

EFECTO INHIBITORIO *IN VITRO* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Rosmarinus officinalis* L. "Romero" SOBRE EL CRECIMIENTO *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

INHIBITORY EFFECT OF ETHANOL EXTRACT *IN VITRO* *Rosmarinus officinalis* L. "Romero" ON GROWTH *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Yuri Y. Rodríguez Flores¹
Sally Espinoza Peralta²
Martha Vergara Espinoza³

RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo determinar el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. "Romero" sobre el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* (RE1,RE2,RE3) , *Staphylococcus aureus* (SY1,SY2,SY3) y *Pseudomonas aeruginosa* (PF1,PF2,PF3), enfrentándolas a concentraciones de 5; 10; 15; 20; 25; 30; 35;40;45 y 50 mg/ml del producto vegetal. El extracto se obtuvo mediante el método descrito por Céspedes 2000 el cual fue modificado para efecto de este trabajo; para la prueba de susceptibilidad *in vitro* de las cepas se utilizó el método de difusión de Kirby Bauer. Los resultados estos mostraron que el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) no tiene efecto inhibitorio sobre las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (PF1, PF2, PF3) y la cepa SY1 de *Staphylococcus aureus*; sin embargo tuvo efecto inhibitorio sobre las cepas RE1, RE2, RE3 de *Streptococcus pyogenes* obteniéndose halos de inhibición de 8.67mm. (cepa RE1) a concentración de 5 mg/ml y de 12.33mm. (cepa RE3) a concentración de 35 mg/ml. ; y el efecto en las cepas SY2 y SY3 de *Staphylococcus aureus* produjo halos de inhibición de 7mm. (cepa SY3) a concentración de 5mg/ml. y de 10mm. (cepa SY2) a concentración de 25 mg/ml. Por otro lado los diámetros de halos de inhibición que presentan dichas cepas son similares entre sí a las concentraciones de 35 a 50 mg/ml. La conclusión de este estudio nos muestra que el extracto etanólico de romero tiene efecto inhibitorio sobre *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*, bacterias implicadas en infecciones de las vías respiratorias altas; y que sobre *Pseudomonas aeruginosa* dicho extracto no ejerció efecto alguno.

Palabras clave: *Rosmarinus officinalis*, *streptococcus pyogenes*, *staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, extracto etanólico

ABSTRACT

The present research work had objective to determining the *in vitro* the inhibitory effect of ethanol extract of *Rosmarinus officinalis* L. "Romero" on the growth of *Streptococcus pyogenes* (RE1, RE2, RE3), *Staphylococcus aureus* (SY1, SY2, SY3) and *Pseudomonas aeruginosa* (PF1, PF2, PF3), facing them at concentrations of 5, 10, 15, 20, 25 , 30, 35, 40, 45 and 50 mg / ml of the plant product. The extract was obtained by the method described by Céspedes 2000 which was modified for the purposes of this paper, for *in vitro* susceptibility testing of strains was used the diffusion method of Kirby Bauer. The results these showed that the ethanol extract of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) had no inhibitory effect on strains of *Pseudomonas aeruginosa* (PF1, PF2, PF3) and SY1 strain of *Staphylococcus aureus*, but had inhibitory effect on strains RE1, RE2, RE3 of *Streptococcus pyogenes* inhibition halos yielding 8.67 mm. (strain RE1) a concentration of 5 mg / ml and 12.33mm. (strain RE3) to concentration of 35 mg / ml. , And the effect on SY2 and SY3 strains of *Staphylococcus aureus* inhibition halos produced 7mm. (strain SY3) at a concentration of 5mg/ml. and 10mm. (strain SY2) at a concentration of 25 mg / ml. On the other hand the diameters of inhibition zones exhibiting such strains are similar to each other at the concentrations of 35 to 50 mg / ml. In conclusions this study shows that the ethanol extract of rosemary inhibitory effect on *Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus aureus*, bacteria involved in infections of the upper respiratory tract, and *Pseudomonas aeruginosa* on the extract had no effect.

Keywords: *Rosmarinus officinalis*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, ethanol extract.

¹ Adscrito al Centro de Salud Toribia Castro Chirinos.Licenciado en Biología Microbiología y Parasitología. Lambayeque. Perú. Dirección de correo: shyboy_25@hotmail.com

² Adscrita al Centro de Salud Pomalca. Licenciada en Biología Microbiología y Parasitología. Lambayeque. Perú. Dirección de correo: sallyep_25@hotmail.com

³ Adscrita a la Facultad de Ciencias Biológicas – UNPRG. Doctora en Microbiología, Lambayeque. Perú. Dirección de correo: mavergaraes@hotmail.com

1. Introducción

En el Perú y en diversas partes del mundo *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” es una planta medicinal utilizada empíricamente por la población como alternativa en la cura de diversas enfermedades, los productos de dicha planta tienen acción expectorante, antifúngica y antibacteriana sobre agentes que causan infecciones sobre las vías respiratorias, además son antioxidantes, antipiréticos, diuréticos, antiespasmódicos²⁷; las principales formas de uso son la inhalación e infusión lo cual indica que la planta posee compuestos que le confieren propiedades antes mencionadas y que influyen en la mejoría del estado de salud del paciente. Se afirma que la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de “romero” se deba a las esencias volátiles (cineol, borneol, alcanfor), flavonoides (diosmina, luteolina, apigenina), glucósidos, ácidos fenólicos (cafeico, rosmarínico) y saponinas⁷.

