



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA

“Eficacia de la sinergia antibacteriana in vitro del látex de *Croton lechleri* con amoxicilina
y claritromicina sobre *Helicobacter pilory*”

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

Médico Cirujano.

AUTOR:

José Luis Cruz Silva: (ORCID: 0000-0002-5874-2352)

ASESORES:

Mgtr. David René Rodríguez Díaz (ORCID: 0000-0002-9203-3576)

Mgtr. Jaime Abelardo Polo Gamboa (ORCID: 0000-0002-3768-8051)

Dra. Irma Luz Yupari Azabache (ORCID: 0000-0002-0030-0172)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Enfermedades Infecciosas y Transmisibles.

Trujillo – Perú.

2020

DEDICATORIA

A MI MADRE:

Emilia Margarita Silva Mendoza.

Póstumamente, por brindarme apoyo y amor incondicional, cultivando valores en mí para ser cada día mejor persona.

A MI ESPOSA:

Carolina Saavedra Panduro.

Por ser el motivo para continuar superándome cada día.

A MIS HERMANOS:

Cristian y Segundo.

Por entenderme y brindarme apoyo en todo momento.

A MIS HIJOS:

Christian, Lori, Terry, Luana y Jhon.

Por su paciencia, amor y apoyo incondicional en el cumplimiento de mis objetivos trazados.

José Luis Cruz Silva.

AGRADECIMIENTO

A DIOS

Por la vida y la oportunidad de cumplir con un anhelo profesional.

A MI SOCIO

Raúl Chuquisengo Saavedra por el apoyo constante en este proyecto.

A MIS ASESORES

Mgtr. David René Rodríguez Díaz, Mgtr. Jaime Abelardo Polo Gamboa y Dra. Irma Luz Yupari Azabache; por su incondicional enseñanza y paciencia en la ejecución de la presente tesis.

A MI ESPOSA E HIJOS

Por ser el motor de mi superación y estar conmigo siempre en todo momento.

José Luis Cruz Silva.

PÁGINA DEL JURADO



PÁGINA DEL JURADO

PROGRAMA ACADÉMICO DE INVESTIGACIÓN

JORNADA DE INVESTIGACIÓN N° 2

ACTA DE SUSTENTACIÓN

El Jurado encargado evaluar el trabajo de investigación, PRESENTADO EN LA MODALIDAD DE: **Desarrollo Del Proyecto de Investigación**

PRESENTADO POR DON(A):

José Luis Cruz Silva.

CUYO TITULO ES:

Eficacia de la sinergia antibacteriana in vitro del látex de *Croton lechleri* con amoxicilina y claritromicina sobre *Helicobacter pilory*

Reunido en la fecha, escucho la presentación y resolución de preguntas por el estudiante, otorgándole el calificativo de: 16. (Numero) Dieciséis (Letras).

Trujillo 13 de Marzo del 2020.

Mgtr. ROXANA ELIZABETH RAMÍREZ REYES.
PRESIDENTE DEL JURADO

Mgtr. SARA PATRICIA URQUIAGA CASÓS.
SECRETARIA DEL JURADO

Mgtr. DAVID RENE RODRÍGUEZ DÍAZ.
VOCAL DEL JURADO

NOTA: En el caso de que haya nuevas observaciones en el informe, el estudiante debe levantar las observaciones para dar el pase de la resolución.

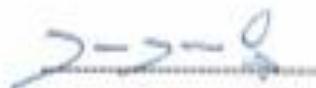
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo, **José Luis Cruz Silva**, con DNI N° 01119375, estudiante de la Escuela Profesional de Medicina de la Facultad de Ciencias Médicas, a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, declaro bajo juramento que todos los datos e información que acompañan a la Tesis titulada: "Eficacia de la sinergia antibacteriana in vitro del látex de *Croton lechleri* con amoxicilina y claritromicina sobre *Helicobacter pylori*", son de mi autoría.

- He respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas; por tanto, la tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente.
- El Proyecto de tesis no ha sido auto plagiado; es decir, no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad César Vallejo.

Trujillo, 13 de Marzo del 2020.



JOSÉ LUIS CRUZ SILVA

DNI:01119375

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: “Eficacia de la sinergia antibacteriana *in vitro* del látex de *Crotón lechleri* con amoxicilina y claritromicina sobre *Helicobacter pilory*”, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Médico Cirujano.

José Luis Cruz Silva

ÍNDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
PÁGINA DEL JURADO	iv
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD	v
PRESENTACIÓN	vi
ÍNDICE	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II.- MARCO METODOLÓGICO	7
2.1. Tipo y diseño de investigación:	7
2.2. En la Identificación de variables se plantea:	8
2.2. Operacionalización de variables:	9
2.3. Población, muestra y muestreo.	10
2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos:	11
2.5. Método de análisis de datos:	12
2.6. Aspectos éticos:	12
III. RESULTADOS	13
IV. DISCUSIÓN	17
V. CONCLUSIONES	20
VI. RECOMENDACIONES	21
REFERENCIAS	22
ANEXOS	28

RESUMEN

El presente trabajo se realizó para determinar la eficacia de la sinergia antibacteriana in vitro del látex de *Crotón lechleri* “sangre de grado” con amoxicilina y claritromicina sobre *Helicobacter pylori*. Se utilizó el diseño experimental y se evaluaron 10 repeticiones del látex de *crotón lechleri* “sangre de grado” al 100%, 50% y 25% con los antibióticos amoxicilina 25 µg y claritromicina 15 µg frente a cepas de *Helicobacter pylori* mediante el método de difusión de pozos en agar, cultivada mediante la técnica por agotamiento en superficie en un medio de cultivo agar Müeller Hinton enriquecido con 5% de sangre de cordero. Resultados: Se evidencia el efecto antibacteriano de amoxicilina + claritromicina a las 24 horas obteniendo un halo inhibitorio de 31 mm, de *Croton lechleri* al 25% y 50% + claritromicina a las 24 horas obteniendo un halo inhibitorio de 28 mm y 31 mm respectivamente. Además, la muestra de *Croton lechleri* al 25% y 50% + amoxicilina a las 24 horas obtuvo un halo inhibitorio de 30 mm y 33 mm cada uno.

El extracto de látex de *crotón lechleri* “sangre de grado” al 50%, 25% y 100% a las 24 horas también obtuvo el efecto antibacteriano con halos inhibitorios mayor de 22 mm, 14% y ≥ 90 mm correspondientemente. además, la asociación del extracto de látex de *crotón lechleri* “sangre de grado” al 100% con amoxicilina y claritromicina a las 24 horas obtuvieron efecto antibacteriano con halos de inhibición de ≥ 90 mm \pm 0.000, en la prueba estadística ANOVA (0.000) se demostró alta significancia, además en la prueba HSD Tukey se evidencio que a mayor concentración del extracto el halo inhibitorio aumenta; Conclusiones: Los extractos del látex de *crotón lechleri* “sangre de grado” con mayor efecto antibacteriano son a las que se asocia con amoxicilina y claritromicina evidenciándose halos inhibitorios de diámetros muy superiores al obtenido solo con el medicamento antibiótico.

Palabras clave: efecto antibacteriano, extracto del látex, *crotón lechleri*, *Helicobacter pylori*.

ABSTRACT

The present work was carried out to determine the efficacy of the in vitro antibacterial synergy of *Croton lechleri* "blood grade" latex with amoxicillin and clarithromycin on *Helicobacter pylori*. The experimental design was used and 10 repetitions of the 100%, 50% and 25% "blood grade" lechleri croton latex were evaluated with the antibiotics amoxicillin 25 µg and clarithromycin 15 µg against *Helicobacter pylori* strains of wells in agar, cultivated using the surface exhaustion technique in a Müller Hinton agar culture medium enriched with 5% lamb blood. Results: The antibacterial effect of amoxicillin + clarithromycin is evident at 24 hours obtaining an inhibitory halo of 31mm, of *Croton lechleri* at 25% and 50% + clarithromycin at 24 hours obtaining an inhibitory halo of 28mm and 31mm respectively. In addition, the sample of *Croton lechleri* 25% and 50% + amoxicillin at 24 hours obtained an inhibitory halo of 30 mm and 33 mm each.

The 50%, 25% and 100% "blood grade" croton lechleri latex extract at 24 hours also obtained the antibacterial effect with inhibitory halos greater than 22 mm, 14% and ≥ 90 mm correspondingly. In addition, the association of the 100% grade blood lechleri croton latex extract with amoxicillin and clarithromycin at 24 hours obtained an antibacterial effect with inhibition halos of ≥ 90 mm + 0.000, in the ANOVA statistical test (0.000). it showed high significance, also in the HSD Tukey test it was evidenced that at a higher concentration of the extract the inhibitory halo increases; Conclusions: The extracts of the croton lechleri "grade blood" latex with the greatest antibacterial effect are those associated with amoxicillin and clarithromycin, showing inhibitory halos of diameters much higher than that obtained only with the antibiotic medication.

