sucesivamente en las siguientes filas.
4. El lector regresará a SELECT MODE
5. Seleccionar el método: apretar el botón ABS para obtener la absorbancia
6. A continuación aparecerán los filtros a utilizar, presionar el número 4 para la selección de la longitud de onda de 630 nm, presionar Enter.
7. Indicar que no se utilizará un filtro diferencial, presionando "NO, indique seleccionar filtro diferencial", luego presionar Enter.
8. Seleccionar el botón NO cuando el equipo pregunte si se llevará un blanco. El lector presenta el comando "LOAD NEXT PLATE → READ".
9. Colocar la placa en el lector y presionar la tecla READ. Apretar el botón READ para comenzar con la lectura de las microplacas. El equipo realizará las lecturas tomando como blanco el aire y las imprimirá.

## Anexo N°15

HERBORISTERIA "DELICIA NATURAL"

San Salvador 12 de Mayo de 2015

A quien interese:

Por este medio doy fe que la especie *Rosmarinus officinalis* que distribuyo en mi negocio HERBORISTERIA "DELICIA NATURAL" es originaria de Quezaltenango Guatemala ya que mis transacciones comerciales las realizo de forma directa con los pobladores de dicha ciudad, la cual se localiza a los 14° 50' 40" de latitud Norte y 91° 30' 05" de longitud oeste, a 206 km al Noroeste de la Ciudad de Guatemala.

Y para lo que el interesado estime conveniente se extiende la presente.

Mario Velis

Herboristería "Delicia Natural"


Propietario



Herboristería "Delicia Natural" Hierbas y Plantas Medicinales Cápsulas Vacías y Plantas pulverizadas teléfono 22650878

Figura N° 24: Carta del proveedor

## Anexo N° 16



**Asociación Jardín Botánico La Laguna**

Antiguo Cuscatlán, 14 de mayo de 2015

Dra. Tania Ethel Cuadra  
Facultad de Química y Farmacia  
Universidad de El Salvador  
Presente.


Estimada Dra. Por medio de la presente, deseo tenga éxitos en el desempeño de sus labores

Además hacer de su conocimiento, que este día, hizo acto de presencia a nuestra institución, el Bachiller Luis Fernando Lemus Aguilar, con una muestra de material botánico fresco de la especie conocida científicamente como, *Rosmarinus officinalis* L. para la cual se da a conocer su clasificación taxonómica de la siguiente manera:


**Class:** Equisetopsida C. Agardh  
**Subclass:** Magnoliidae Novák ex Takht.  
**Superorder:** Asterales Takht.  
**Order:** Lamiales Bromhead  
**Family:** Lamiaceae Martinov  
**Genus:** *Rosmarinus* L.

Sin más por mencionar, se extiende la presente nota, para el buen uso que el interesado estime conveniente.

Atte.



Lic. Dagoberto Rodríguez Decid  
Curador  
Herbario LAGU



Urbanización Industrial Plan de La Laguna, Antiguo Cuscatlán La Libertad, Tel.(503) 2243 – 7970 / 2243 – 7968  
Email: [jardinbotanico@jardinbotanico.org.sv](mailto:jardinbotanico@jardinbotanico.org.sv) Sitio Web: [www.jardinbotanico.org.sv](http://www.jardinbotanico.org.sv)

Figura N° 25: Certificado provisto por el Jardín Botánico “La Laguna”.



## Anexo N° 17



Figura N°26: Elaboración de los extractos. A) Lavado de material vegetal, B) secado de material vegetal, C) pesado de material vegetal y D) almacenamiento del material vegetal más solvente en recipiente de acero inoxidable.