A pesar que se conocen diversas aplicaciones del Romero, son pocas las investigaciones realizadas en relación al efecto inhibitorio de productos como aceites esenciales y extractos extraídos del “Romero”; así se determinó la inhibición del crecimiento de *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* por el efecto del extracto etanólico de la mencionada planta^{30,32}, con resultados variables en la inhibición de dichas bacterias.

Asimismo las bacterias utilizadas en la presente investigación : *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* están involucradas en infecciones del tracto respiratorio superior y de la piel, las cuales persisten en la comunidad como una causa fundamental de morbimortalidad y cuya gravedad es mayor en la población infantil, radicando la importancia de estos microorganismos en la resistencia a antimicrobianos de uso común en el tratamiento de las afecciones respiratorias y de la piel¹⁹.

La medicina actual utiliza una gran diversidad de plantas medicinales para el tratamiento de las enfermedades, por lo que hoy en día existe mucho interés en determinar el efecto antibacteriano de estas plantas. Por tal motivo se realiza el presente estudio *in vitro* para determinar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L” Romero “a concentraciones de 5 a 50 mg/ml sobre el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* (RE1, RE2, RE3), *Staphylococcus aureus* (SY1, SY2, SY3) y *Pseudomonas aeruginosa* (PF1, PF2, PF3).

2. Materiales y Métodos.

Población y Muestra en estudio.

Siendo un trabajo experimental el tamaño de la muestra estuvo constituido por 90 unidades experimentales; que corresponden a 1 tipo de extracto; 10 concentraciones; 3 especies bacterianas procedente de nuestras clínicas y 3 cepas por cada especie. Con 3 repeticiones en el experimento totalizando 270 unidades experimentales.

Material Biológico.

Estuvo conformado por Hojas de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) provenientes de Cajamarca que se expenden en el mercado modelo de la ciudad de Chiclayo. Tres cepas de *Streptococcus pyogenes* RE1, RE2, RE3; *Staphylococcus aureus* SY1, SY2, SY3, y *Pseudomonas aeruginosa* PF1, PF2, PF3, identificadas y codificadas en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Preparación y Estandarización del Inóculo Bacteriano⁹.

El inóculo debe ser apropiado ya que *in Vitro* la actividad de los antimicrobianos disminuye aparentemente a medida que se incrementa la biomasa, para ello se estandarizó el inóculo a una

densidad poblacional igual al tubo Nº 0,5 del Nefelómetro de Mac Farland (1.5×10^8 bacterias / ml) de tal manera que se trabajó con una biomasa estándar para todos los ensayos.

Preparación de la Solución Madre del Extracto Etanólico de Romero¹⁶ (modificado).

Para la obtención de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. se preparó una solución stock que consistió en colocar 5g del extracto en un tubo de ensayo al cual se le agregó alcohol de 96° hasta llegar a un volumen de 10 ml de modo tal que se obtuvo una concentración de 500 mg/ml.

A partir de esta solución se preparó utilizando agua destilada estéril las concentraciones del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L.

Preparación de los Discos de Sensibilidad.

Se empleó papel filtro watman Nº 1 para obtener discos de 5 mm de diámetro, estos discos se colocaron en tubos y se esterilizaron en autoclave a 15 lb de presión 121°C por 15 minutos, para luego ser secados en horno a 60°C por hora, se colocaron los discos en placas petri estériles, donde fueron impregnados con 10ul del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. a concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 y 50 mg/ml. los cuales se dejaron secar por espacio de 15 minutos.

Prueba de Susceptibilidad Bacteriana.

Se prepararon placas petri conteniendo agar nutritivo suplementado con suero sanguíneo a las cuales se les efectuó un control de esterilización a 37°C por 24 horas, para luego sembrar en ellas los cultivos jóvenes estandarizados de los microorganismos en estudio dejándolas secar por unos minutos antes de colocarles los discos impregnados con el extracto etanólico a las diferentes concentraciones junto con un disco control. Estas placas se incubaron a 37°C por un espacio de 18 a 24 horas, efectuándose las mediciones de los halos de inhibición a todas las repeticiones.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico de Datos.

En el presente trabajo se utilizó el diseño experimental de estímulo creciente,,,,,, los grupos experimentales fueron las cepas bacterianas a las cuales se les aplicó como estímulo el extracto etanólico de romero a diferentes concentraciones con tres repeticiones. De acuerdo a este diseño se trabajó con dos variables, una variable independiente: concentración del extracto etanólico de romero y la variable dependiente: crecimiento de las cepas bacterianas. Para el análisis estadístico de los datos se aplicó el análisis de varianza (ANAVA) con arreglo factorial de 10 x 3, siendo el primer factor las concentraciones del extracto etanólico (5,10,15,20,25,30,35,40,45,50 mg/ml) y el segundo factor las 3 cepas bacterianas (3 por cada especie), este análisis se complementó con la prueba de tukey (0.05). Para todo ello se utilizó el software estadístico: Statistica versión 5 y Ms Excel 2000.