Key words: antibacterial effect, latex extract, croton lechleri, *Helicobacter pylori*

I. INTRODUCCIÓN

Se estima que una proporción significativa de aproximadamente el 50% de los habitantes de la tierra presenta infección por *Helicobacter pylori*, dicho patógeno coloniza el epitelio gástrico-duodenal y puede provocar gastritis crónica, úlcera péptica, adenocarcinoma gástrico y linfoma de tejido linfoide asociado a la mucosa. La prevalencia sigue siendo alta en la mayoría de las naciones subdesarrolladas y generalmente está relacionada con el estado socioeconómico y los niveles de higiene. Sin embargo, las tasas de infección reportadas varían entre las diferentes regiones. La prevalencia de *H. pylori* entre las poblaciones europeas está en 20% al 40%. En los Estados Unidos de Norte América se reporta una prevalencia de la infección del 25,4% en personas de ≥ 3 años. Por otro lado, en la región del Mediterráneo Oriental, se informó una prevalencia de *H. pylori* de hasta el 80%.^{1,2}

Asimismo, la prevalencia debido a infección por *H. pylori* varía gracias a los cambios en las áreas geográficas (diferentes latitudes, temperatura y tiempo de sol diario promedio). La prevalencia general de infección por *H. pylori* está en 49,73% \pm 20,68%, entre las zonas de latitud $<30^\circ$ y $\geq 30^\circ$ (39,92% \pm 21,15% vs. 52,56% \pm 19,88%).³

En Perú, un estudio reporta que la prevalencia es de 45,5% en pacientes sintomáticos atendidos en consulta externa en Hospitales de EsSalud Lima⁴. Asimismo, dos estudios en pacientes con problemas de carcinoma gástrico, atendidos en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, reportan prevalencias de 89,6% de *H. pylori*.^{5,6}

La bacteria *Helicobacter pylori* es un bacilo gramnegativo en forma de espiral, microaerófilo, tiene una morfología característica y es un fuerte productor de ureasa. *H. pylori* crece óptimamente a un pH de 6,0–7,0 y se moriría o no crecería al pH dentro de la luz gástrica^{7,8}. Es bastante móvil, incluso en el moco, y es capaz de encontrar su camino hacia la superficie epitelial. *H. pylori* es el agente causante de las infecciones gástricas crónicas^{9,10}. La transmisión de esta bacteria se realiza de

persona a persona por vía oral-oral o fecal-oral entre los miembros de la familia.²⁰ La infección, se pueden desarrollar varias complicaciones gastroduodenales como gastritis, úlcera gástrica, úlcera duodenal, síntomas dispépticos, cáncer gástrico y linfoma de células B del tejido linfoide asociado a la mucosa gástrica (MALT).^{11,12}

El esquema terapéutico de primera línea de la infección por *H. pylori*, con las terapias triples estándar con claritromicina y amoxicilina o metronidazol durante 7 días, conducen a una tasa de erradicación de solo el 73%, en lugar del criterio de calidad requerido del 80%, sin embargo, este criterio se cumple si la duración del tratamiento se extiende a 10–14 días o si se proporciona una terapia cuádruple^{13,14}. Varios factores explican el fracaso del tratamiento: (a) los antibióticos se administran por vía oral, la capa de moco gástrico actúa como barrera y no llegan al epitelio gástrico subyacente, donde está el patógeno; (b) el estómago/duodeno contiene un rango de pH de ácido a neutro, siendo unos pocos antibióticos activos en un amplio rango de pH; (c) resistencia bacteriana a los antibióticos; (d) la falta de adhesión al tratamiento por el paciente y (e) la dieta del paciente y el estilo de vida, como fumar y la ingesta de café, también se asocian con el fracaso del tratamiento.¹⁵

Las bacterias pueden adaptarse y volverse resistentes a los antibióticos por eso es cada vez más difícil tratar muchas infecciones bacterianas, como es el caso de *H. pylori*. Se ha demostrado que tres bombas de la familia RND (hefC, hefF, hefI) están involucradas en el flujo de salida de múltiples fármacos, incluida la claritromicina. Sin embargo, el principal mecanismo de resistencia a *H. pylori* resulta de la adquisición de mutaciones puntuales¹⁶. En este contexto, se presta atención a las plantas que sintetizan una amplia gama de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos y flavonoides, que presentan actividades antibacterianas¹⁷. Las preparaciones de extractos de plantas incluyen agua, aceites esenciales o solventes orgánicos, como: etanol, metanol acetona, cloroformo, éter de petróleo, metanol/agua, etanol/agua, metanol/petróleo y extractos de metanol/diclorometano; entre otros extractos de plantas.^{18,19}

Los modos de acción de los fitoquímicos contra *H. pylori* se dan a través de su anti ureasa, anti adhesivo y propiedades anti invasivas, y al atenuar la inflamación (por ejemplo, regulando a la baja NF-κB, IL-8, IFN-γ, COX-2 e iNOS), suprimiendo la apoptosis y disminuyendo el estrés oxidativo ²⁰. El látex de *Croton lechleri*, ha sido estudiado y se ha comprobado su propiedad antibacteriana, así como, utilidad terapéutica como antiinflamatorio, anti fúngico, antioxidante, antitumoral, antiviral, cicatrizante, inmunomodulador, entre otros. La bioactividad de la savia de sangre de grado se debe al alto contenido de proantocianidinas, pero también a su contenido en taspina, catequina, epigallocatequina, epicatequina y un pequeño porcentaje de compuestos de terpeno. ^{21,22} Sin embargo, los estudios realizados indican que existe variabilidad en las concentraciones de metabolitos secundarios, entre los cuales están los alcaloides, los cuales son dependientes de factores como el lugar de hábitat y la edad de la planta. ^{23,24}.

Helicobacter pylori, como otros patógenos bacterianos, ha desarrollado fácilmente resistencia a los antibióticos. Se caracteriza por una muy alta frecuencia de mutación (10⁻⁵-10⁻⁸) que son mucho más grandes que cualquier otra bacteria. Los antibióticos como la amoxicilina, la claritromicina y el tinidazol son utilizados actualmente para el tratamiento contra este patógeno, el cual es capaz de resistir la terapia antibiótica individual. En la literatura, muchas plantas y hierbas revelaron una actividad antibacteriana significativa contra *H. pylori*. Los productos vegetales, como aceites esenciales, extractos acuosos, etanólicos, resinas, etc. han sido estudiados en diferentes países, demostrando su actividad anti-*Helicobacter pylori*. Por ello, actualmente se sigue investigando las propiedades antibacterianas contra este patógeno, de plantas nativas de diferentes regiones. ²⁵

Los estudios sobre vegetales contra *H. pylori*, son variados en todo el mundo, pero respecto al látex de *Crotón lechleri*, “sangre de grado”, se reportan más trabajos dentro de Perú que fuera. Una de las investigaciones fue realizada en Colombia (2013) por Corrales L et al. ²⁶, sobre las propiedades antibacterianas de extractos de *Crotón lechleri* contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* mediante pruebas

in vitro de difusión en agar, observando que todos los extractos fueron efectivos contra las bacterias estudiadas llegando a forma zonas de inhibición de hasta 21,5mm de diámetro.

En Perú se reportan más estudios en los cuales evaluó el efecto antibacteriano del látex de *Croton lechleri* contra diferentes bacterias; así, se tiene la investigación hecha por Chinín J. et al.²⁷ quien observó que la sangre de grado tuvo actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, formando zonas de inhibición de 13mm, 14.83mm y 15.33mm a las concentraciones de 50%, 70% y 100% respectivamente, lo cual se considera potencialmente eficaz. De forma similar los estudios de Espinoza C et al.²⁹ y Huapaya J et al.³³ comprobaron la eficacia antibacteriana del látex de *Croton lechleri* contra la misma bacteria, encontrando halos de inhibición de 29mm y 28mm de diámetro, respectivamente, por lo que consideraron a *S. aureus* como sensible a la sangre de grado.

Asimismo, Avilés I et al.²⁸ y Cayo C et al.³¹ determinaron la acción antibacteriana de *Croton lechleri* a diferentes concentraciones contra *Streptococcus mutans*, mediante el test de sensibilidad de difusión en disco de Kirby Bauer. En la primera investigación obtuvieron como resultado zonas inhibitorias de 8.20mm y 10.8mm al 75% y 100% respectivamente, mientras que en la segunda investigación el *Croton lechleri* al 100% y 75% formaron zonas de inhibición de 18mm y 11mm, respectivamente. Ambos estudios concluyeron que la sangre de grado (*Croton lechleri*) presenta efecto antibacteriano sobre *Streptococcus mutans*.