## Anexo N° 18

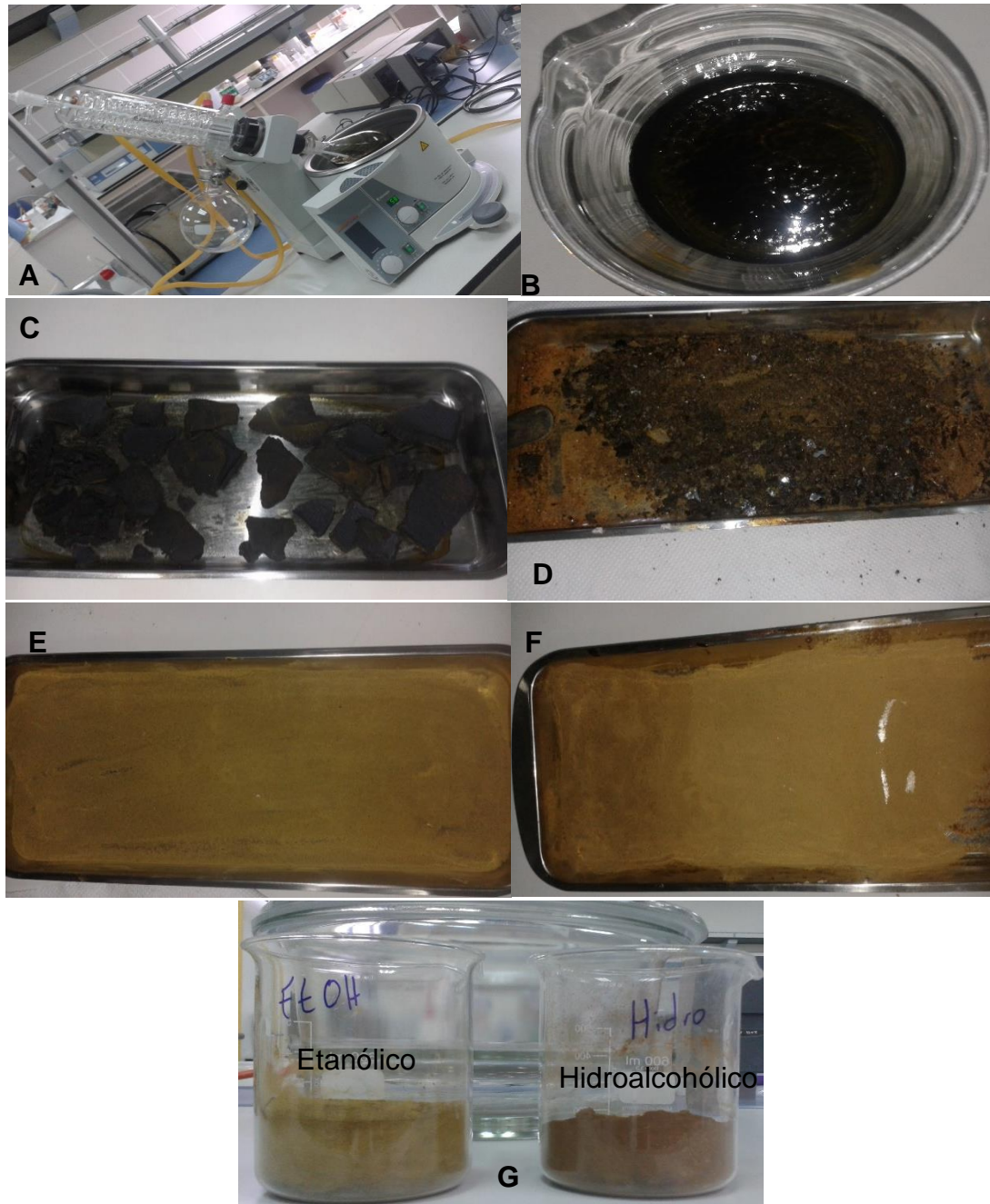


Figura N°27. Proceso de evaporación de los extractos. A) Evaporación en rotavapor, B) Extracto luego de ser sometido a evaporación por rotavapor, C) extracto alcohólico seco, D) extracto hidroalcohólico seco, E) extracto alcohólico triturado, F) extracto hidroalcohólico triturado, G) extractos en desecador.

## Anexo N° 19

### Método de tabulación de datos de absorbancia

1. Los datos de absorbancia para cada microplaca se tomaron antes y después de incubarlas.
2. Las operaciones descritas a continuación se utilizaron para los datos especificados en el punto 1.

#### Simbología

X= Control negativo

Y= Blanco de los extractos

C= Absorbancia de los extractos o vancomicina

A= Absorbancia del microorganismo

#### Fórmulas

$A = C - X - Y$  (se aplicó a cada pocillo de análisis, tanto antes como después de incubar)

Resta:  $A_{(\text{después de incubar})} - A_{(\text{antes de incubar})}$

3. Luego de utilizar estas fórmulas, se promediaron los valores.
4. Se procedió a obtener la desviación estándar y desviación estándar/2 para obtener las barras de error.

1	Antes de incubar											
2	Muestra	Pocillo	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
3	Extracto	Ext 1 D	0.096	0.026	-0.018	-0.018	-0.017	0.024	0.012	-0.032	0.028	0.058
4		Ext 2 E	0.105	0.074	0.03	0.019	-0.016	0.036	0.024	0.021	0.01	0.003
5		Ext 3 F	0.077	0.064	0.012	0.003	0.006	0.075	0.014	0.007	0.014	0.046
6		Ext 4 G	0.053	0.08	0.035	0.015	0.027	0.064	0.028	0.035	0.031	0.05
7												
8	Después de incubar											
9	Muestra	Pocillo	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
10	Extracto	Ext 1 D	0.589	0.238	0.054	0.041	0.042	0.104	0.254	0.164	0.226	0.261
11		Ext 2 E	0.404	0.307	0.101	0.077	0.033	0.106	0.308	0.253	0.207	0.524
12		Ext 3 F	0.435	0.317	0.101	0.082	0.072	0.172	0.3	0.246	0.269	0.292
13		Ext 4 G	0.378	0.259	0.127	0.093	0.1	0.162	0.677	0.434	0.407	0.45
14	Resta D- A											
15		D	0.493	0.212	0.072	0.059	0.059	0.08	0.242	0.196	0.198	0.203
16		E	0.299	0.233	0.071	0.058	0.049	0.07	0.284	0.232	0.197	0.521
17		F	0.358	0.253	0.089	0.079	0.066	0.097	0.286	0.239	0.255	0.246
18		G	0.325	0.179	0.092	0.078	0.073	0.098	0.649	0.399	0.376	0.4
19	Promedio		0.36875	0.21925	0.081	0.0685	0.06175	0.08625	0.36525	0.2665	0.2565	0.3425
20	Desv		0.08628007	0.03162673	0.01104536	0.01156143	0.01024288	0.0136229	0.19025137	0.0903198	0.08415264	0.14599201
21	Desv/2		0.04314003	0.01581336	0.00552268	0.00578072	0.00512144	0.00681145	0.09512568	0.0451599	0.04207632	0.072996

Figura N°28: Ejemplo de tabulación de datos de absorbancia.

**Anexo N° 20**

**Datos tabulados de absorbancia de extractos y vancomicina**

MICROPLACA EISMH										
Antes de incubar										
Et	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
1	-0.095	-0.084	-0.184	-0.084	-0.158	-0.059	-0.092	-0.069	-0.154	-0.111
2	0.009	-0.069	-0.135	-0.096	-0.131	-0.129	-0.048	-0.111	-0.13	-0.143
3	-0.116	-0.075	-0.214	-0.102	-0.186	-0.07	-0.13	-0.075	-0.176	-0.103
4	-0.062	-0.068	-0.167	-0.091	-0.143	-0.097	-0.053	-0.107	-0.141	-0.122
Después de incubar										
Et	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
1	0.082	0.127	-0.058	-0.001	-0.089	0.005	0.17	0.166	0.133	0.385
2	0.512	0.145	0.006	0.002	-0.041	-0.056	0.191	0.097	0.177	0.324
3	0.124	0.166	-0.097	-0.016	-0.125	-0.04	0.181	0.238	0.145	0.303
4	0.286	0.294	0.022	0.03	-0.009	0.033	0.494	0.368	0.347	0.566
Resta D- A										
Et	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
1	0.177	0.211	0.126	0.083	0.069	0.064	0.262	0.235	0.287	0.496
2	0.503	0.214	0.141	0.098	0.09	0.073	0.239	0.208	0.307	0.467
3	0.24	0.241	0.117	0.086	0.061	0.03	0.311	0.313	0.321	0.406
4	0.348	0.362	0.189	0.121	0.134	0.13	0.547	0.475	0.488	0.688
Promedio	0.317	0.257	0.14325	0.097	0.0885	0.07425	0.33975	0.30775	0.35075	0.51425
Desv	0.14269548	0.07128815	0.03206634	0.01726268	0.03270576	0.04152409	0.1413916	0.12005936	0.09255764	0.12175488
Desv/2	0.07134774	0.03564407	0.01603317	0.00863134	0.01635288	0.02076204	0.0706958	0.06002968	0.04627882	0.06087744

Tabla N°20. Datos tabulados de microplaca “extracto etanólico + cepa sensible + caldo MH”.