3. Resultados

3.1. Obtención del Extracto Etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. "Romero"

Se procesó 2.5kg de hojas de Romero, para luego proceder a la limpieza manual, tratando en lo posible que estén libres de elementos extraños, inmediatamente se lavó con agua destilada, seleccionando las hojas en buen estado. Estas hojas fueron secadas en un ambiente ventilado bajo condiciones de sombra, una vez secas las hoja se procedió al molido obteniéndose una cantidad de 198.5g para luego iniciar la maceración con etanol de 96° en relación de 1:2 en volumen, transcurrida la semana de maceración se obtuvo el extracto etanólico en una cantidad de 55g., siendo almacenado en refrigeración.

3.2. Determinación del Efecto Inhibitorio.

Los resultados obtenidos demostraron que: *Streptococcus pyogenes* (RE1, RE2, RE3) y *Staphylococcus aureus* (SY2, SY3) fueron sensibles al extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” produciéndose halos de inhibición cuyos diámetros promedio aumentaban a medida que se incrementaba las concentraciones del extracto. *Pseudomonas aeruginosa* (PF1, PF2, PF3) mostró resistencia al extracto etanólico.

Asimismo se observa que *Streptococcus pyogenes* mostró ser más sensible cuyo rango del tamaño del promedio de los halos de inhibición fue de 8.89 a 12.11mm., y que frente a la concentración del extracto etanólico de 35mg/ml, la cepa RE1 y RE3 de *Streptococcus pyogenes* mostraron menor y mayor sensibilidad respectivamente. (TABLA 1; Fig.1).

TABLA 1: Promedio de halos de inhibición (mm) de *Streptococcus pyogenes* producidos por el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero”.

Concentración extracto etanólico mg/ml	Promedio de halos de inhibición (mm)			
	<i>Streptococcus pyogenes</i>			
	RE1	RE2	RE3	PROM
5	8.67	9	9	8.89
10	8.67	9.67	9	9.11
15	10	10.67	10.67	10.45
20	10.33	10.67	11	10.67
25	11.3	11	12	11.44
30	12	11.33	12.33	11.89
35	12	12	12.33	12.11
40	11.67	12	12	11.89
45	11.67	11.67	11.67	11.67
50	11.33	11.33	10.67	11.11
PROMEDIO	10.77	10.93	11.07	

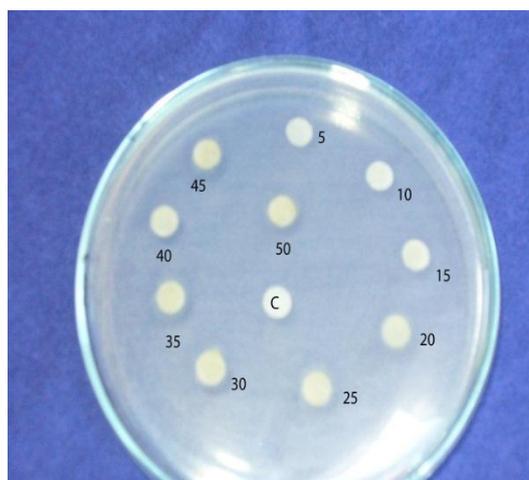


FIGURA 1: Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L.” Romero “sobre el crecimiento de *Streptococcus pyogenes*.

Respecto a *Staphylococcus aureus* el rango del tamaño del promedio de los halos de inhibición fue de 7.84 a 9.84mm., en relación al efecto inhibitorio global la cepa SY2 tuvo un promedio de halos de inhibición de 8.9mm. y la cepa SY3 de 9.67mm., sin embargo específicamente a la concentración del extracto etanólico de 35mg/ml, la cepa SY2 y SY3 de *Staphylococcus aureus* mostraron mayor y menor sensibilidad respectivamente. (TABLA 2; Fig.2).

TABLA 2: Promedio de halos de inhibición (mm) de *Staphylococcus aureus* producidos por el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero”.