En otro estudio Fura Y.³⁰ evaluó la eficacia antibacteriana de *Croton lechleri*, al 50%, 75% y 100%, contra *Lactobacillus acidophilus*, utilizando el método de difusión en agar. Observó que al 100% de *Croton lechleri* tuvo efecto formando halos de 18.64mm de diámetro horas. La mayor parte de reportes publicados no son específicos sobre la actividad antibacteriana de la sangre de grado contra *Helicobacter pylori*, sin embargo, el trabajo de investigación que realizaron Tamariz J et al.³² fue contra *Helicobacter pylori*. Trabajaron con 41 cepas de *H. pylori* aislados de pacientes infectados y con 4 concentraciones del vegetal, observando que

la *Croton lechleri* tiene efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *H. pylori* a concentraciones elevadas, además posee acción bactericida a concentraciones superiores al 50% con halos de inhibición antibacteriana entre 12 – 18mm en diferentes magnitudes (promedio 15.56 mm), según el lugar de procedencia.

El problema que se consideró en el estudio fue: ¿Es eficaz como antibacteriano la combinación del látex de *Croton lechleri* “sangre de grado” con amoxicilina y claritromicina, sobre *Helicobacter pylori*, en estudio in vitro?

La información sobre la utilización y eficacia de las plantas medicinales en la terapéutica de muchas patologías, especialmente enfermedades infecciosas, es aún muy poca y es materia de estudio permanente en la búsqueda de nuevas alternativas contra agentes etiológicos de infecciones en humanos. Este estudio pretende demostrar que uno de los productos vegetales muy utilizados por la población peruana, el látex de *Croton lechleri* “sangre de grado”, presenta actividad antibacteriana contra *Helicobacter pylori*, una de las bacterias más difíciles de erradicar debido a su esquema de tratamiento porque se evidencia que el uso de fármacos contra los diversos patógenos está dando como respuesta la resistencia microbiana y el abandono al tratamiento.

Por lo tanto, es evidente que el uso de fármacos contra los diversos patógenos está dando como respuesta la resistencia microbiana, lo que resulta de interés en salud pública, encontrar opciones naturales a este problema; la investigación propuesta cobra relevancia por abordar y contribuir con una alternativa de solución a la problemática actual de buscar nuevas alternativas para controlar y combatir a *Helicobacter pylori*, ya que aportará conocimientos para que realicen más investigaciones sobre su eficacia sinérgica antibacteriana del látex de *Croton lechleri* con amoxicilina y claritromicina, pues tendría relevancia social y científica en un mediano plazo.

Para ello se planteó como objetivo general: Evaluar la sinergia antibacteriana del látex de *Croton lechleri* con amoxicilina y claritromicina sobre *Helicobacter pylori* en estudio *in vitro*, y como objetivos específicos se planteó lo siguiente: a) Identificar el efecto antibacteriano del látex de *Croton lechleri* “Sangre de grado” sobre *Helicobacter pylori* al 100%, 50% y 25%, b) Identificar el efecto antibacteriano del látex de *Croton lechleri* “Sangre de grado” al 100%, 50% y 25% + amoxicilina 25µg sobre *Helicobacter pylori*, c) Identificar el efecto antibacteriano del látex de *Croton lechleri* “Sangre de grado” al 100%, 50% y 25% + claritromicina 15µg sobre *Helicobacter pylori*, d) Establecer la eficacia antibacteriana de la combinación del látex de *Croton lechleri* “sangre de grado” al 100%, 50% y 25% con amoxicilina 25µg + claritromicina 15µg, sobre *Helicobacter pylori*, e) Establecer la eficacia antibacteriana de la combinación de amoxicilina 25µg + claritromicina 15µg, sobre *Helicobacter pylori*, f) Determinar el efecto antibacteriano del Dimetil sulfóxido (DMSO) sobre *Helicobacter pylori*.

Para dar respuesta al problema, se propuso dos hipótesis: H1: La combinación del látex de *Croton lechleri* “Sangre de grado” con amoxicilina y claritromicina es eficaz como antibacteriano sobre *Helicobacter pylori*, en estudio *In vitro*; y H0: La combinación del látex de *Croton lechleri* “Sangre de grado” con amoxicilina y claritromicina no es eficaz como antibacteriano sobre *Helicobacter pylori*, en estudio *in vitro*.

II.- MARCO METODOLÓGICO

2.1. Tipo y diseño de investigación:

Tipo de estudio: la presente tesis presenta un corte básico. ^{34, 39.}

Tamaño de la muestra

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2\sigma^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

Dónde:

- $Z_{\alpha/2} = 1,96$ Para un nivel de confianza del 95%
- $Z_{\beta} = 0,84$ para una potencia de prueba del 80%
- $\bar{X}_1 = 21$ (37)
- $\bar{X}_2 = 18,64$ (11)
- $\sigma^2 = 1,46$ (11)

$n = 6$ repeticiones se aumentarán a 10 observaciones.

Diseño de investigación:

Experimental, con post prueba y repeticiones múltiples. ^{34,39.}

Se considerará el esquema siguiente:

RG ₁	X ₁	O ₁
RG ₂	X ₂	O ₂
RG ₃	X ₃	O ₃
RG ₄	X ₄	O ₄
RG ₅	X ₅	O ₅
RG ₆	X ₆	O ₆

En donde:

RG₁₋₆: Grupos de cepas de *Helicobacter pylori*.

X₁: *Croton lechleri* según concentraciones.

X₂: *Croton lechleri* según concentraciones + Amoxicilina 25µg.

X₃: *Croton lechleri* según concentraciones + Claritromicina 15µg.

X₄: *Croton lechleri* según concentraciones + amoxicilina 25 µg + Claritromicina 15 µg.

X₅: Claritromicina 15µg + amoxicilina 25µg (control positivo).

X₆: DMSO – Dimetil Sulfoxido (control negativo)

O₁₋₆: Efecto antibacteriano (halo de inhibición).

2.2. En la Identificación de variables se plantea:

Variable Independiente: Agente antibacteriano.

Agente no farmacológico: *Croton lechleri*

Agente farmacológico: Claritromicina + amoxicilina

Variable Dependiente: Efecto antibacteriano

Eficaz: zona de inhibición ≥ 21 mm.

No eficaz: zona de inhibición < 21 mm.

2.2. Operacionalización de variables:

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA DE MEDICIÓN
V. I: Agente antibacteriano	Sustancia con cualidades capaces de suprimir o inhibir el desarrollo de bacterias sin dañar al cuerpo que los transporta. ^{15,32}	Se utilizó Dimetil sulfóxido como solvente para obtener las siguientes concentraciones: - <i>Croton lechleri</i> al 25%, 50% y 100%. - <i>Croton lechleri</i> al 25%, 50% y 100% + amoxicilina 25 µg. - <i>Croton lechleri</i> al 25%, 50% y 100% + claritromicina 15 µg. - <i>Croton lechleri</i> al 25, 50 y 100% + claritromicina 15µg + amoxicilina 25µg. - Claritromicina 15µg + amoxicilina 25µg. - DMSO.	1 2 3 4 5 6	Cualitativa nominal
	Claritromicina: macrólido activo frente a bacterias, ejerciendo inhibición de la síntesis proteica de la bacteria mediante la unión a las subunidades 50s del ribosoma. Amoxicilina: amino penicilina que ejerce acción contra un amplio espectro de bacterias impidiendo la formación de su pared celular.			
V. D: Efecto antibacteriano	Mecanismos de acción letal de compuestos químicos en cepas bacterianas, suprimiéndolas (bactericida) o inhibiéndoselas (bacteriostático). ¹³	Se midió mediante la prueba de difusión en agar según Kirby-Bauer, considerando los criterios del Estándar M45 del CLSI. Sensible ≥ 21 mm Resistente < 21 mm	Eficaz: ≥ 21 mm No eficaz: < 21 mm	Cualitativa nominal

2.3. Población, muestra y muestreo.

Población: estuvo conformada por todas las cepas de *Helicobacter pylori*, cultivados en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad César Vallejo.

Muestra: El tamaño de la muestra se estimó considerando la fórmula estadística para comparación de dos medias, de acuerdo a la fórmula siguiente:^{35,38}

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2\sigma^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

Dónde:

- $Z_{\alpha/2} = 1,96$ Para un nivel de confianza del 95%
- $Z_{\beta} = 0,84$ para una potencia de prueba del 80%
- $\bar{X}_1 = 21$ (37)
- $\bar{X}_2 = 18,64$ (11)
- $\sigma^2 = 1,46$ (11)

$n = 6$ repeticiones se aumentarán a 10 observaciones.

Unidad de análisis: se consideró a cada uno de los cultivos de *Helicobacter pylori* tratado con látex de *Croton lechleri*, claritromicina y amoxicilina,

Unidad de muestreo: se consideró a cada placa Petri conteniendo los grupos de cultivos.

Muestreo: Se realizó un muestreo no probabilístico, por conveniencia.^{34.}

Criterios de selección:

Criterios de inclusión: cultivos de *Helicobacter pylori* con crecimiento no mayor de 24 horas de sembrado.