MICROPLACA HISMH										
Antes de incubar										
Hi	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
1	-0.066	-0.016	-0.088	-0.039	-0.138	-0.076	-0.062	-0.056	-0.132	-0.106
2	0.195	0.001	-0.055	-0.048	-0.12	-0.075	-0.023	-0.049	-0.103	-0.123
3	-0.051	-0.031	-0.107	-0.041	-0.124	-0.078	-0.076	-0.063	-0.128	-0.097
4	0.061	-0.045	-0.053	-0.07	-0.11	-0.062	-0.079	-0.053	-0.114	-0.145
Después de incubar										
Hi	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
1	0.168	0.141	0.006	0.071	-0.066	0.017	0.104	0.419	0.371	0.12
2	0.555	0.142	0.066	0.061	-0.037	-0.019	0.12	0.437	0.463	0.148
3	0.337	0.234	0.01	0.078	-0.034	0.009	0.095	0.511	0.555	0.131
4	0.093	0.432	0.251	0.089	0.022	0.072	0.132	0.766	0.729	0.176
Resta D- A										
Hi	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
1	0.234	0.157	0.094	0.11	0.072	0.093	0.166	0.475	0.503	0.226
2	0.36	0.141	0.121	0.109	0.083	0.056	0.143	0.486	0.566	0.271
3	0.388	0.265	0.117	0.119	0.09	0.087	0.171	0.574	0.683	0.228
4	0.032	0.477	0.304	0.159	0.132	0.134	0.211	0.819	0.843	0.321
Promedio	0.2535	0.26	0.159	0.12425	0.09425	0.0925	0.17275	0.5885	0.64875	0.2615
Desv	0.16214705	0.15479449	0.0973961	0.02359908	0.02623452	0.03206764	0.02826511	0.15992602	0.14943979	0.04476978
Desv/2	0.08107353	0.07739724	0.04869805	0.01179954	0.01311726	0.01603382	0.01413256	0.07996301	0.07471989	0.02238489

Tabla N°21. Datos tabulados de microplaca “extracto hidroalcohólico + cepa sensible + caldo MH”.

MICROPLACA EtSMHS											
Antes de incubar											
Muestra	Pocillo	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Extracto	Ext 1 D	-0.064	-0.074	-0.029	0.015	-0.028	-0.032	-0.01	0.023	-0.031	-0.056
	Ext 2 E	-0.214	-0.016	0.024	-0.021	0.013	0.019	0.012	0.053	-0.033	-0.095
	Ext 3 F	-0.308	0.062	0.027	0.002	0.013	0.027	0.44	0.076	-0.063	-0.007
	Ext 4 G	-0.338	0.081	-0.018	0.059	0.008	0.043	0.016	0.032	0.014	-0.014
Después de incubar											
Muestra	Pocillo	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Extracto	Ext 1 D	-0.264	-0.023	0.057	0.051	0.028	0.17	0.054	0.643	0.069	0.117
	Ext 2 E	-0.754	-0.062	0.132	0.017	0.076	0.216	0.06	0.108	0.151	0.145
	Ext 3 F	-1.02	0.228	0.149	0.065	0.084	0.223	0.229	0.457	0.232	0.105
	Ext 4 G	-1.082	0.157	0.049	0.105	0.146	0.307	0.301	0.48	0.669	0.185
Resta D- A	D	-0.2	0.051	0.086	0.036	0.056	0.202	0.064	0.62	0.1	0.173
	E	-0.54	-0.046	0.108	0.038	0.063	0.197	0.048	0.055	0.184	0.24
	F	-0.712	0.166	0.122	0.063	0.071	0.196	-0.211	0.381	0.295	0.112
	G	-0.744	0.076	0.067	0.046	0.138	0.264	0.285	0.448	0.655	0.199
Promedio		-0.549	0.06175	0.09575	0.04575	0.082	0.21475	0.0465	0.376	0.3085	0.181
Desv		0.2493164	0.08717177	0.02422636	0.01228481	0.03783297	0.03293807	0.20289324	0.23649242	0.24441563	0.05363457
Desv/2		0.1246582	0.04358588	0.01211318	0.00614241	0.01891648	0.01646904	0.10144662	0.11824621	0.12220781	0.02681728

Tabla N°22. Datos tabulados de microplaca “extracto etanólico + cepa sensible + caldo MHS”.

MICROPLACA HiSMHS											
Antes de incubar											
Muestra	Pocillo	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Extracto	Ext 1 D	-0.226	-0.112	-0.039	-0.049	-0.024	-0.026	-0.043	-0.022	0.002	-0.034
	Ext 2 E	0.105	-0.053	-0.046	-0.01	-0.015	-0.018	0	0.001	0.043	-0.002
	Ext 3 F	-0.333	-0.111	-0.054	-0.039	-0.026	-0.011	-0.046	-0.046	0.016	-0.043
	Ext 4 G	-0.271	-0.195	-0.029	0.01	-0.015	-0.019	-0.009	-0.002	0.022	0.003
Después de incubar											
Muestra	Pocillo	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Extracto	Ext 1 D	0.158	0.302	0.485	0.531	0.491	0.487	0.544	0.977	0.493	0.573
	Ext 2 E	0.292	0.172	0.336	0.53	0.494	0.67	0.733	1.163	1.111	0.564
	Ext 3 F	0.236	0.32	0.372	0.533	0.496	0.509	0.544	1.296	0.51	0.49
	Ext 4 G	0.307	0.17	0.534	0.552	0.536	0.527	0.896	1.287	0.534	0.54
Resta D- A	D	0.384	0.414	0.524	0.58	0.515	0.513	0.587	0.999	0.491	0.607
	E	0.187	0.225	0.382	0.54	0.509	0.688	0.733	1.162	1.068	0.566
	F	0.569	0.431	0.426	0.572	0.522	0.52	0.59	1.342	0.494	0.533
	G	0.578	0.365	0.563	0.542	0.551	0.546	0.905	1.289	0.512	0.537
Promedio		0.4295	0.35875	0.47375	0.5585	0.52425	0.56675	0.70375	1.198	0.64125	0.56075
Desv		0.18474216	0.093453643	0.08404116	0.02048577	0.01860779	0.0820706	0.15047342	0.15265866	0.2846511	0.03416016
Desv/2		0.09237108	0.046726821	0.04202058	0.01024288	0.0093039	0.0410353	0.07523671	0.07632933	0.14232555	0.01708008

Tabla N°23. Datos tabulados de microplaca “extracto hidroalcohólico + cepa sensible + caldo MHS”.