Concentración extracto etanólico mg/ml	Promedio de halos de inhibición (mm)		
	<i>Staphylococcus aureus</i>		
	SY2	SY3	PROM
5	8.67	7	7.84
10	9	8	8.5
15	9.33	8.67	9
20	9.67	9	9.34
25	10	9	9.5
30	10	9.33	9.67
35	10	9.67	9.84
40	10	9.67	9.84
45	10	9.67	9.84
50	10	9.67	9.84
PROMEDIO	9.67	8.97	

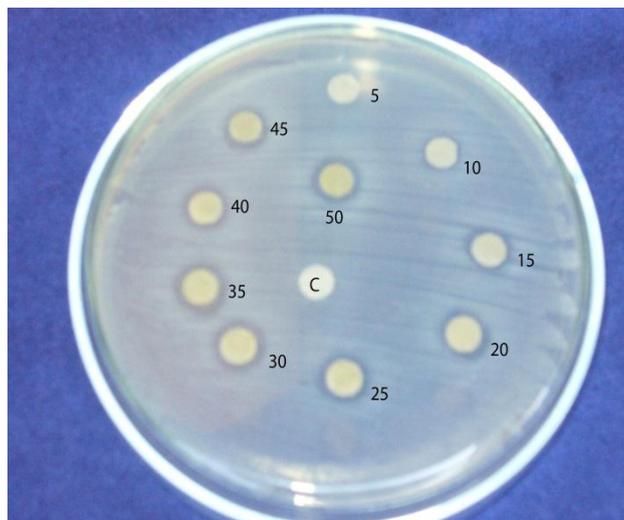


FIGURA 2: Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Las variables cepa y concentración del extracto influyeron significativamente en el efecto del extracto etanólico del romero sobre el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* como se muestra en el análisis de varianza (TABLA 3), donde se observa que en las cepas el efecto del extracto etanólico de romero es diferente, así como con cada una de las concentraciones del extracto, del mismo modo ocurre con las interacciones de estas variables.

TABLA 3: Análisis de Varianza (ANAVA) de los promedios de los halos de inhibición (mm) de las cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* por efecto de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero”

Fuente De Variación	GL	SC	CM	FC	FT	DECISIÓN
Cepas	4	101.51	25.38	115.35	2.45	Rechaza H₀₁
Concentraciones	9	122.11	13.57	61.67	1.96	Rechaza H₀₂
Cepa * Conc.	36	18.63	0.52	2.35	1.50	Rechazar H₀₃
Error	100	22	0.22			
Total	149					

Para el factor cepa (Tabla 4 y Fig. 4) según la prueba de Tukey nos indica que las cepas más sensibles al efecto del extracto etanólico fueron las de *Streptococcus pyogenes* (RE1, RE2, RE3), las cepas de *Staphylococcus aureus* (SY2, SY3) tienen una respuesta de sensibilidad diferente.

TABLA 4: Prueba de Significancia de Tukey (0.05) del promedio de halos de inhibición de las cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* por el efecto de del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L.”Romero”.

Cepa	Promedio de halo (mm)	Significancia
SY3	8.97	a
SY2	9.67	b
RE1	10.77	c
RE2	10.93	c
RE3	11.07	c

SY2 y SY3 = Cepas de *Staphylococcus aureus*

RE1, RE2, RE3 = Cepas de *Streptococcus pyogenes*

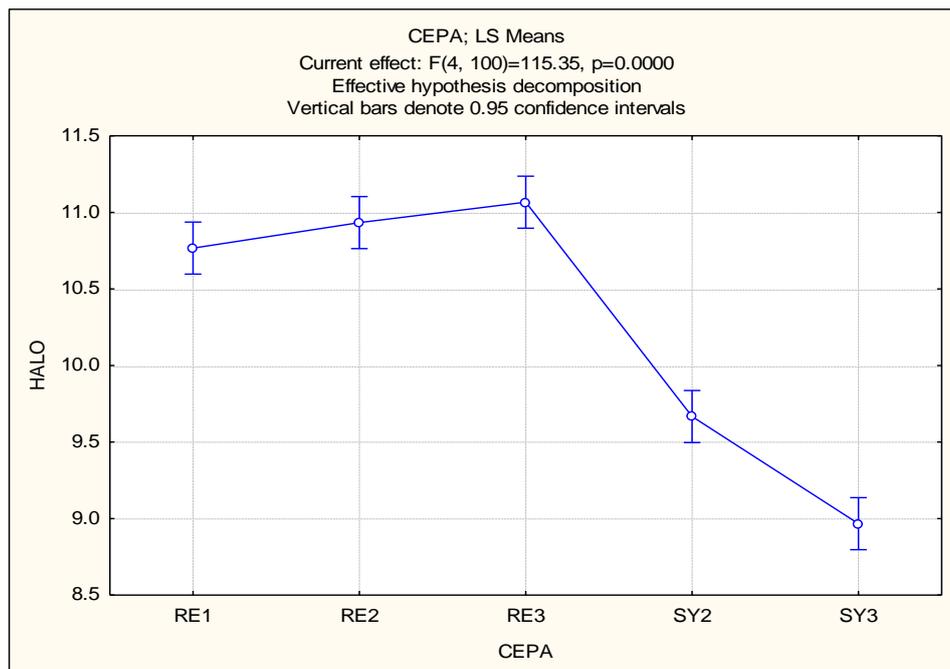


Figura 4: Promedios de halos de inhibición (mm) de cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* por el efecto del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero”.