Criterios de exclusión: cultivos de *Helicobacter pylori* contaminados.

2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos:

Técnica: Se utilizó la observación y medición de los halos de inhibición, que resultó de la exposición de *Helicobacter pylori* al agente antibacteriano.

N° Repet.	Diámetro de la Zona de Inhibición (mm)									
	LCL- 50%	LCL- 50% + AMX	LCL- 50% + CLA	LCL- 50% + AMX + CLA	LCL- 25%	LCL- 25% + AMX	LCL- 25% + CLA	LCL- 25% + AMX + CLA	AMX + CLA	DMSO
1	20	33	28	32	12	30	26	31	28	0
2	22	33	30	35	10	30	28	32	31	0
3	21	33	31	34	13	29	28	30	31	0
4	20	31	31	36	12	29	26	30	30	0
5	20	32	29	36	12	27	27	30	28	0
6	20	33	30	34	12	30	26	31	28	0
7	21	31	30	35	14	29	26	28	27	0
8	20	33	30	36	12	29	26	30	27	0
9	18	32	29	36	13	28	27	30	27	0
10	21	32	30	35	13	29	26	31	27	0

LCL: Látex de *Croton lechleri*

CLA: Claritromicina

AMX: Amoxicilina

DMSO: Dimetil Sulfoxido.

Procedimiento:

Se realizó el desarrollo de esta investigación de acuerdo a lo siguiente:

- Se hizo la identificación taxonómica de *Croton lechleri* en el Herbario de la Universidad Nacional de Trujillo. (Anexo 2).
- El látex de *Croton lechleri* se adquirió de una empresa industrial de productos naturales, la cual garantiza y certifica la autenticidad y pureza de este producto vegetal. (Anexo 3)

- Se cultivó la cepa de *Helicobacter pylori* en medio de cultivo de agar Mueller-Hinton, el cual fue enriquecido con 5% de sangre de cordero desfibrilada, tomando en cuenta las recomendaciones establecidas en el estándar M02 A12 del CLSI. ³⁶ (Anexo 4)
- Se evaluó el efecto sinérgico antibacteriano del látex de *Croton lechleri* con amoxicilina y claritromicina, a través del método de difusión con pozos en agar, modificado de Kirby-Bauer. ³⁷ (Anexo 4)
- Validación y confiabilidad: El instrumento fue validado por criterio de tres profesionales (biólogos y dos médicos) quienes evaluaron si la información a recolectarse era la suficiente y adecuada para alcanzar los objetivos del presente estudio. ³⁹.

2.5. Método de análisis de datos:

Una vez recolectada la información de los halos de inhibición en las fichas de recolección de datos, se trasladó a una base de datos en el programa Microsoft Excel de manera ordenada y detallada según los agentes antibacterianos.

Al tener la base completa se utilizó el paquete spss para hacer el análisis estadístico respectivo. En primer lugar, se analizó la normalidad, homogeneidad de varianzas y los estadísticos descriptivos (media aritmética, desviación estándar, intervalos de confianza), para luego proceder al análisis de varianza (ANOVA), el cual nos indicó que si existen diferencias significativas entre los halos de inhibición en los grupos analizados. Luego de ello con la ayuda de la prueba estadística Tukey (Post hoc), se identificó cuál de los grupos analizados tenía mayor efectividad y además se realizó el diagrama cajas donde pudimos apreciar el comportamiento de los halos de inhibición promedio comprobando el grupo con mayor efectividad. ³⁸.

2.6. Aspectos éticos:

Se tomó en cuenta la protección de las personas y el medio ambiente, en relación al manejo y eliminación de material biológico infectante; de acuerdo a lo estipulado en el “Manual de Bioseguridad en el Laboratorio” acordado por la OMS. ⁴⁰.

III. RESULTADOS

Tabla 1. Efecto antibacteriano del látex de *Croton lechleri* al 100%, 50% y 25%, solo y en sinergia con amoxicilina y claritromicina, sobre *Helicobacter pylori*.

Grupos de trabajo	N	Halos de inhibición (mm)				
		Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
LCL 100%	10	> 90,00	1,000	0,000	> 90,00	> 90,00
LCL 100% + AMX	10	> 90,00	1,000	0,000	> 90,00	> 90,00
LCL 100% + CLA	10	> 90,00	1,000	0,000	> 90,00	> 90,00
LCL 100% + AMX + CLA	10	> 90,00	1,000	0,000	> 90,00	> 90,00
LCL 50%	10	20,30	1,059	0,335	19,54	21,06
LCL 50% + AMX	10	32,30	0,823	0,260	31,71	32,89
LCL 50% + CLA	10	29,80	0,919	0,291	29,14	30,46
LCL 50% + AMX + CLA	10	34,90	1,287	0,407	33,98	35,82
LCL 25%	10	12,30	1,059	0,335	11,54	13,06
LCL 25% + AMX	10	29,00	0,943	0,298	28,33	29,67
LCL 25% + CLA	10	26,60	0,843	0,267	26,00	27,20
LCL 25% + AMX + CLA	10	30,30	1,059	0,335	29,54	31,06
AMX + CLA	10	28,40	1,647	0,521	27,22	29,58
DMSO	10	0,00	0,000	0,000	0,00	0,00
Total	140	24,39*	10,284*	1,028*	22,35*	26,43*

* Se considera solamente a los grupos con látex de *Croton lechleri* al 50% y 25%, excluyéndose los grupos con concentración al 100%

Fuente: Ficha de recolección de datos.

Tabla 2. Análisis de varianza de promedios de los diámetros de las zonas de inhibición producidas por los agentes antibacterianos contra *Helicobacter pylori*.

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	8151,933	5	1630,387	451,955	0,000
Dentro de grupos	194,800	54	3,607		
Total	8346,733	59			

Fuente: Ficha de recolección de datos

Tabla 3. Prueba HSD Tukey para la comparación del efecto antibacteriano del látex de *Croton lechleri* al 100%, 50% y 25% combinadas con amoxicilina y claritromicina.

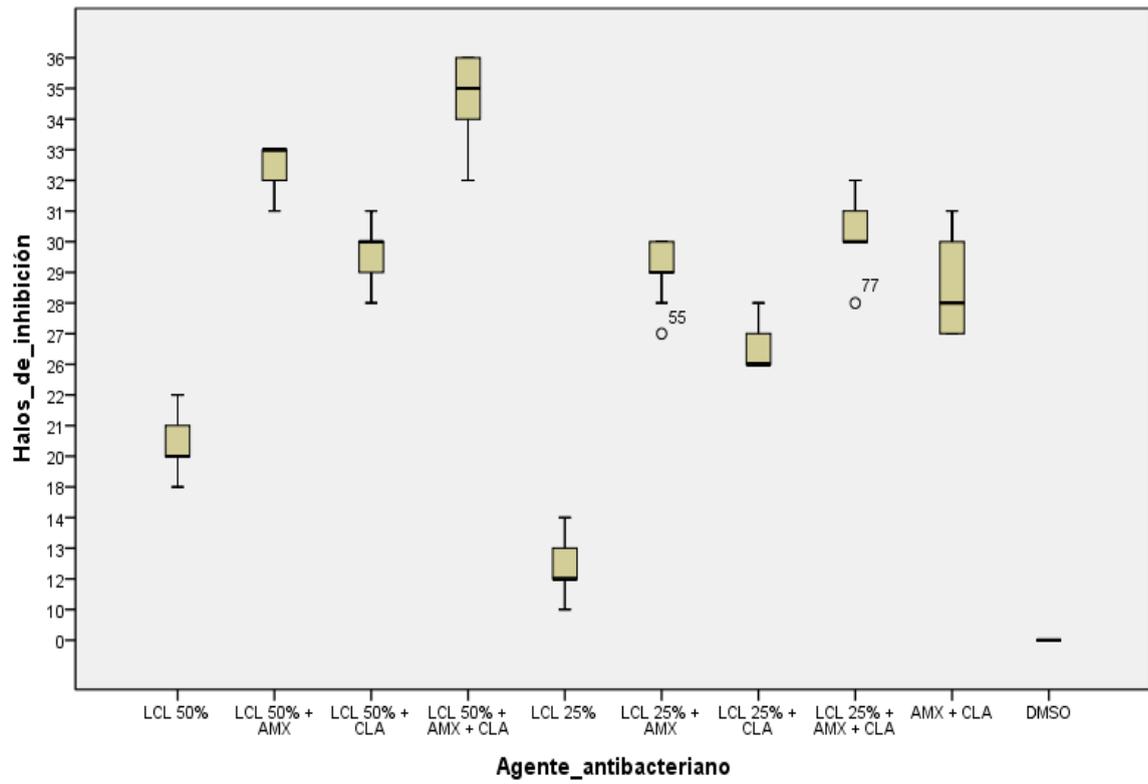
Agente antibacteriano	N	Halos de inhibición (mm)							
		Subconjunto para alfa = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
DMSO	10	0,00							
LCL 25%	10		12,30						
LCL 50%	10			20,30					
LCL 25% + CLA	10				26,60				
AMX + CLA	10					28,40			
LCL 25% + AMX	10						29,00	29,00	
LCL 50% + CLA	10						29,80	29,80	
LCL 25% + AMX + CLA	10							30,30	
LCL 50% + AMX	10								32,30
LCL 50% + AMX + CLA	10								34,90
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	,094	,156	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.