MICROPLACA ETRMH											
Antes de incubar											
Muestra	Pocillo	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Extracto	Ext 1 D	0.096	0.026	-0.018	-0.018	-0.017	0.024	0.012	-0.032	0.028	0.058
	Ext 2 E	0.105	0.074	0.03	0.019	-0.016	0.036	0.024	0.021	0.01	0.003
	Ext 3 F	0.077	0.064	0.012	0.003	0.006	0.075	0.014	0.007	0.014	0.046
	Ext 4 G	0.053	0.08	0.035	0.015	0.027	0.064	0.028	0.035	0.031	0.05
Después de incubar											
Muestra	Pocillo	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Extracto	Ext 1 D	0.589	0.238	0.054	0.041	0.042	0.104	0.254	0.164	0.226	0.261
	Ext 2 E	0.404	0.307	0.101	0.077	0.033	0.106	0.308	0.253	0.207	0.524
	Ext 3 F	0.435	0.317	0.101	0.082	0.072	0.172	0.3	0.246	0.269	0.292
	Ext 4 G	0.378	0.259	0.127	0.093	0.1	0.162	0.677	0.434	0.407	0.45
Resta D- A	D	0.493	0.212	0.072	0.059	0.059	0.08	0.242	0.196	0.198	0.203
	E	0.299	0.233	0.071	0.058	0.049	0.07	0.284	0.232	0.197	0.521
	F	0.358	0.253	0.089	0.079	0.066	0.097	0.286	0.239	0.255	0.246
	G	0.325	0.179	0.092	0.078	0.073	0.098	0.649	0.399	0.376	0.4
	Promedio	0.36875	0.21925	0.081	0.0685	0.06175	0.08625	0.36525	0.2665	0.2565	0.3425
Desv	0.08628007	0.03162673	0.01104536	0.01156143	0.01024288	0.0136229	0.19025137	0.0903198	0.08415264	0.14599201	
Desv/2	0.04314003	0.01581336	0.00552268	0.00578072	0.00512144	0.00681145	0.09512568	0.0451599	0.04207632	0.072996	

Tabla N°24. Datos tabulados de microplaca “extracto etanólico + cepa resistente + caldo MH”.

MICROPLACA HIRMH											
Antes de incubar											
Muestra	Pocillo	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Extracto	Ext 1 D	0.265	0.114	0.09	0.089	-0.063	0.125	0.09	0.195	0.141	0.109
	Ext 2 E	0.312	0.4678	0.122	0.055	0.002	0.865	0.099	0.159	0.17	0.085
	Ext 3 F	0.339	0.217	0.12	0.038	-0.04	0.146	0.079	0.185	0.124	0.134
	Ext 4 G	0.334	0.148	0.055	0.046	-0.094	0.09	0.045	0.155	0.13	0.12
Después de incubar											
Muestra	Pocillo	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Extracto	Ext 1 D	0.803	0.475	0.225	0.217	0.103	0.156	0.163	0.683	0.43	0.332
	Ext 2 E	0.339	1.49	0.361	0.181	0.178	0.215	0.157	1.041	0.504	0.276
	Ext 3 F	0.901	0.494	0.399	0.199	0.148	0.184	0.151	0.974	0.744	0.386
	Ext 4 G	0.012	0.738	0.368	0.264	0.126	0.193	0.134	1.319	1.148	0.487
Resta D- A	D	0.538	0.361	0.135	0.128	0.166	0.031	0.073	0.488	0.289	0.223
	E	0.027	1.0222	0.239	0.126	0.176	-0.65	0.058	0.882	0.334	0.191
	F	0.562	0.277	0.279	0.161	0.188	0.038	0.072	0.789	0.62	0.252
	G	-0.322	0.59	0.313	0.218	0.22	0.103	0.089	1.164	1.018	0.367
	Promedio	0.20125	0.56255	0.2415	0.15825	0.1875	-0.1195	0.073	0.83075	0.56525	0.25825
Desv	0.42727616	0.3337628	0.07717297	0.04294473	0.02345918	0.35514926	0.01267544	0.27862923	0.33554471	0.07666105	
Desv/2	0.21363808	0.1668814	0.03858648	0.02147237	0.01172959	0.17757463	0.00633772	0.13931462	0.16777235	0.03833053	

Tabla N°25. Datos tabulados de microplaca “extracto hidroalcohólico + cepa resistente + caldo MH”.



MICROPLACA ETRMHS											
Antes de incubar											
Muestra	Pocillo	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Extracto	Ext 1 D	-0.187	-0.129	-0.037	-0.002	-0.01	-0.04	-0.025	-0.005	-0.026	-0.004
	Ext 2 E	-0.358	-0.177	-0.011	0.032	0.038	0.029	0.036	-0.025	0.076	-0.015
	Ext 3 F	-0.402	-0.033	0.001	0.004	-0.005	0.005	-0.013	0.017	-0.022	0.014
	Ext 4 G	-0.356	-0.152	-0.012	0.013	-0.002	0.022	-0.027	-0.015	-0.039	-0.005
Después de incubar											
Muestra	Pocillo	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Extracto	Ext 1 D	-0.049	0.093	0.045	0.074	0.071	0.061	0.07	0.277	0.217	0.212
	Ext 2 E	-0.075	0.091	0.099	0.091	0.139	0.108	0.588	0.218	0.319	0.223
	Ext 3 F	-0.034	0.329	0.146	0.096	0.106	0.096	0.52	0.297	0.214	0.276
	Ext 4 G	-0.258	0.186	0.174	0.14	0.146	0.136	0.575	0.427	0.4	0.437
Resta D- A	D	0.138	0.222	0.082	0.076	0.081	0.101	0.095	0.282	0.243	0.216
	E	0.283	0.268	0.11	0.059	0.101	0.079	0.552	0.243	0.243	0.238
	F	0.368	0.362	0.145	0.092	0.111	0.091	0.533	0.28	0.236	0.262
	G	0.098	0.338	0.186	0.127	0.148	0.114	0.602	0.442	0.439	0.442
Promedio		0.22175	0.2975	0.13075	0.0885	0.11025	0.09625	0.4455	0.31175	0.29025	0.2895
Desv		0.12578918	0.06421578	0.04495461	0.0289885	0.02808766	0.01486327	0.23547187	0.08866557	0.09922155	0.10338762
Desv/2		0.06289459	0.03210789	0.0224773	0.01449425	0.01404383	0.00743163	0.11773593	0.04433279	0.04961078	0.05169381

Tabla N°26. Datos tabulados de microplaca “extracto etanólico + cepa resistente + caldo MHS”.

