



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA

Eficacia antibacteriana del extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa* sobre *Staphylococcus aureus* comparado con isoxazolil penicilina *in vitro*

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

Médico Cirujano

AUTORA:

Rivas Navarro, Deborah Esther (ORCID: 0000-0001-9839-0382)

ASESORES:

Dra. Llaque Sánchez, María Rocío del Pilar (ORCID:0000-0002-6764-4068)

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

Mg. Blgo. Polo Gamboa, Jaime Abelard (ORCID: 0000-0002-3768-8051)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Enfermedades infecciosas y transmisibles

TRUJILLO - PERÚ

2020

DEDICATORIA

A mis padres, Salomón Rivas y Lidia Navarro...

quienes me brindan su tiempo y apoyo incondicional, y que a pesar de la distancia siempre estuvieron pendientes de mí y contribuyeron a que llegue a cumplir mi ansiada meta, la de ser médico.

A mis Hermanas...

Quienes nunca me dejan de lado, y quienes siempre están dispuestas a apoyarme cuando yo lo necesite.

Con amor y gratitud:

Rivas Navarro, Deborah Esther

AGRADECIMIENTO

A mis asesores:

Gracias Dra. Llaque Sánchez, Dra. Yupari Azabache y Dr. Jaime Polo, por todo el tiempo dedicado para el desarrollo de mi investigación, también por sus comprensión, consejos y paciencia, ya que gracias a su apoyo logré culminar con éxito este trabajo de investigación.

Mis sinceros agradecimientos:

Rivas Navarro, Deborah Esther.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	01
II. MARCO TEÓRICO	04
III. METODOLOGÍA	07
3.1 Tipo y diseño de investigación	07
3.2 Variables y operacionalización	08
3.3 Población, muestra y muestreo	08
3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	09
3.5 Procedimientos	09
3.6 Método y análisis de datos	09
3.7 Aspectos éticos	10
IV. RESULTADOS	11
V. DISCUSIÓN	15
VI. CONCLUSIONES	18
VII. RECOMENDACIONES	19
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	
ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 01. Análisis descriptivo de los halos de inhibición de la <i>Eficacia antibacteriana</i> del extracto alcohólico del bulbo de <i>Eleutherine bulbosa</i> “ <i>Yahuar piri-piri</i> ” e isoxazolil penicilina (Oxacilina 1 µg), sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>in-vitro</i>	11
Tabla 02. Análisis de Varianza de las medias de la <i>Eficacia antibacteriana</i> del extracto alcohólico de <i>Eleutherine bulbosa</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> comparado con isoxazolil penicilina (Oxacilina 1 µg), <i>in-vitro</i>	11
Tabla 03. Valoración Post ANOVA de la <i>Eficacia antibacteriana</i> del extracto alcohólico del bulbo de <i>Eleutherine bulbosa</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> comparado con isoxazolil penicilina (Oxacilina 1 µg), <i>in-vitro</i>	12

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 01. Diagrama de caja de los halos inhibitorios por los grupos estudiados de la <i>Eficacia antibacteriana</i> del extracto alcohólico del bulbo de <i>Eleutherine bulbosa</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> comparado con isoxazolil penicilina (Oxacilina 1 µg), <i>in-vitro</i>	12

RESUMEN

En el presente trabajo de investigación, se evaluó la eficacia antibacteriana del extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa* sobre *Staphylococcus aureus* comparado con isoxazolil penicilina (Oxacilina 1 µg) *in-vitro*, utilizándose 10 repeticiones por cada grupo de estudio. Se observó efecto antibacteriano a partir de las concentraciones del 75% (20mm, DS: ± 1.33 IC 95% 19.05 - 20.95) y al 100% (22.8mm, DS ±1.135 IC95% 21.99 - 23.61) siendo Oxacilina el que presentó mayor inhibición (36mm, DS: ± 1.054 IC95% 35.26 - 36.75), las concentraciones de 50% y al 25% mostraron zonas de inhibición menores. De acuerdo al Análisis de varianza (ANOVA) se demostró que existen diferencias altamente significativas entre los grupos analizados ($p=0,000$). La prueba post ANOVA y Tukey determinó que la Oxacilina posee un mejor efecto antibacteriano comparado con las diferentes concentraciones de la planta. Concluyendo que las concentraciones al 100% del extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa* presenta mayor eficacia antibacteriana.

Palabras clave: *Eleutherine bulbosa*, extracto alcohólico, Isoxazolil penicilina.

ABSTRACT

In the present research work, the antibacterial efficacy of the alcoholic extract of *Eleutherine bulbosa* on *Staphylococcus aureus* was evaluated compared with isoxazolyl penicillin (Oxacillin 1 µg) in vitro, using 10 repetitions for each study group. Antibacterial effect was effected from concentrations of 75% (20mm, SD: ± 1.33 95% CI 19.05 - 20.95) and at 100% (22.8mm, SD ± 1.135 95% CI 21.99 - 23.61) being Oxacillin the one that presented greater inhibition (36mm, DS: ± 1.054 95% CI 35.26 - 36.75), concentrations of 50% and 25% in smaller zones of inhibition. According to the Analysis of Variance (ANOVA), it was shown that there are highly significant differences between the groups analyzed ($p = 0.000$). Tukey's post ANOVA test determined that Oxacillin has a better antibacterial effect compared to the different concentrations of the plant. Concluding that the 100% concentrations of the alcoholic extract of *Eleutherine bulbosa* has greater antibacterial efficacy.