Fuente: Ficha de recolección de datos.

Nos muestra que el grupo LCL 50% + AMX + CLA es el que tiene mayor promedio.



Fuente: Ficha de recolección de datos.

Gráfico 1. Actividad antibacteriana de 2 diferentes concentraciones de *Croton lechleri* combinadas con Amoxicilina y Claritromicina contra *Helicobacter pylori*.

IV. DISCUSIÓN

Se realizó este estudio con la finalidad de determinar si los antibióticos de referencia que se utilizan para el tratamiento de infecciones por *Helicobacter pylori* (amoxicilina + claritromicina) realizan sinergia antibacteriana con la sustancia denominada “sangre de grado”, para inhibir el crecimiento de esta bacteria. Para ello, se propuso como objetivo evaluar la sinergia antibacteriana del látex de *Croton lechleri* “sangre de grado” con amoxicilina y claritromicina sobre *Helicobacter pylori*, en estudio in vitro.

En la Tabla 1, se observa los promedios de los diámetros de las zonas de inhibición del crecimiento de *Helicobacter pylori*, que se generó como consecuencia de la actividad de los compuestos y combinaciones evaluadas. Se encontró que la sangre de grado al 100% asociados con la amoxicilina y claritromicina inhibió a la bacteria formando zonas de inhibición que alcanzaron tamaños no medibles en la placa Petri, por ello se expresó como >90mm que es el diámetro de la placa petri. La inhibición con el látex de *Croton lechleri* al 50% formó zonas de 20.3 mm (DE=1.059±0.335 [IC 95%=19.54-21.06]). Sin embargo, se observó que el mayor efecto antibacteriano lo tuvo la sinergia entre sangre de grado + amoxicilina + claritromicina, 34.9 mm (DE=1.287±0.407 [IC 95%=33.98-35.82]).

Estos resultados son diferentes a los encontrados por Tamariz J et al.³² quienes indican que la sangre de grado sólo tiene efecto antibacteriano contra *Helicobacter pylori* a concentraciones mayor a 50%, y observaron al 100 % zonas de inhibición de 15.56 mm en promedio; sin embargo, se puede comprobar en la presente investigación (Tabla 1) que la combinación del látex de *Croton lechleri* al 50 % obtuvo una zona de inhibición de 32.3 mm. Así mismo, la sangre de grado evaluada al 25% ya tuvo efecto antibacteriano de 12.3 mm, e inclusive al 100 % consiguió mucho mayor efecto (> 90 mm de diámetro), excluyéndosele a dicha combinación en el presente estudio por la sugestiva actividad citotóxica en el epitelio del estómago.

La acción bactericida de la sangre de grado es conocida y ha sido demostrada en varias investigaciones y contra diversas bacterias gram negativas y gram positivas. La actividad antimicrobiana de *C. lechleri* frente a *H. pylori* se debe a metabolitos secundarios, tales como fenoles, terpenoides, alcaloides, leptinas, polipéptidos, ácido clorequínico, las coberinas A y B, el 1,3,5-trimetoxibenceno y el 2,4,6-trimetoxifenol, entre otros fitoquímicos. Los diversos componentes que presenta la sangre de grado, como alcaloides, polifenoles, taninos, ácidos fenólicos, estilbenos, flavonoles, antocianinas, catequinas y proantocianidinas, le confieren propiedades antibacterianas que desestabilizan a las células bacterianas.³⁹

La actividad antibacteriana mostrada en la Figura 1, indica que el látex de *C. lechleri* repotencia a los antibióticos amoxicilina y claritromicina, pero la sangre de grado por sí sola tiene menor efecto contra *Helicobacter pylori*. También, la sinergia antibacteriana es mayor cuando están combinados los 2 antibióticos más la sangre de grado, respecto a la combinación convencional de la amoxicilina + claritromicina.

En la Tabla 2 se observa el análisis de varianza que presentan los grupos, en donde indica que si existe diferencia estadísticamente significativa ($p=0.000$) en por lo menos dos promedios de los grupos evaluados. Por ello se realizó una prueba pos hoc para evidenciar qué grupos son los que tienen diferencias entre sí. La actividad antibacteriana de la sangre de grado que ejerce sobre las diferentes bacterias es diferente entre uno y otro estudio, se observa que Corrales L. et al.²⁶, Chininin et al.²⁷, Espinoza C et al.²⁹ y Huapaya J et al.³³, tienen diferencias entre sus resultados.

Las diferencias en los efectos antibacterianos de *Croton lechleri*, se debe a varios factores, pero principalmente a los tipos de componentes fitoquímicos de la sangre de grado y en qué cantidades se encuentran. Otros componentes son la edad del árbol, la ubicación geográfica y el clima donde se ha desarrollado el árbol, así como el tipo de suelo donde fue cultivado, la estación, etc.²³

En la Tabla 3 se muestra la Prueba HSD Tukey en la cual se comprobó la homogeneidad de los promedios de los diámetros de las zonas de inhibición, para establecer si los grupos evaluados presentan diferencias entre sí, en su efecto antibacteriano. Allí se indica que, las zonas de inhibición que produjeron los agentes evaluados, no son homogéneos, pero existen dos subconjuntos que no tienen diferencias significativas; el subconjunto formado por amoxicilina + claritromicina, sangre de grado 25% + amoxicilina, y sangre de grado 50% + claritromicina.

Por todo lo antes expuesto, en la presente investigación se observa que los antibióticos de referencia (amoxicilina y claritromicina) utilizados en la terapia convencional contra *Helicobacter pylori*, son potenciados por la sangre de grado, la sinergia entre la combinación látex de *Croton lechleri* al 50 % + amoxicilina + claritromicina forman zonas de inhibición superiores a la sinergia de los antibióticos mencionados.

V. CONCLUSIONES

El látex de *Croton lechleri* al 100%, 50% y 25% presentan propiedades antibacterianas contra *Helicobacter pylori*, por lo que complementado a estudios anteriores quienes comprobaron actividad de cicatrización de la "sangre de grado" se afirma que existen cualidades terapéuticas en infección por *Helicobacter pilory*.

La acción terapéutica del *Croton lechleri* está vinculada a su actividad en cicatrización dada en la Taspina clorhidrato.³²

La amoxicilina y claritromicina asociados al látex de *Croton lechleri* al 100% ó 50% ó 25% presentan efecto sinérgico antibacteriano sobre *Helicobacter pylori*, a nivel de laboratorio. Este poder de cicatrización de la sangre de grado se vería complementada con la acción antibacteriana en combinación con los antibióticos antes mencionados, lo cual conllevaría a la exterminación del *Helicobacter pylori*, y mejora en el tejido gástrico causado por dicha bacteria.

La amoxicilina asociada a claritromicina presentan efecto sinérgico antibacteriano sobre *Helicobacter pylori*, que cumplen con los parámetros establecidos por el CLSI.

El DMSO es un compuesto que no ejerce actividad antibacteriana sobre *Helicobacter pylori*.

El presente estudio permitiría acrecentar y estandarizar la terapéutica contra el *Helicobacter pilory*, fundamentándose en el conocimiento científico.

VI. RECOMENDACIONES

Se sugiere sopesar la utilización del látex de *Croton lechleri* como producto natural en la terapia contra el *Helicobacter pilory*, pues existe aceptación en gran parte de la población y a los escasos efectos adversos de su efecto terapéutico.

Se sugiere concretar investigaciones en las cuales se combine el látex de *Croton lechleri* con otros antibióticos para establecer nuevos agentes que sirvan para el control o terapia contra *Helicobacter pylori*.

Se recomienda realizar estudios de eficacia antibacteriana y anti fúngica con el látex de *Croton lechleri* contra otros patógenos.

Se recomienda hacer estudios del látex de *Croton lechleri* que se expenden en nuestro medio, para conocer sus componentes fitoquímicos y sus propiedades antibacterianas según procedencia.