MICROPLACA HIRMHS											
Antes de incubar											
Muestra	Pocillo	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Extracto	Ext 1 D	-0.206	-0.285	-0.056	-0.039	0.045	0.092	0.049	0.016	0.075	0.107
	Ext 2 E	-0.231	-0.178	-0.017	0.016	-0.029	0.069	0.045	0.036	0.095	0.042
	Ext 3 F	-0.095	-0.32	-0.061	0.003	0.023	0.12	0.074	0.069	0.077	0.061
	Ext 4 G	0.07	-0.266	-0.065	0.027	0.069	0.113	0.097	0.075	0.088	0.083
Después de incubar											
Muestra	Pocillo	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125
Extracto	Ext 1 D	-0.31	-0.171	0.008	0.067	0.136	0.122	0.126	0.209	0.245	0.306
	Ext 2 E	-0.574	0.1	0.022	0.229	0.066	0.116	0.082	0.735	0.425	0.365
	Ext 3 F	-0.42	0.119	0.107	0.155	0.139	0.173	0.529	0.619	0.518	0.432
	Ext 4 G	-0.514	0.062	0.216	0.226	0.145	0.173	0.171	1.041	0.88	0.575
Resta D- A	D	-0.104	0.114	0.064	0.106	0.091	0.03	0.077	0.193	0.17	0.199
	E	-0.343	0.278	0.039	0.213	0.095	0.047	0.037	0.699	0.33	0.323
	F	-0.325	0.439	0.168	0.152	0.116	0.053	0.455	0.55	0.441	0.371
	G	-0.584	0.328	0.281	0.199	0.076	0.06	0.074	0.966	0.792	0.492
Promedio		-0.339	0.28975	0.138	0.1675	0.0945	0.0475	0.16075	0.602	0.43325	0.34625
Desv		0.19618189	0.13511076	0.11049284	0.04859698	0.01650253	0.01281926	0.19700825	0.32243346	0.26376931	0.12121434
Desv/2		0.09809094	0.06755538	0.05524642	0.02429849	0.00825126	0.00640963	0.09850412	0.16121673	0.13188466	0.06060717

Tabla N°27. Datos tabulados de microplaca “extracto hidroalcohólico + cepa resistente + caldo MH”.

MICROPLACA VMHHS																			
Antes de incubar																			
1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078	0.0039	0.0019	0.00098	0.00049	0.00024	0.00012	0.000061	0.00003	0.000015	0.000007	0.000003	0.000001
2	-0.064	-0.065	-0.039	-0.074	-0.039	-0.035	-0.151	-0.132	-0.102	-0.078	0.007	-0.024	-0.033	0.026	-0.075	-0.03	-0.025	0.005	-0.062
3	-0.034	-0.017	0.003	-0.033	-0.044	-0.046	-0.089	-0.091	-0.122	-0.017	-0.04	-0.027	-0.013	-0.019	-0.041	-0.009	-0.053	0.001	-0.059
Después de incubar																			
1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078	0.0039	0.0019	0.00098	0.00049	0.00024	0.00012	0.000061	0.00003	0.000015	0.000007	0.000003	0.000001
2	-0.068	0.064	0.031	-0.002	0.062	0.028	-0.027	0.005	-0.023	0.007	-0.057	0.341	0.42	0.391	0.468	0.365	0.411	0.511	0.471
3	0.063	0.034	0.086	-0.023	0.086	0.047	0.017	-0.013	0.075	0.063	-0.026	0.562	0.773	0.663	0.791	0.6	0.882	0.852	0.796
Prueba D-A																			
1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078	0.0039	0.0019	0.00098	0.00049	0.00024	0.00012	0.000061	0.00003	0.000015	0.000007	0.000003	0.000001
2	-0.046	0	0.05	0.03	0.084	0.095	0.039	0.097	0.113	-0.099	-0.071	0.341	0.451	0.39	0.485	0.409	0.448	0.515	0.453
3	0.103	0.051	0.083	0.008	0.119	0.091	0.063	0.076	0.166	0.185	-0.009	0.602	0.8	0.676	0.81	0.641	0.901	0.905	0.78
Promedio	0.049	0.043687	0.073333	0.015333	0.096667	0.096667	0.075667	0.093667	0.127667	0.06	-0.03667	0.473333	0.579	0.546667	0.586	0.532667	0.646667	0.546667	0.656333
Desv	0.062529	0.040501	0.020306	0.012702	0.022502	0.006658	0.044377	0.016258	0.039501	0.149021	0.038936	0.131036	0.19219	0.149552	0.194301	0.116758	0.225496	0.209724	0.160017
Desv2	0.041284	0.020251	0.010163	0.006351	0.011251	0.003329	0.022189	0.008129	0.016751	0.07251	0.015948	0.065518	0.096095	0.072776	0.097751	0.058379	0.124904	0.112728	0.104862

Tabla N°28. Datos tabulados de microplaca “vancomicina + cepa resistente + caldo MHS”

MICROPLACA SMHS																			
Antes de incubar																			
1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078	0.0039	0.0019	0.00098	0.00049	0.00024	0.00012	0.000061	0.00003	0.000015	0.000007	0.000003	0.000001
2	0.024	0.067	0.085	0.092	0.069	0.047	0.056	-0.002	0.066	0.042	0.006	0	0.026	0.039	0.031	-0.01	0.053	0.055	0.054
3	0.063	0.04	0.094	0.064	0.106	0.086	0.06	0.058	0.002	-0.012	0.028	-0.021	0.017	-0.013	0.03	0.017	-0.021	0.028	0.015
Después de incubar																			
1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078	0.0039	0.0019	0.00098	0.00049	0.00024	0.00012	0.000061	0.00003	0.000015	0.000007	0.000003	0.000001
2	0.015	0.038	0.052	0.034	0.048	0.063	0.042	0.094	0.027	0.077	0.063	0.086	0.09	0.391	0.177	0.507	0.204	0.208	0.218
3	0.057	0.023	0.069	0.042	0.077	0.066	0.056	0.103	0.056	0.054	0.092	0.12	0.246	0.583	0.337	0.728	0.421	0.336	0.549
Después de incubar																			
1	-0.002	-0.016	0.003	-0.017	0.029	0.029	0.039	0.064	0.059	0.072	0.035	0.11	0.079	0.125	0.437	0.19	0.607	0.227	0.185
2	-0.009	-0.029	-0.033	-0.031	-0.044	-0.006	-0.038	0.029	0.011	0.021	0.06	0.09	0.355	0.138	0.476	0.214	0.155	0.163	0.439
3	-0.006	-0.017	-0.025	-0.022	-0.029	-0.02	-0.004	0.045	0.054	0.066	0.064	0.141	0.229	0.596	0.307	0.711	0.442	0.308	0.534
Promedio	-0.00587	-0.02133	-0.01687	-0.03	0.001	0.01	0.043	0.047333	0.048667	0.04	0.10333	0.132667	0.446	0.192	0.590333	0.283	0.204333	0.208	0.506667
Desv	0.003512	0.006658	0.008903	0.017616	0.013528	0.025239	0.02512	0.039454	0.016073	0.03362	0.021932	0.030501	0.083608	0.130885	0.099654	0.117628	0.198038	0.088913	0.077078
Desv2	0.007756	0.003329	0.009452	0.008806	0.006764	0.012619	0.01256	0.006727	0.008036	0.01681	0.010966	0.015251	0.041804	0.065443	0.049827	0.058814	0.0693049	0.044906	0.038539