Según la prueba de Tukey (TABLA 5 y Fig. 5) se observó que existe un comportamiento similar entre las concentraciones de 5 y 10 mg/ml siendo diferentes a las concentraciones de 15 y 20 mg/ml y estas similares entre si; y que a 35 mg/ml el comportamiento es diferente a las demás ya que presenta el mayor diámetro del halo de inhibición.

TABLA 5: Prueba de Significancia de Tukey (0.05) de los promedios de halos de inhibición de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* por el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” en relación a sus concentraciones.

Concentración (mg/ml)	Promedio de halo	Significancia
5	8.47	a
10	8.87	a
15	9.87	b
20	10.33	b c
50	10.6	c d
25	10.67	c d e
45	10.93	d e
30	11	d e
40	11.07	d e
35	11.2	e

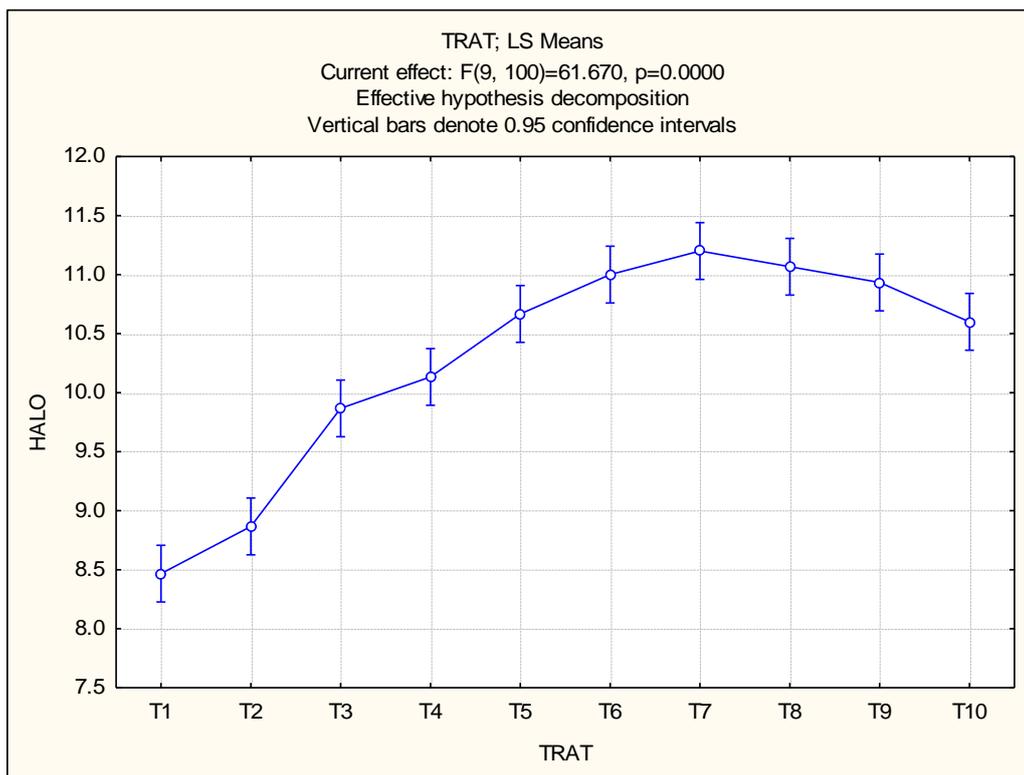


Figura 5: Promedios de halos de inhibición (mm) de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* en relación a las concentraciones del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero”.

4. Discusión

Los resultados obtenidos en el efecto inhibitorio del extracto mostraron que hubo inhibición del crecimiento de las cepas de *Streptococcus pyogenes* y de la mayoría de las cepas de *Staphylococcus aureus*, pero el producto no mostró efectividad con las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Observaciones que concuerdan con los resultados de Moreno³² y Del Campo⁸ considerándose que las bacterias gram positivas muestran mayor sensibilidad a los productos en función a la mayor permeabilidad que ofrecen sus envolturas (pared celular y membrana citoplásmica); en cambio *Pseudomonas aeruginosa* por ser una bacteria gram negativa posee una pared de naturaleza hidrófoba que actúa como barrera de difusión a moléculas grandes dándole mayor impermeabilidad, incluso éste es mayor en 100 veces a la de otras bacterias gramnegativas²⁸, a esto se le agrega que dicha resistencia podría deberse a la presencia de un material extracromosómico en algunas cepas, determinando genéticamente la resistencia a los antimicrobianos.

De acuerdo con Moreno *et al*³², concentraciones de 15 mg/ml de extracto etanólico de romero y menores producen inhibición del crecimiento de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* (bacterias gram positivas) por las razones ya expuestas, así mismo el mencionado autor encuentra que a concentraciones de 2 a 60 mg/ml inhiben a bacterias gram negativas, sin embargo en el presente estudio todas las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resultaron ser resistentes a las mismas concentraciones explicándose esto en el hecho de que el mencionado autor no especifica el tipo de bacteria gram negativa existiendo la posibilidad de que sean especies diferentes a la empleada en el presente estudio.