REFERENCIAS

1. Hooi J., Ying W., Khoo W., Suen M., Underwood F., Tanyingoh D. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology*; 2017. [Sitio en internet]. Disponible en: [https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085\(17\)35531-2/pdf](https://www.gastrojournal.org/article/S0016-5085(17)35531-2/pdf)
2. Zamani M., Ebrahimtabar F., Zamani V., Miller W., Alizadeh R., Shokri J., Derakhshan M. Systematic review with meta-analysis: The worldwide prevalence of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther*; 2018. [Sitio en internet]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/apt.14561>
3. Castillo O., Maguiña J., Benites H., Chacaltana A., Guzmán E., Dávalos M., Frisancho O. Prevalencia de *Helicobacter pylori* en pacientes sintomáticos de consulta externa de la Red Rebagliati (EsSalud), 2010 – 2013. *Rev Gastroenterol Peru*. Lima, Perú; 2016. [Sitio de internet]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rgp/v36n1/a07v36n1.pdf>
4. Custodio D. Prevalencia de la infección de la bacteria *Helicobacter pylori* en pacientes diagnosticados con adenocarcinoma gástrico en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas (INEN). Lima, Perú: Universidad Ricardo Palma; 2017. [Sitio en internet]. Disponible en: http://repositorio.urp.edu.pe/bitstream/handle/urp/1003/Custodio_d.pdf?
5. Gonzáles Z. Estimación de la prevalencia de *Helicobacter pylori* como agente carcinógeno en pacientes con cáncer gástrico diagnosticados en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas, Perú 2015-2016. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018. [Sitio en internet]. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/8655/Gonzales_nz.pdf?
6. Lu C., Yu Y., Li L., Yu C., Xu P. Systematic review of the relationship of *Helicobacter pylori* infection with geographical latitude, average annual temperature and average daily sunshine. *BMC Gastroenterol*; 2018 [Sitio en internet]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5905136/pdf/12876_2018_Article_779.pdf.

7. Carroll K., Morse S., Mietzner T., Miller S., Jawetz M. Medical Microbiology. 27th ed. New York: McGraw-Hill Education LANGE; 2016.
8. Murray P., Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Inc.; 2016.
9. Mandell G., Bennett J., Dolin R. Enfermedades Infecciosas. Principios y Práctica. 8va ed. Barcelona: Elsevier España, S.L.; 2016.
10. Ray K., Ray C., Ahmad M., Drew W., Lagunoff M., Pottinger P., Reller L., Sterling C. Sherrys Medical Microbiology. 6th ed. New York: McGraw-Hill Education LANGE; 2014.
11. Ansari S., Yamaoka Y. Current understanding and management of Helicobacter pylori infection: an updated appraisal; 2018. [Sitio en internet]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5998008/pdf/f1000research-7-15391.pdf>
12. Gravina A., Zagari R., De Musis C., Romano L., Loguercio C., Romano M. Helicobacter pylori and extragastric diseases: A review. World J Gastroenterol; 2018. [Sitio en internet]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6079286/pdf/WJG-24-3204.pdf>.
13. Fischbach W., Malfertheiner P. Helicobacter pylori Infection. Dtsch Arztebl Int; 2018. [Sitio en internet]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6056709/pdf/Dtsch_Arztebl_Int-115_0429.pdf.
14. Bolai P., Senthil A., Mohd J., Jafrin J. Current Status of H. pylori Infection Treatment 2017. J App Pharm Sc; 2017. [Sitio en internet]. Disponible en: https://www.japsonline.com/admin/php/uploads/2461_pdf.pdf

15. Parreira P., Duarte F., Reis C., Martins M.. Helicobacter pylori infection: A brief overview on alternative natural treatments to conventional therapy. Crit Rev Microbiol; 2016. [Sitio en internet]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/260643451_Helicobacter_pylori_infection_A_brief_overview_on_alternative_natural_treatments_to_conventional_therapy
16. Vianna J. , Ramis I., Ramos D., Von Groll A., Da Silva P. Drug resistance in Helicobacter pylori. Arq Gastroenterol; 2016. [Sitio en internet]. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/ag/v53n4/1678-4219-ag-53-04-00215.pdf>
17. Safavi M., Shams-Ardakani M., Foroumadi A. Medicinal plants in the treatment of Helicobacter pylori infections. Pharm Biol; 2015 [Sitio en internet]. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/13880209.2014.952837#aHR0cHM6Ly93d3cudGFuZGZvbmxpbmUuY29tL2RvaS9wZGYvMTAuMzEwOS8xMzg4MDIwO S4yMDE0Ljk1MjgzNz9uZWVkaWVjZm9udXNzPXRydWVAQEAw>.
18. Salehi B., Sharopov F., Martorell M., Rajkovic J., Rajkovic A., Sharifi-Rad M et al. Phytochemicals in Helicobacter pylori Infections: What are we doing now? Int J Mol Sci; 2018. [Sitio en internet]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6121492/pdf/ijms-19-02361.pdf>
19. Abdallah E. Medicinal Plants with Antibacterial Properties Against Helicobacter pylori: A Brief Review. Current Trends in Nutraceuticals; 2016. [Sitio en internet]. Disponible en: <http://nutraceuticals.imedpub.com/medicinal-plants-with-antibacterial-properties-against-helicobacter-pylori-abrief-review.pdf>.
20. Liu Q., Meng X., Li Y., Zhao C., Tang G., Li S., Gan R., Li H. Natural Products for the Prevention and Management of Helicobacter pylori Infection. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety; 2018. [Sitio en internet]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/1541-4337.12355>

21. Escobar J., Prieto C., Pardo M., Lagaron J. Dragon's Blood Sap: Storage Stability and Antioxidant Activity. *Molecules*; 2018. [Sitio en internet]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6222551/pdf/molecules-23-02641.pdf>.
22. Jura-Morawiec J., Tulik M. Dragon's blood secretion and its ecological significance. *Chemoecology*; 2016. [Sitio en internet]. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4863904/pdf/49_2016_Article_212.pdf.
23. Cevallos D., Jaramillo C., Cuesta O., Zaldua J., García G., Rojas L. Composición química, actividad cicatrizante y toxicidad del látex de *Croton lechleri*. *Revista Científica FCV-LUZ*; 2016. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=95945988006>
24. Lopes T., Rodrigues S., De Vargas S., De Oliveira M. Dragon's blood (*Croton lechleri* Mull., Arg.): an update on the chemical composition and medical applications of this natural plant extract. A review. *Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal*; 2013. [Sitio en internet]. Disponible en: <http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/download/79/2092>.
25. Abdallah E. Medicinal Plants with Antibacterial Properties Against *Helicobacter pylori*: A Brief Review. *Journal of Nutraceuticals and Food Science*; 2016. [Sitio en Internet]. Disponible en: <http://nutraceuticals.imedpub.com/medicinal-plants-with-antibacterial-properties-against-helicobacter-pylori-abrief-review.pdf>.
26. Corrales L., Castillo A., Melo A. Evaluación del potencial antibacterial in vitro de *Croton lechleri* frente a aislamientos bacterianos de pacientes con úlceras cutáneas. *NOVA*; 2013. [Sitio en internet]. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v11n19/v11n19a05.pdf>.

27. Chinín J., Cisneros C. Evaluación del efecto antibacteriano in vitro del látex de Croton lechleri “sangre de grado” frente a Staphylococcus aureus atcc 25923. Conocimiento para el Desarrollo; 2018. [Sitio en internet]. Disponible en: <https://revista.usanpedro.edu.pe/index.php/CPD/article/view/302/290>
28. Avilés I., Dona M., Cabezas C., Quisiguiña C. Actividad antibacteriana in vitro de Croton lechleri sobre Streptococcus mutans. Odontol. Sanmarquina; 2018. [Sitio en internet]. Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/odont>
29. Espinoza C., Serna Z. Efecto antibacteriano in vitro del látex de Croton lechleri Müll. Arg. (sangre de grado) frente a Staphylococcus aureus. Lima, Perú: Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2018. [Sitio en internet]. Disponible en: <http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/2985/Tesis%20SERNA%20QUISPE%20-%20ESPINOZA%20%20RIVERA.pdf?sequence=3&isAllowed=y>.
30. Fura Y. Efecto antibacteriano in vitro del Croton lechleri (sangre de grado) y gluconato de clorhexidina al 0.12% sobre Lactobacillus acidophilus. Arequipa, Arequipa: Universidad Alas Peruanas; 2017. [Sitio en internet]. Disponible en: http://repositorio.uap.edu.pe/bitstream/uap/6096/11/T059_47485912_T.pdf
31. Cayo C., Barrera R. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del Croton lechleri sobre cultivos de Streptococcus mutans (ATCC 25175). Ciencia y Desarrollo; 2014. [Sitio en internet] Disponible en: <http://revistas.uap.edu.pe/ojs/index.php/CYD/article/view/1097/1075>
32. Tamariz J., Capcha R., Palomino E., Aguilar J. Actividad antibacteriana de la Sangre de Grado (Croton lechleri) frente al Helicobacter pylori. Rev Med Hered; 2003. [Sitio en internet]. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rmh/v14n2/v14n2ao6.pdf>
33. Huapaya J., Flórez M., Larrea H. Control microbiológico y evaluación de la actividad antibacteriana in Vitro de croton lechleri “Sangre de grado”. Horiz. Méd; 2003. [Sitio en internet]. Disponible en: https://medicina.usmp.edu.pe/medicina/horizonte/2003/Art2_Vol3_N1-2.pdf

34. Hernández R., Fernández C., Baptista M. Metodología de la Investigación. 6ta ed. México D.F.: McGraw-Hill / Interamericana Editores S.A. de C.V.; 2014.
35. Wayne D., Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ta ed. Bs. As. Argentina: Editorial Limusa – Wiley; 2012.
36. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Twelfth Edition. CLSI document M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
37. Bagul U., Sivakumar S. Antibiotic Susceptibility Testing: A review on current practices. Int J Pharm; 2016. [Sitio en internet]. Disponible en: http://www.pharmascholars.com/articles_pdfs/issues/2124638525_060302-1657.pdf?title=Antibiotic%20susceptibility%20testing:%20a%20review%20on%20current%20practices.
38. Goswami A. Utilization of Parametric and Non-Parametric Statistical Test in Clinical Trials. International Journal of Science and Research; 2016. [Sitio en internet]. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/a84f/464054f7172c1131e5a9c29fde49a62dcc72.pdf>
39. Gupta D., Bleakley B., Gupta R. Dragon's blood: botany, chemistry and therapeutic uses. J Ethnopharmacol; 2008. [Sitio en internet]. Disponible en: https://www.smgrowers.com/info/dragonsblood_tree_botanyetc.pdf
40. OMS. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3ra. Edición. Ginebra: Ediciones de la OMS; 2005. [Sitio en internet]. Disponible en: http://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf.