Tabla N°29. Datos tabulados de microplaca “vancomicina + cepa sensible + caldo MHS”



MICROPLACA VSMH																				
Antes de incubar																				
1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078	0.0039	0.0019	0.00098	0.00049	0.00024	0.00012	0.000061	0.00003	0.000015	0.000007	0.000003	0.000001	
1	-0.134	-0.094	-0.062	-0.039	-0.111	-0.105	-0.109	-0.08	-0.098	-0.147	-0.072	-0.117	-0.088	-0.108	-0.068	-0.092	-0.094	-0.108	-0.076	-0.095
2	-0.081	-0.035	-0.08	-0.108	-0.065	-0.12	-0.063	-0.101	-0.14	-0.078	-0.128	-0.116	-0.096	-0.065	-0.096	-0.1	-0.096	-0.09	-0.089	
3	-0.089	-0.081	-0.059	-0.101	-0.083	-0.097	-0.068	-0.112	-0.138	-0.081	-0.154	-0.106	-0.128	-0.092	-0.102	-0.105	-0.119	-0.087	-0.12	
Después de incubar																				
1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078	0.0039	0.0019	0.00098	0.00049	0.00024	0.00012	0.000061	0.00003	0.000015	0.000007	0.000003	0.000001	
1	0.049	0.076	0.053	0.062	0.042	0.021	0.062	0.113	0.066	0.077	0.097	0.174	0.345	0.278	0.321	0.363	0.281	0.299	0.287	
2	0.009	0.076	0.053	0.045	0.033	0.029	0.017	0.041	0.028	0.01	0.062	0.039	0.304	0.223	0.33	0.204	0.338	0.376	0.308	
3	0.08	0.068	0.065	0.001	0.034	0.04	0.058	0.037	0.031	0.098	0.027	0.067	0.291	0.377	0.304	0.346	0.34	0.428	0.368	
Resta D-A																				
1	0.63	0.17	0.121	0.151	0.153	0.126	0.171	0.193	0.164	0.224	0.169	0.291	0.433	0.386	0.389	0.413	0.477	0.389	0.375	
2	0.09	0.111	0.06	0.125	0.141	0.094	0.137	0.124	0.129	0.15	0.14	0.167	0.42	0.319	0.395	0.3	0.438	0.472	0.398	
3	0.169	0.169	0.124	0.102	0.117	0.115	0.137	0.126	0.149	0.169	0.179	0.181	0.173	0.419	0.469	0.406	0.451	0.459	0.515	
Promedio	0.147333	0.15	0.117	0.126	0.137	0.11667	0.148333	0.147667	0.149	0.162667	0.213	0.342	0.374667	0.417667	0.373	0.455333	0.44	0.423333	0.406667	
Desv	0.050143	0.033779	0.009644	0.024515	0.01633	0.016258	0.01963	0.03273	0.017559	0.038432	0.020257	0.067912	0.146503	0.050954	0.044557	0.019858	0.044643	0.075076	0.068606	
Desv2	0.025072	0.016969	0.004622	0.012258	0.009165	0.006129	0.009815	0.00618	0.00816	0.01028	0.033956	0.073251	0.029477	0.022279	0.031958	0.009929	0.022322	0.037536	0.034403	

Tabla N°30. Datos tabulados de microplaca “vancomicina + cepa sensible + caldo MH”

MICROPLACA VRMH																			
Antes de incubar																			
1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078	0.0039	0.0019	0.00098	0.00049	0.00024	0.00012	0.000061	0.00003	0.000015	0.000007	0.000003	0.000001
1	-0.098	-0.113	-0.076	-0.094	-0.138	-0.143	-0.153	-0.197	-0.122	-0.095	-0.044	-0.051	-0.067	-0.039	-0.104	-0.051	-0.062	-0.043	-0.085
2	-0.097	-0.061	-0.098	-0.097	-0.049	-0.117	-0.114	-0.111	-0.166	-0.116	-0.058	-0.036	-0.067	-0.045	-0.073	-0.08	-0.085	-0.049	-0.072
3	-0.099	-0.109	-0.058	-0.108	-0.024	-0.152	-0.141	-0.11	-0.115	-0.073	-0.046	-0.051	-0.05	-0.044	-0.051	-0.026	-0.07	-0.046	-0.078
Después de incubar																			
1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078	0.0039	0.0019	0.00098	0.00049	0.00024	0.00012	0.000061	0.00003	0.000015	0.000007	0.000003	0.000001
1	0.062	0.008	0.061	-0.03	0.029	-0.014	0.038	-0.029	-0.021	-0.012	0.045	0.067	0.443	0.466	0.369	0.45	-0.14	0.595	0.378
2	0.001	0.017	0.073	0.01	0.043	0.005	0.011	0.006	-0.018	-0.004	0.045	0.036	0.324	0.314	0.424	0.407	0.276	0.324	0.365
3	0.062	0.029	0.137	-0.044	0.057	-0.022	-0.024	0.075	-0.004	0.085	0.135	0.643	0.569	0.761	0.102	0.632	0.402	0.597	0.549
Resta D-A																			
1	0.16	0.121	0.137	0.043	0.113	0.124	0.187	0.124	0.176	0.11	0.14	0.111	0.494	0.533	0.619	0.473	0.501	-0.058	0.638
2	0.098	0.078	0.171	0.07	0.092	0.122	0.125	0.117	0.148	0.112	0.103	0.072	0.391	0.359	0.497	0.467	0.361	0.373	0.437
3	0.161	0.138	0.195	0.064	0.081	0.144	0.13	0.117	0.185	0.111	0.158	0.161	0.694	0.619	0.805	0.153	0.658	0.472	0.643
Promedio	0.139667	0.112333	0.167667	0.071333	0.095333	0.13	0.147333	0.183333	0.166667	0.111	0.138667	0.127333	0.526333	0.503667	0.640333	0.371	0.506667	0.262333	0.572667
Desv	0.036088	0.03025	0.029443	0.02624	0.016258	0.012766	0.034443	0.040441	0.019296	0.001	0.028042	0.05523	0.154066	0.132459	0.155104	0.168923	0.146581	0.281798	0.171517
Desv2	0.018044	0.015462	0.014572	0.016312	0.008129	0.006083	0.017222	0.020201	0.009648	0.0005	0.014021	0.027615	0.077033	0.066229	0.077552	0.034462	0.074231	0.140899	0.058759