Key words: *Eleutherine bulbous*, alcoholic extract, Isoxazolyl penicillin.

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones, han sido causantes de un sinnúmero de muertes. Son muchos los agentes que pueden generar infecciones, tanto virus, hongos y bacterias. De todas las bacterias, el *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), desde su identificación en el año 1882 sigue siendo asociado con elevadas cifras de cuadros infecciosos. La mayoría son de carácter leve con foco de origen dermatológico; sin embargo, también se han relacionado con presentaciones clínicas graves que ponen en riesgo la supervivencia. Si bien este agente se vincula a infecciones intrahospitalarias también tiene como reservorio principal la mucosa nasal. Se ha estimado que 2 millones de personas lo albergan, y alrededor del 1% corresponde al *Staphylococcus aureus metilino resistente* (MRSA).¹

S. aureus es un coco gram positivo, clasificado como peligroso por su virulencia, potencial patogénico, y por su capacidad de resistir a los principales antibióticos del mundo, lo que ocasionó escasez de fármacos para su erradicación, así como elevadas pérdidas monetarias puesto que, a la fecha, el incremento de su incidencia se relaciona con evoluciones clínicas tórpidas y graves, lo que genera un alarmante problema de salud pública.²

Este microorganismo tiene la capacidad de colonizar, adaptarse y mantenerse viable en los diversos tejidos durante el proceso infeccioso, lo que contribuye al progreso rápido de la infección. Tal es así que, al poco tiempo del uso de las penicilinas como tratamiento frente a este agente, alrededor de los años 40, comenzaron a reportarse casos de infecciones resistentes a penicilinas lo que luego se explicó debido a que los estafilococos desarrollaron penicilinasas, lo que le permitió desarrollar resistencia a diversas clases o grupos de antimicrobianos, fundamentalmente frente al grupo de los B-lactámicos.³

Entre 20 a 50% de los adultos son portadores sanos del *S. aureus*; y estas cifras se elevan en pacientes internados en hospitales, personal de salud y personas que hacen uso regular de agujas. En los años sesenta en Europa se describieron los primeros brotes de infecciones intrahospitalarias por *S. aureus*; desde ese momento la prevalencia fue creciendo en las demás áreas geográficas.⁴

En Sudamérica el primer brote epidémico de *S. aureus* con resistencia frente a meticilina fue reportado en Ecuador, y posteriormente en Argentina.⁵ Si bien la presencia de MRSA se ha incrementado de forma alarmante, en el Perú su frecuencia continúa siendo baja si lo comparamos con países de Sudamérica.⁶

Ante la alta presencia de infecciones, el ser humano tuvo que combatir las a través de recursos que tenían a su alcance, por ello durante siglos fueron tratadas a base de plantas medicinales. Esta práctica tradicional viene desarrollándose durante muchos miles de años en todo el mundo y en nuestro país; sobre todo en las zonas rurales, donde esta práctica tradicional cotidiana se desarrolla para aliviar muchas de sus afecciones. Siendo el *Eleutherine bulbosa* “Yahuar piri-piri” una de sus fuentes principales de medicamentos debido a sus múltiples propiedades.⁷

Esta planta es conocida en diversos países por diferentes nombres, en Brasil como *Eleutherine plicata*, Perú como Yahuar piri-piri; EE. UU como *Eleutherine americana*, entre otros. Integra la familia de Iridáceas⁷; es una especie bulbosa que ha sido utilizada desde hace mucho para problemas infecciosos ya que ha demostrado poseer efecto antibacteriano y antifúngico, siendo por ello valorada y utilizada.⁸ Los bulbos son los que se emplean para el tratamiento.⁹

Este magnífico potencial que tienen los bulbos de *Eleutherine bulbosa* en medicina, se explican por su composición, ya que contiene naftoquinonas como elecanacina, eleutherina, eleutherol y eleutherinona, que poseen efectos antimicrobianos, antifúngicos, antivirales, propiedades anticancerígenas, antioxidantes y anti parasitarias.¹⁰

Es por ello, que se plantea el problema de investigación ¿Tiene eficacia antibacteriana el extracto alcohólico del bulbo de *Eleutherine bulbosa* “Yahuar piri-piri” sobre *Staphylococcus aureus*, comparado con isoxazolil penicilina (Oxacilina 1 µg) *in-vitro*?

El trabajo se justifica debido a que *Staphylococcus aureus*, continúa siendo uno de los principales patógenos infecciosos implicados en severos problemas de salud a nivel mundial.⁶ A la fecha se siguen reportando alarmantes cifras de casos de resistencias a los principales antibióticos, por ello se torna imprescindible seguir en

la búsqueda de productos con efecto antibacteriano que permitan tener opciones terapéuticas que posibiliten continuar en el camino a la erradicación y control de infecciones por *Staphylococcus aureus*.