Streptococcus pyogenes y *Staphylococcus aureus* registraron un crecimiento gradual del halo inhibitorio conforme se incrementaban las concentraciones del extracto excepto a partir de la concentración

de 35 mg/ml y siguientes en los que los halos de inhibición fueron similares; así a concentraciones de 5 a 25mg de extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” por ml. el promedio de halos de inhibición de *Streptococcus pyogenes* se incrementa de 8.89 a 11.44mm. y los de *Staphylococcus aureus* de 7.84 a 9.5mm.; se confirma que a menores concentraciones las sustancias con actividad inhibitoria no se difunden con uniformidad en el agar siendo necesario aumentar dicha concentración para obtener una mejor difusión un halo visible y de fácil lectura²¹.

La actividad inhibitoria del extracto etanólico se debe a los compuestos químicos de *Rosmarinus officinalis* L. como a la estructura propia de *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*, respecto a los compuestos químicos se considera que son los ácidos fenoles y particularmente el ácido rosmarinico los que tienen mayor efecto sobre los microorganismos, poseen propiedades antimicrobianas las cuales son potenciadas por los flavonoides, estos últimos potencian el grado de liposubilidad del extracto que le permite atravesar las membranas celulares por difusión pasiva con ello contribuye también las saponinas que alteran la tensión superficial de los lípidos de la membrana celular. Sin embargo en el presente estudio al igual que el trabajo de Moreno³², los halos de inhibición no son extensos, lo cual en concordancia con Craker et al⁷, Muñoz et al³⁴ y Valencia y Vigo⁴¹, los compuestos mencionados que tienen la actividad biológica se encuentran en menores concentraciones en comparación a los constituyentes influyendo en su actividad; asimismo, se concluye que los productos obtenidos de romero como los aceites esenciales tienen actividad antibiótica leve¹⁰.

Se obtuvo una gran actividad inhibitoria con las concentraciones de 25 a 35mg/ml para *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* respectivamente, los halos de inhibición que se formaron fueron de 10mm para la cepa SY2 de *Staphylococcus aureus* y de 12.33mm. para la cepa RE3 de *Streptococcus pyogenes*; los diámetros promedios de los halos de inhibición de crecimiento de *Rosmarinus officinalis* L. caracterizan a *Staphylococcus aureus* (SY2, SY3) como sensible y a *Streptococcus pyogenes* (RE1, RE2, RE3) como más sensible, por el hecho de existir un halo tanto en el disco con menor y mayor concentración de extracto, lo cual concuerda con la interpretación de Koneman²¹, sin embargo el tamaño de dichos halos pueden considerarse muy pequeños ya que debe tenerse en cuenta que el compuesto inhibitor no se encuentra aislado, sino formando parte de una gran variedad de compuestos fitoquímicos dentro del extracto.

Respecto a los microorganismos, se demuestra que *Streptococcus pyogenes* posee una mayor sensibilidad que *Staphylococcus aureus* asumiéndose por un lado a la presencia de proteína M y ácido lipoteicoico en mayor proporción en su pared celular, respecto a *Staphylococcus aureus* las cepas de esta especie tuvieron un comportamiento de sensibilidad diferente frente al extracto etanólico de romero, comprobándose esto con los resultados obtenidos por las cepas SY1, probablemente se deba a la estructura en particular de cada una de estas, ya que algunas cepas de *Staphylococcus aureus* poseen capsula, otras una cubierta polisacárida y otras ninguna de las estructuras mencionadas²⁰. Asimismo la comparación entre especies muestra una mayor sensibilidad de *Streptococcus pyogenes* al extracto etanólico que *Staphylococcus aureus*, lo que se justifica en su estructura de la pared celular de la primera especie constituida por peptidoglicano típico con puentes intercatenarios con un grado de entrecruzamiento del 50% menos que en *Staphylococcus aureus*, lo que facilita la difusión y la acción de los compuestos químicos presentes en el extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero”²¹. Estas particularidades que presentan las bacterias mencionadas y que influyen en la resistencia o sensibilidad a los productos se confirma con los informes del Servicio del Laboratorio de Microbiología del Hospital Regional Docente Las Mercedes – Chiclayo, en los que las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas muestran mayor resistencia a los antimicrobianos a los cuales se enfrentan en las pruebas de sensibilidad (antibiograma).

A diferencia de Morelli *et al*³¹ quienes encontraron una CMI del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L. “Romero” sobre *Streptococcus pyogenes* de 250 mg/ml; en el presente estudio se demuestra que a concentraciones de 5 mg/ml de extracto etanólico el microorganismo es inhibido considerándose esta diferencia al tipo de producto vegetal utilizado ya que como es conocido los aceites esenciales carecen de flavonoides, por su parte el extracto etanólico si posee flavonoides que son los compuestos que contribuyen con la capacidad microbicida del ácido rosmarinico; esta observación también es sugerida por Mangena *et al*²⁶ quienes consideran como factor importante en la actividad antimicrobiana de romero a la concentración del aceite.