Tabla N°31. Datos tabulados de microplaca “vancomicina + cepa resistente + caldo MH”

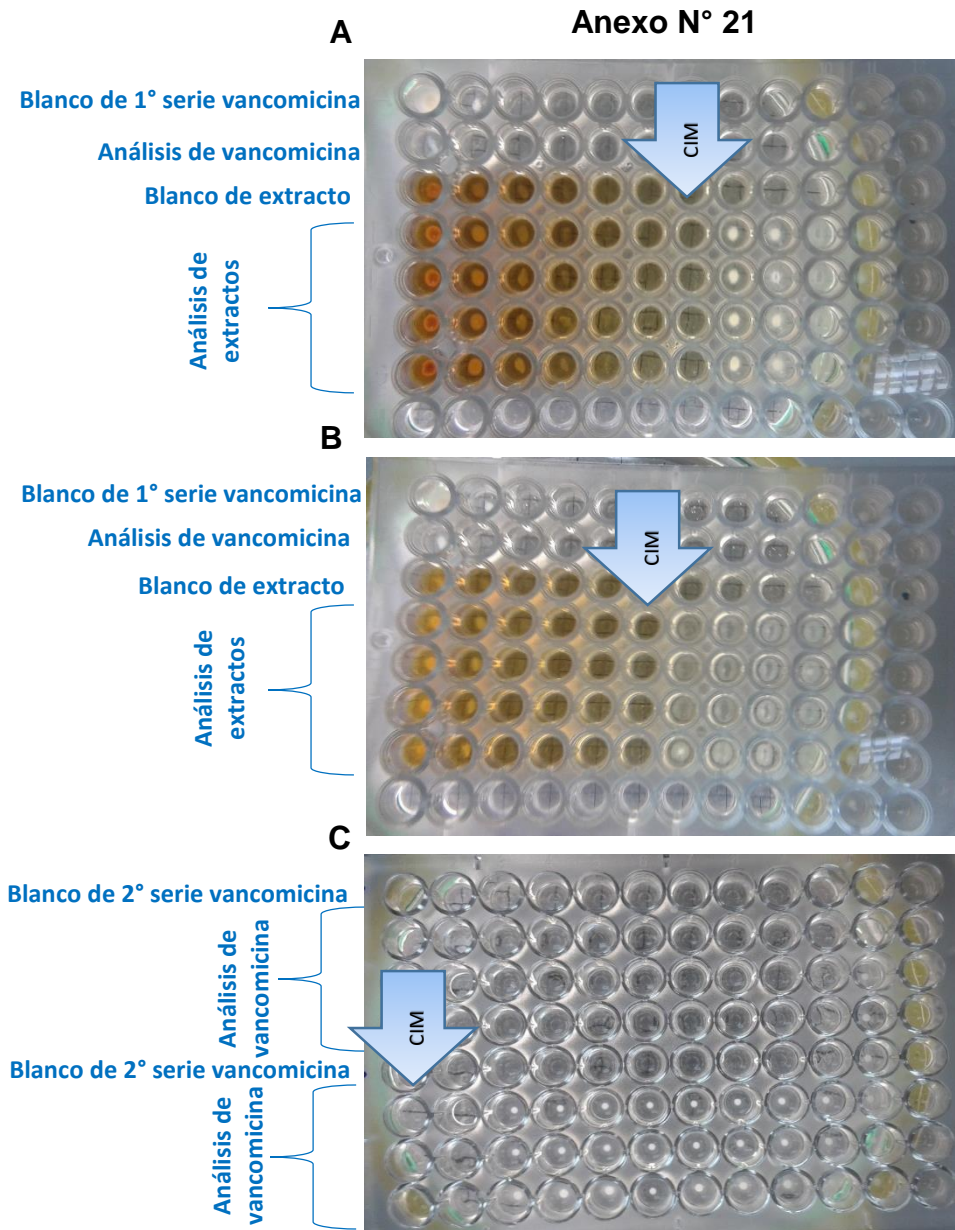


Figura N°29. Ejemplos de microplacas luego de incubación. A) microplaca HiRMH, B) microplaca EtRMH, C) microplaca VRMH.

**Anexo N°22**

**Presentación de los resultados obtenidos**

Ciudad Universitaria, Noviembre de 2015.

Licenciada  
**María Guadalupe Hidalgo de Guzmán**  
Coordinadora Nacional  
Laboratorio Nacional de Referencia  
Red Nacional de Laboratorios de Vigilancia en Salud  
Presente.

Estimada Licda. de Guzmán:

Reciba un cordial saludo, deseándole éxitos en sus labores cotidianas.

Por medio de la presente le hacemos llegar los resultados obtenidos en el trabajo de grado denominado: "**Determinación de la concentración inhibitoria mínima de los extractos de Rosmarinus officinalis (Romero) sobre Staphylococcus aureus resistente a la meticilina**", como parte del acuerdo establecido, en el cual el Laboratorio Nacional de Referencia suministró la cepa *Staphylococcus aureus* resistente con el número de identificación 691231 al estudiante del trabajo de grado **Luis Fernando Lemus Aguilar**.

Los resultados que se muestran continuación corresponden a la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos etanólico (90 % v/v) e hidroalcohólico (70 % v/v), sobre dos cepas de *Staphylococcus aureus*, una cepa sensible y una cepa resistente a la meticilina. De igual manera se proporcionan los valores de CIM presentados por la vancomicina frente a dichas cepas.

Esperando que los resultados presentados respondan al acuerdo establecido, nos suscribimos a usted con toda consideración y estima.

Cordialmente,

"HACIA LA LIBERTAD POR LA CULTURA"

Br. Luis Fernando Lemus Aguilar  
Estudiante de trabajo de graduación

Dra. Tania Cuadra Zelaya  
Docente Asesor

MSc. Mirna Sorto Alvarez  
Docente Asesor

Dr. Rene Francisco Ramos Alvarenga  
Docente Asesor



Instituto Nacional de Salud - INISA  
COORDINACIÓN NACIONAL  
Laboratorio Nacional de Referencia  
RECEPCION DE DOCUMENTOS

Recibido por:

Fecha:

Nota:

Figura N°30. Carta presentada al Laboratorio Nacional de Referencia



Ciudad Universitaria, noviembre de 2015.