ANEXOS

ANEXO 1: BASE DE DATOS DE LOS RESULTADOS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN

N° Repet	Diámetro de la Zona de Inhibición (mm)									
	LCL-50%	LCL-50% + AMX	LCL-50% + CLA	LCL-50% + AMX + CLA	LCL-25%	LCL-25% + AMX	LCL-25% + CLA	LCL-25% + AMX + CLA	AMX + CLA	DMSO
1	20	33	28	32	12	30	26	31	28	0
2	22	33	30	35	10	30	28	32	31	0
3	21	33	31	34	13	29	28	30	31	0
4	20	31	31	36	12	29	26	30	30	0
5	20	32	29	36	12	27	27	30	28	0
6	20	33	30	34	12	30	26	31	28	0
7	21	31	30	35	14	29	26	28	27	0
8	20	33	30	36	12	29	26	30	27	0
9	18	32	29	36	13	28	27	30	27	0
10	21	32	30	35	13	29	26	31	27	0

LCL: Látex de *Croton lechleri*

CLA: Claritromicina

AMX: Amoxicilina

DMSO: Dimetil Sulfoxido.

ANEXO 2

Identificación taxonómica de *Croton lechleri* por el Herbario de la Universidad Nacional de Trujillo.



HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT)
Universidad Nacional de Trujillo
Nº. 60462
TRUJILLO - PERU



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
HERBARIUM TRUXILLENSE (HUT)
FLORA PERUANA



Familia: Euphorbiaceae

Nombre Científico: *Croton lechleri* Mull. Arg.

N. Vulgar: "sangre de grado"

Det. Por: Herbario HUT

Hábito: Arbol de ca. 12 m de alto, látex rojo, frutos verdosos

Procedencia: distrito Tarapoto, alrededores de Tarapoto

Prov.: San Martín

Región: San Martín

Hábitat: bosque primario

Altitud: 350 m. s. n. m.

Colector: José Luis, Cruz Silva

Fecha: 10/02/2020

Nº: s. n.

Tesis de la Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Medicina Humana, Universidad Cesar Vallejo, Trujillo, Perú.

Tesis: "Eficacia de la sinergia antibacteriana in vitro del látex de *Croton lechleri* con amoxicilina y claritromicina sobre *Helicobacter pylori*"

ANEXO 3

El látex de *Croton lechleri* se adquirió de una empresa industrial de productos naturales, la cual garantiza y certifica la autenticidad y pureza de este producto vegetal.



ANEXO 4

EVALUACIÓN DE LA SUSCEPTIBILIDAD BACTERIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN CON POZOS EN AGAR.

Preparación de las cepas de *H. pylori* y cultivo

Se reactivó las cepas de *Helicobacter pylori*, sembrando en agar Müeller Hinton enriquecido con 5% de sangre de cordero, y se incubó en la estufa a 37°C por 24 horas. Para la prueba de susceptibilidad, se preparó agar Müeller Hinton, suficiente para 10 placas Petri (200 ml aprox.) y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, se adicionó 5% de sangre de cordero y se sirvió 18-20 ml por cada placa Petri estériles de plástico desechables de 90x15mm, se dejó en reposo hasta que solidifique completamente.

Método de difusión con discos en agar

a) Preparación del inóculo

El inóculo se preparó colocando 2-3 ml de suero fisiológico en un tubo de ensayo estéril, al cual se le adicionó una alícuota del microorganismo *Helicobacter pylori*, cultivado hace 48 horas, de tal modo que se observó una turbidez equivalente al tubo 2 de la escala de McFarland (6×10^8 UFC/ml aprox.)

b) Siembra del microorganismo

Se sembró el microorganismo *Helicobacter pylori*, embebiendo un hisopo estéril en el inóculo y deslizándolo sobre toda la superficie del medio de cultivo en las Placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedó como una capa en toda la superficie.



c) Preparación de los discos de sensibilidad con sangre de grado y antibióticos.



En una placa Petri estéril, se colocó 10 discos de papel filtro Whatman N° 1 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Se repitió esta acción 3 veces más para formar 6 grupos de discos. Al primer grupo de discos, a cada uno, se agregó 5 μ L de látex de *Croton lechleri*, al segundo grupo se agregó 5 μ L de látex de *Croton lechleri* + 25 μ g de amoxicilina, al tercer grupo se agregó 5 μ L de látex de *Croton lechleri* + 15 μ g de claritromicina, al cuarto grupo se agregó 5 μ L de látex de *Croton lechleri* + 25 μ g de amoxicilina + 15 μ g de claritromicina, al quinto

grupo se agregó 25 μ g de amoxicilina + 15 μ g de claritromicina; y al sexto grupo se le agregó 5 μ L de DMSO.

d) Evaluación antimicrobiana.

Con la ayuda de una pinza metálica estéril, se tomaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada grupo, y se colocaron en la superficie del agar sembrado con el microorganismo *Helicobacter pylori*, de tal modo que quedaron los discos (uno de cada grupo) a un cm del borde de la Placa Petri y de forma equidistante. Se dejaron en reposo por 15 min y después las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 35-37°C por 48 horas.



e) Lectura e interpretación.



La lectura se realizó observando y midiendo con una regla Vernier, el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano. Esta medición se realizó para cada una de los grupos con agentes antibacterianos. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en el Estándar M45 del CLSI.

ANEXO 5

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO



San Jose
LABORATORIO CLINICO
Calidad y profesionalismo el servicio de tu salud

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha prestado sus instalaciones, en donde el Sr. JOSÉ LUIS CRUZ SILVA, estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Eficacia de la sinergia antibacteriana in vitro del látex de *Croton lechleri* con amoxicilina y claritromicina sobre *Helicobacter pylori*", durante los días 3 al 13 de febrero de 2020, bajo la orientación y asesoramiento del Microbiólogo Jaime Abelardo Polo Gamboa.

Se expide la presente a solicitud del estudiante, sólo para fines académicos, a los 24 días del mes de febrero de 2020.


José Luis Calla Quevedo
BIÓLOGO, MICROBIÓLOGO
C. S. P. 030 P^o

Sede Principal: Francisco Bolognesi 678 Of. 203 - Centro Histórico - Trujillo
Sucursales: Los Corales 277- Barrio Médico Urb. Santa Inés - Trujillo
☎ 769999 - ☎ 948649844
✉ sanjoselabs@hotmail.com 🌐 www.sanjoselabs.amawebs.com/

ANEXO 6

Análisis de varianza de promedios de los diámetros de las zonas de inhibición producidas por los agentes antibacterianos contra *Helicobacter pylori*.