En el presente estudio se encontró una mayor variación del efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* concordándose en términos generales con los resultados de Moreno³² ya que el efecto inhibitorio del extracto etanólico usado por el autor a concentración de 50mg/ml fue menor que el obtenido en esta investigación (10 y 9.67mm), esto se debería al método de extracción del producto vegetal y que a diferencia del estudio en mención se obtuvo sin previo calentamiento lo que sugiere menores probabilidades de alteración de algún principio activo de *Rosmarinus officinalis* L.; a esto debe incrementarse la posibilidad de la variabilidad de las cepas trabajadas, las del presente estudio fueron aisladas de infecciones respiratorias y las de Moreno³² se aislaron de piel y de infecciones urinarias.

Para la obtención del extracto etanólico de romero, el método utilizado fue modificado y consistía en una maceración única lo que se diferencia de los trabajos de Moreno³² quien realizó un secado en estufa y un calentamiento a 60° por 30 minutos de masa seca para luego ser macerado por una semana y el de Montalvo y Vidarte³⁰ quienes después de macerar el producto por una semana utilizaron un sistema de evaporación rotatorio 110V (Rotaevaporador) y una plancha térmica a 30°C para facilitar la volatilización del etanol y así obtener el extracto etanólico. Los métodos de extracción de los productos vegetales permiten que algunos de sus principios activos por sus características propias se encuentran en mayor o menor concentración lo que influye en la capacidad inhibitoria del producto; en el caso del etanol, este producto presenta mayor actividad como solvente de extracción debido a la polaridad que permite arrastrar la mayoría de los compuestos químicos de baja a mediana polaridad como terpenos y de alta polaridad como flavonoides⁴².

5. Conclusiones

El extracto etanólico de hojas de *Rosmarinus officinalis* L. a concentraciones de 5 a 50 mg/ml tuvo efecto inhibitorio *in vitro* sobre el crecimiento de todas las cepas de *Streptococcus pyogenes* y de las cepas SY2, SY3 de *Staphylococcus aureus*, y no ejerció efecto inhibitorio sobre la cepa SY1 de *Staphylococcus aureus* y las cepas PF1, PF2, PF3 de *Pseudomonas aeruginosa*. El extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. presentó mayor efecto inhibitorio *in vitro* a una concentración de 35mg/ml sobre la cepa RE3 de *Streptococcus pyogenes* con un promedio de halo de inhibición de 12.33mm. y la cepa SY2 de *Staphylococcus aureus* con un promedio de halo de inhibición de 10mm.

6. Referencias Bibliográficas

1. Alvitres, V. Método Científico. Planificación de la investigación. Ed.Ciencia .Chiclayo – Perú. 2000.
2. Arévalo, H, Melgar R, Núñez A, Principales bacterias asociadas a infecciones intrahospitalarias, San Martín. Rev. Peru Méd Exp Salud Pública. 2002; 19:21-23.
3. Aruoma O, Spencer J, Rossi J, Aeschbach R, An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of rosemary and rovenal herbs. Pharmacology Group, University of London Kings Collage. London – Reino Unido. 1998

4. Bown D. Enciclopedia de las hierbas y sus usos. The Royal Horticultural Society .Grijaldo Mondacori. S.A. Barcelona – España. 1996
5. Bremness L. Herbs.Dorling Kindersley Linlimited. London – England. 1994
6. Céspedes V, Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Piper aduncum* L. (Matico) frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis para optar el título de Lic. En Biología – Microbiología y Parasitología. FF.CC.BB – UNPRG .Lambayeque – Perú. 2000.
7. Craker L Simon J. Herbs: spices and Medicinal plants: recent advances in botany and Pharmacology. 1ra Edición. Oryx Press. 1984.
8. Del campo J Amiot M, Lapierre C, Actividad antimicrobiana de extractos fenólicos de romero. Avignon – Francia. 1998.
9. Difco El antibiograma. Información Técnica .Detroit in USA. 1997.
10. Duke J. Handbook of biologically activite fitochemicals and their activities.Economic botany. 1985.
11. Faleiro, L, Guerrero C, Brito J. Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *Rosmarinus officinalis*, *Timo mastichina*, *Timo albicans*.Oporto – Portugal 1999.
12. FIA. Plantas medicinales y aromáticas evaluadas en Chile. Resultados de proyectos impulsados por FIA. Fundación para la innovación agraria. Universidad de Concepción, Universidad de Talca. Santiago – Chile. 2003.
13. Fontquer, P. Plantas medicinales. El Dioscórides renovado.7ma edición.Editorial Labor S.A. Barcelona – España. 1981.
14. García J, Picazo J. Microbiología Médica. Tomo I. Editorial Mosby – Doyma. Madrid – España. 1996.
15. García J, Picazo J. Microbiología Médica. Tomo II Editorial Mosby – Doyma. Madrid – España. 1996.
16. Gonzáles L. Efecto antibacteriano *in Vitro* del extracto de Ajo (*Allium sativum*). Tesis para optar el título de Lic. En Biología – Microbiología y Parasitología. FCC.BB – UNPRG .Lambayeque – Perú. 1994.
17. González M, Peña E, Ventura R, López F, Detección y comparación del efecto anticonceptivo de *Rosmarinus officinalis* L. en modelo PIFIR. Rev. Mex. Anest; 2006;29(2): 80 – 85.
18. Hoffmann A, Farga C, Lastra J y Veghazi E, Plantas Medicinales de uso común en Chile.2da Edición. Ediciones Fundación Claudio Ga . Santiago – Chile. 1992.
19. Hospital Regional Docente las Mercedes. Departamento de Estadística y Microbiología. Enero – Septiembre – 2004.
20. Jawest, Melnick y Adelberg. Microbiología Médica .17ª Edición. Editorial Manual Moderno. México. 2002.
21. Koneman W, Diagnóstico Microbiológico .5º Edición. Editorial. Panamericana. S.A. Buenos Aires – Argentina. 2000.
22. KuklinskiI, C,armacognosia.1ra Edición. Editorial Omega.S.A. Barcelona – España. 2000.
23. Larrondo, J, Calvo M, Antimicrobial activity of essences from properties a potencial source of *Rosmarinus acid*. Pharm.Acta. Helv. 1995;66(7) 185 – 188.
24. Lock, O. Investigación fitoquímica: Métodos para el estudio de productos naturales. 2da.Edic.Fondo editorial PUCP – Lima. 1994.
25. Mabey, R . La era de las hierbas. 1ra Edición. Editorial Everest S.A. España. 1998.
26. Mangena T, Muyina N, Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officimnalis* on select bacteria and yeast strain. Lett .Apple Microbiol 1999;28 (4): 291 – 296 pp.
27. Martinez, S; J, De la Paz; A, Corral y C, Martinez. Actividad diurética y antipirética de un extracto fluido de *Rosmarinus officinalis* L. en ratas. Rev. Cubana. Plant. Med. 2004;9(1).