Licenciada  
**Margarita Posada**  
Directora ejecutiva  
Asociación de Promotores Comunales Salvadoreños  
Presente.

Estimada Licda. Posada:

Reciba un cordial saludo, deseándole éxitos en sus labores cotidianas.

Por medio de la presente le hacemos llegar los resultados obtenidos en el trabajo de grado denominado: "**Determinación de la concentración inhibitoria mínima de los extractos de *Rosmarinus officinalis* (Romero) sobre *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina**", como parte del acuerdo establecido, en el cual APROCSAL suministró asesoría, material vegetal y los solventes necesarios para la elaboración de los extractos de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) al estudiante del trabajo de grado **Luis Fernando Lemus Aguilar**.

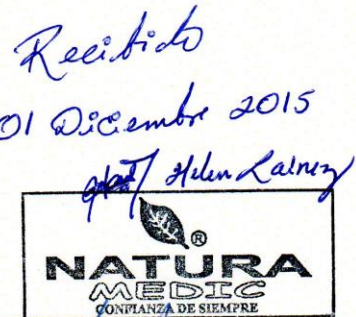
Los resultados que se muestran continuación corresponden a la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos etanólico (90 % v/v) e hidroalcohólico (70 % v/v), sobre dos cepas de *Staphylococcus aureus*, una cepa sensible y una cepa resistente a la meticilina. De igual manera se proporcionan los valores de CIM presentados por la vancomicina frente a dichas cepas.

Esperando que los resultados presentados respondan al acuerdo establecido, nos suscribimos a usted con toda consideración y estima.

Cordialmente,

"HACIA LA LIBERTAD POR LA CULTURA"

Br. Luis Fernando Lemus Aguilar  
Estudiante de trabajo de graduación



Dra. Tania Cuadra Zelaya  
Docente Asesor



MSc. Mirna Sorto Alvarez  
Docente Asesor

Dr. Rene Francisco Ramos Alvarenga  
Docente Asesor

Figura N°31. Carta presentada en APROCSAL.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

Informe de resultados de trabajo de graduación:  
**DETERMINACION DE LA CONCENTRACION INHIBITORIA MINIMA DE  
EXTRACTOS DE *Rosmarinus officinalis* L. (ROMERO) SOBRE *Staphylococcus  
aureus* RESISTENTE A LA METICILINA (SARM)**

Extractos analizados

- Extracto etanólico de romero (solvente: etanol 90 % v/v)
- Extracto hidroalcohólico de romero (solvente: etanol 70 % v/v)

Antibiótico de referencia

- Vancomicina  
Fabricante: Vijosá  
Lote: 150208B  
Fecha de fabricación: 02-15  
Fecha de vencimiento: 02-17

Cepas utilizadas

- *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM)  
Número de identificación: 891231  
Proveedor: Laboratorio Nacional de Referencia  
Lugar de aislamiento: Hospital Nacional de Niños Benjamin Bloom
- *Staphylococcus aureus* sensible a la meticilina (SASM)  
Número de identificación: ATCC 8538  
Proveedor: Laboratorio de Microbiología, Facultad de Química y Farmacia,  
Universidad de El Salvador

Resultados

Extracto o Antibiótico	Medio de cultivo de prueba	CIM cepa SARM	CIM cepa SASM
Etanólico	Mueller Hinton	2000 µg/mL	2000 µg/mL
	Mueller Hinton Salino	2000 µg/mL	4000 µg/mL
Hidroalcohólico	Mueller Hinton	1000 µg/mL	2000 µg/mL
	Mueller Hinton Salino	1000 µg/mL	2000 µg/mL
Vancomicina	Mueller Hinton	0.49 µg/mL	0.98 µg/mL
	Mueller Hinton Salino	0.98 µg/mL	0.98 µg/mL

Figura N°32. Hoja de resultados.

- El extracto hidroalcohólico presenta mayor actividad antimicrobiana para inhibir el crecimiento de la cepa resistente que el presentado por el extracto etanólico.
- La cepa resistente presenta una mayor sensibilidad frente a los extractos de romero que la cepa sensible.
- La vancomicina presenta concentraciones inhibitorias mínimas dentro del criterio establecido por la literatura sobre las dos cepas estudiadas (rango de corte clínico para definir sensibilidad a la vancomicina por *Staphylococcus aureus*:  $\leq 1 \mu\text{g/mL}$ ).

Conclusión:

- Los análisis estadísticos indicaron que los extractos de Romero a concentraciones mayores a  $2000 \mu\text{g/mL}$  presentan actividad antibacteriana sobre las dos cepas de *Staphylococcus aureus* estudiadas, y que la Vancomicina presenta dicha actividad a concentraciones mayores a  $0.98 \mu\text{g/mL}$ .

Recomendaciones:

- Continuar con investigaciones que confirmen la CIM de los extractos frente a otros microorganismos patógenos, ausencia de toxicidad en humanos, y sinergismo con otros medicamentos, antes de poder establecer la seguridad del uso de ellos en mejores tratamientos contra infecciones bacterianas causadas por diferentes tipos de microorganismos.
- Si bien las dos cepas estudiadas presentaron sensibilidad a la vancomicina, se debe tener precaución con la aplicación de vancomicina para el tratamiento de infecciones por cepas sensibles a meticilina, debido a que los resultados muestran que los valores de CIM obtenidos están en el límite sugerido para cepas tratables con efectividad por este antibiótico, lo cual sugiere la posibilidad de que estas cepas adquieran resistencia a este antimicrobiano.



Br. Luís Fernando Lemus Aguilar  
Estudiante de trabajo de graduación



Dra. Tania Cuadra Zelaya  
Docente Asesor



MSc. Mirna Sorto Álvarez  
Docente Asesor




Dr. Rene Francisco Ramos Alvarenga  
Docente Asesor

Bibliografía

1. Mensa, J.; Soriano, A.; Linares, P.; Barberán, J.; Montejo, M.; Salavert, M.; Alvarez-Rocha, L.; Maseda, E.; Moreno, A.; Pasquau, J.; Gómez, J.; Parra, J.; Candel, J.; Azanza, J. R.; García, J. E.; Marco, F.; Soy, D.; Grau, S.; Arias, J.; Fortún, J.; Aristides de Alarcón, C.; Picazo, J.; Sociedad Española de Quimioterapia; Sociedad Española de Medicina

Figura N°32. Continuación.