ANOVA					
Zona de inhibición.					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	8151,933	5	1630,387	451,955	0,000
Dentro de grupos	194,800	54	3,607		
Total	8346,733	59			

Fuente: Ficha de recolección de datos

ANEXO 7

PRUEBAS POS HOC: Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Zona_de_inhibición. HSD Tukey®

(I) Agente antibacteriano	(J) Agente antibacteriano.	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
LCL 50%	LCL 50% + AMX	-4,500*	0,849	0,000	-7,01	-1,99
	LCL 50% + CLA	-6,900*	0,849	0,000	-9,41	-4,39
	LCL 50% + AMX + CLA	-2,100	0,849	0,151	-4,61	0,41
	AMX + CLA	-8,900*	0,849	0,000	-11,41	-6,39
	DMSO	25,800*	0,849	0,000	23,29	28,31
LCL 50% + AMX	LCL 50%	4,500*	0,849	0,000	1,99	7,01
	LCL 50% + CLA	-2,400	0,849	0,069	-4,91	0,11
	LCL 50% + AMX + CLA	2,400	0,849	0,069	-0,11	4,91
	AMX + CLA	-4,400*	0,849	0,000	-6,91	-1,89
	DMSO	30,300*	0,849	0,000	27,79	32,81
LCL 50% + CLA	LCL 50%	6,900*	0,849	0,000	4,39	9,41
	LCL 50% + AMX	2,400	0,849	0,069	-0,11	4,91
	LCL 50% + AMX + CLA	4,800*	0,849	0,000	2,29	7,31
	AMX + CLA	-2,000	0,849	0,191	-4,51	0,51
	DMSO	32,700*	0,849	0,000	30,19	35,21
LCL 50% + AMX + CLA	LCL 50%	2,100	0,849	0,151	-0,41	4,61
	LCL 50% + AMX	-2,400	0,849	0,069	-4,91	0,11
	LCL 50% + CLA	-4,800*	0,849	0,000	-7,31	-2,29
	AMX + CLA	-6,800*	0,849	0,000	-9,31	-4,29
	DMSO	27,900*	0,849	0,000	25,39	30,41
AMX + CLA	LCL 50%	8,900*	0,849	0,000	6,39	11,41
	LCL 50% + AMX	4,400*	0,849	0,000	1,89	6,91
	LCL 50% + CLA	2,000	0,849	0,191	-0,51	4,51
	LCL 50% + AMX + CLA	6,800*	0,849	0,000	4,29	9,31
	DMSO	34,700*	0,849	0,000	32,19	37,21
DMSO	LCL 50%	-25,800*	0,849	0,000	-28,31	-23,29
	LCL 50% + AMX	-30,300*	0,849	0,000	-32,81	-27,79
	LCL 50% + CLA	-32,700*	0,849	0,000	-35,21	-30,19
	LCL 50% + AMX + CLA	-27,900*	0,849	0,000	-30,41	-25,39
	AMX + CLA	-34,700*	0,849	0,000	-37,21	-32,19

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

ANEXO 8

FICHA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO



FICHA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

ÍTEM	CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ				CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ÉTICOS							
	CONTENIDO (Se refiere al grado en que el instrumento refleja el contenido de la variable que se pretende medir)		CONSTRUCTO (Hasta donde el instrumento mide realmente la variable, y con cuanta eficacia lo hace)		RELEVANCIA (El ítem es esencial o importante, es decir, debe ser incluido)		COHERENCIA INTERNA (El ítem tiene relación lógica con la dimensión o el indicador que está midiendo)		CLARIDAD (El ítem se comprende fácilmente, es decir, sus sintácticas y semánticas son adecuadas)		SUFICIENCIA (Los ítems que pertenecen a una misma dimensión bastan para obtener la dimensión de esta)	
	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO	SI	NO
1	X		X		X		X		X		X	
2	X		X		X		X		X		X	
3	X		X		X		X		X		X	

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ÉTICOS	SI	NO	OBSERVACIONES
El instrumento contiene instrucciones claras y precisas para responder la ficha de cotejos	X		
Los ítems permiten el logro del objetivo de la investigación	X		
Los ítems están distribuidos en forma lógica y secuencial	X		
El número de ítems es suficiente para recoger la información. En caso de ser negativa la respuesta sugiere los ítems a añadir	X		
VALIDEZ			
APLICABLE	X	NO APLICABLE	APLICABLE TENIENDO EN CUENTA OBSERVACIÓN

Validado por Fecha

Jaime Polo Cancha CBP 6951

Miguel Angel Muñoz Ríos CBP 5830

María Soledad Ayala Ravelo CBP 1206

ANEXO 9

ACTA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD



ACTA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD TRABAJO ACADÉMICO

Yo, DAVID RENE RODRIGUEZ DIAZ
..... docente de la Facultad SIENCIAS DE LA SALUD y
Escuela Profesional MEDICINA..... de la Universidad César Vallejo TRUJILLO
(precisar filial o sede), revisor (a) de la tesis titulada

"EFICACIA DE LA SINERGIA ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL
LÁTEX DE CROTON LESHLERI CON AMOXICILINA Y
CLARITROMICINA SOBRE HELICOBACTER PILORY
....."

del (de la) estudiante JOSÉ LUIS CRUZ SILVA
..... constato que la investigación tiene un índice de
similitud de .19.% verificable en el reporte de originalidad del programa Turnitin.

El/la suscrito (a) analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las
coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la
tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas
por la Universidad César Vallejo.

Lugar y fecha 13 de Marzo del 2020

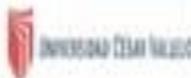
David Rodríguez Díaz
MEDICO CIRUJANO
C.M.P. 48867

Firma

Nombres y apellidos del (de la) docente

DNI: 4276904

ANEXO 10

	AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE TESIS EN REPOSITORIO INSTITUCIONAL UCV.	Código: Versión: Fecha: Página:
---	---	--

Yo, José Luis Cruz Silva, identificado con de DNI N° 01119375, egresado de la escuela profesional de Medicina Humana de la Universidad César Vallejo - filial Trujillo, autorizo la divulgación y comunicación pública de mi trabajo de investigación titulado:

"Eficacia de la sinergia antibacteriana in vitro del látex de *Croton lechleri* con amoxicilina y claritromicina sobre *Helicobacter pylori*".

En el repositorio institucional de la UCV (<http://repositorio.ucv.edu.pe/>), según lo estipulado en el decreto legislativo R22, Ley sobre Derecho de Autor, Art.33

Fundamentación en caso de no autorización:

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....


José Luis Cruz Silva
DNI: 01119375

Fecha: Trujillo, 13 DE MARZO del 2020.

Revisó	Vicorrectorado de Investigación /DEVAC/responsable del SOC	Aprobó	Rectorado
--------	--	--------	-----------

ANEXO 11

INFORME DE COINCIDENCIAS SOFTWARE TURNITIN



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA

Eficacia de la sinergia antibacteriana in vitro del látex de *Croton lechleri* con amoxicilina y claritromicina sobre *Helicobacter pylori*

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Médico Cirujano

AUTOR:

José Luis Cruz Sève: (ORCID:0000-0002-5874-2352)

ASESORES:

Mgtr. David René Rodríguez Díaz (ORCID:0000-0002-9203-3576)

Mgtr. Jaime Abelardo Polo Gamba (ORCID:0000-0002-3768-8051)

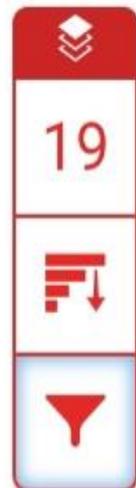
Dra. Irma Luz Yupari Azabache (ORCID:0000-0002-0030-0172)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Enfermedades Infecciosas y Transmisibles

Trujillo - Perú

2020



Resumen de coincidencias		
19 %		
<		>
1	Entregado a Universida... Trabajo del estudiante	12 % >
2	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	3 % >
3	Entregado a Universida... Trabajo del estudiante	1 % >
4	Entregado a Universida... Trabajo del estudiante	1 % >
5	repositorio.uap.edu.pe Fuente de Internet	<1 % >
6	www.upch.edu.pe Fuente de Internet	<1 % >
7	www.ops-oms.org Fuente de Internet	<1 % >
8	webquery.ujmd.edu.sv Fuente de Internet	<1 % >
9	Entregado a Universida... Trabajo del estudiante	<1 % >
10	repositorio.unprg.edu.pe Fuente de Internet	<1 % >
11	Entregado a Universida... Trabajo del estudiante	<1 % >
12	Entregado a Carlos Tes... Trabajo del estudiante	<1 % >
13	studylib.es Fuente de Internet	<1 % >
14	Entregado a Universida... Trabajo del estudiante	<1 % >
15	Entregado a Universida... Trabajo del estudiante	<1 % >
16	www.microbiologia.co... Fuente de Internet	<1 % >
17	ceba.com.co Fuente de Internet	<1 % >
18	worldwidescience.org Fuente de Internet	<1 % >

ANEXO 12

AUTORIZACIÓN DE LA VERSIÓN FINAL DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

AUTORIZACIÓN DE LA VERSIÓN FINAL DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

CONSTE POR EL PRESENTE EL VISTO BUENO QUE OTORGA EL ENCARGADO DE INVESTIGACIÓN DE:

LA ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA

A LA VERSION FINAL DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN QUE PRESENTA:

CRUZ SILVA JOSE LUIS.

INFORME TITULADO:

"Eficacia de la sinergia antibacteriana in vitro del látex de *croton lechleri*
con amoxicilina y claritromicina sobre *Helicobacter pilory*"

PARA OBTENER EL GRADO O TÍTULO DE:

MÉDICO CIRUJANO

SUSTENTADO EN FECHA: 13 de marzo del 2020.

NOTA O MENCIÓN: DIECISÉIS (16).

Mgtr. DAVID RENE RODRÍGUEZ DÍAZ
ENCARGADO DE INVESTIGACIÓN