28. Mims, Playfair, Roitt, Wakelin y Willians. Microbiología Médica. Edit. Diorki Madrid – España. 1995.
29. Montalvo M, Soria M, Patrones de resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* productora de betalactamasas procedentes de muestras clínicas, hospital regional docente “Las Mercedes” Tesis para optar el grado de licenciado en Biología F.F.C.C.B.B – Lambayeque. 2002.
30. Montalvo M y Vidarte D, Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico y fracción hexánica de “canela” *Cinnamomum zeylanicum*, “romero” *Rosmarinus officinalis* y “tomillo” *Thymus vulgaris* sobre cepas de *Candida albicans* procedentes de muestras clínicas. Tesis para optar el grado de licenciado en Biología F.F.C.C.BB – Lambayeque. 2001
31. Morelli, I; B, Flaminil. Composition and antimicrobial properties of essential oils four Mediterranean Lamiacea. J Ethnopharmacology. 1993;39(3): 167 – 170.
32. Moreno E, Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* “Romero”, frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Tesis para optar el grado de licenciado en Biología F.F.C.C.B.B – Lambayeque. 2006.
33. Muñoz F, Plantas medicinales y aromáticas .3º Reimpresión. Ediciones Mundi – Prensa .Barcelona – España. 2000.
34. Muñoz O, Montes M y Wilkomirsky T. Monografías. Plantas medicinales de uso en Chile. Química y Farmacia. Editorial Universia .Santiago – Chile. 2001.
35. Murray P, Rosental K, Kobayashi G, Pfaller M, Microbiología Médica. 4º Edición. Editorial Elsevier Sciencie. Barcelona – España. 2002.
36. Okamura N, Haraguchi H, Hashimoto K, Yagi A, Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves Faculty of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Fukuyama University, Hiroshima – Japan. 1994; 37(5):1463-6.
37. Rodríguez R, De la Torre C, Sánchez C., Bacteriology and treatment of acute maxillary sinusitis in children: comparative study of Erythromycin – Sulfisoxosole and ampicilin. 28th Interscience study conference on Antimicrobial agents and chemotherapy. Los Angeles California. 1988; 44:728-34.
38. Roque M, De la Cruz M, Salazar M, Resistencia a antibióticos betalactámicos de cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de dos hospitales de Essalud. Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública. 2003; 20(3)S:S 1-S37.
39. Soliman F, Fathy M, Análisis and biological activity of the essential oils of *Rosmarinus officinalis*. Advances en pharmacology. 1994; 9(1) 29 – 33 pp.
40. Schauenberg, P y F, Paris. Guía de las Plantas Medicinales. Ediciones Omega S.A. Barcelona – España. 1972;17:109-118.
41. Valencia R y Vigo H, Estudio farmacológico del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* y valoración de su actividad antimicrobiana. Tesis Lic. en Farmacia y Bioquímica. Facultad de Farmacia y Bioquímica .UNT – Trujillo – Perú. 1994..
42. Valsecia, M. Farmacología General – Farmacocinética. Edit. Orientación. España. 1999.

Fecha de recepción: 18 agosto 2014
Fecha de aceptación: 30 octubre 2014