Hoy en día una gran alternativa de tratamiento lo representan los recursos naturales ya que son seguros, efectivos e inocuos, siendo esta última característica lo que la coloca por encima de los fármacos convencionales dado que éstos en su mayoría poseen toxicidad hepática o renal. Por otro lado, hasta el momento no se han reportados casos de resistencia antibacteriana a productos naturales.⁴

Por ello, es propicio seguir con investigaciones con plantas, entre las que se encuentra *Eleutherine bulbosa*, a razón de que múltiples estudios han demostrado la alta sensibilidad de *Staphylococcus aureus* hacia esta planta; lo que abre una posibilidad y alternativa como tratamiento natural eficiente, con un costo bajo y con efectos adversos escasos, evitando así posibles consecuencias irreversibles o mortales. Quedando sustentado así esta investigación, que busca conocer si el aceite alcohólico de *Eleutherine bulbosa* posee acción antibacteriana.

El objetivo general: Evaluar si el extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa* tiene eficacia antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, comparado con isoxazolil penicilina (Oxacilina 1 µg) *in-vitro*.

Los objetivos específicos: Determinar la eficacia antibacteriana del extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa* en concentraciones de 100%, 75%, 50%, 25% sobre *Staphylococcus aureus*. Además, determinar la eficacia antibacteriana de isoxazolil penicilina (Oxacilina 1 µg) sobre *Staphylococcus aureus*.

Como hipótesis de este proyecto de investigación: H₁: El extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa* “*Yahuar piri-piri*” tiene eficacia sobre *Staphylococcus aureus*, comparado con isoxazolil penicilina (Oxacilina 1 µg) *in-vitro*. Por otro lado la H₀: El extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa* “*Yahuar piri-piri*” no tiene eficacia sobre *Staphylococcus aureus*, comparado con isoxazolil penicilina (Oxacilina 1 µg) *in-vitro*.

II. MARCO TEÓRICO

Novaryatin¹¹ (Indonesia, 2020) estudió la actividad antimicrobiana del acetato de etilo de *Eleutherine bulbosa* al 1.25; 2.5; 5; 10 y al 20% frente a *P. acnes*, *S. epidermidis* y *S. aureus*. Demostró actividad frente a todas las bacterias en estudio en especial contra el género *Staphylococcus* con diámetros inhibitorios de 13.7 ± 2.3 mm, 16.9 ± 1.7 mm, 18.3 ± 2.5 mm, 20.7 ± 2.2 mm, and 23.6 ± 2.3 mm para *S. aureus*.

Novaryatin¹² (Indonesia, 2019) evaluó la capacidad antibacteriana del extracto de etanol de *Eleutherine bulbosa* al 1%, 5%, 10% y 15% sobre *Staphylococcus aureus*. Demostró que inhibe el crecimiento del *Staphylococcus* en dichas concentraciones con zonas inhibitorias de 14.3 ± 2.5 ; $16,6 \pm 1,7$; $16,2 \pm 2,0$; y 18.0 ± 1.7 mm respectivamente.

Novaryatin¹³ (Indonesia, 2018) evaluó la capacidad inhibitoria de la *Eleutherine bulbosa* (cebolla Dayak) frente a *Staphylococcus epidermidis*, en diferentes concentraciones. Demostró que el extracto etanólico al 1%, 5%, 10% y 15% inhiben el crecimiento microbiano con diámetros de halo inhibitorios de 16.9 ± 3.6 ; $17,6 \pm 1,8$; $18,6 \pm 0,0$; y $18,4 \pm 0,4$ mm respectivamente.

Rani¹⁴ (Indonesia, 2018) estudió la actividad antibacteriana del bis (2-6,7-diamino-5,8-dioxo-naftaleno-1il) propanal aislado de *Eleutherine bulbosa* frente a *Staphylococcus aureus*. Demostró que posee notable actividad antiestafilocócica, incluso con la concentración mínima inhibitoria (CMI) más baja de 3,125 µg/ml.

Kumar, et al¹⁵ (India, 2016) analizaron el extracto de etanol y acuoso de *Eleutherine bulbosa* contra *S. aureus*, a través de la medición de los diámetros inhibitorios. Demostraron que el extracto acuoso de *Eleutherine bulbosa* tuvo una zona inhibitoria de 16 mm; el extracto metanólico de 18 mm. Concluyen que ambos extractos tuvieron buen efecto antibacteriano.

Laxmipriya, et al¹⁶ (India, 2015) investigaron la eficacia bactericida del extracto de butanol, etanol y acuoso de *Eleutherine bulbosa* contra *S. aureus*, establecieron las zonas de inhibición. Demostraron que los extractos inhibieron el crecimiento de las cepas, con una clara zona inhibitoria de 24.0 ± 0.0 ; 14.5 ± 2.6 ; 20.0 ± 2.6 mm para los extractos de butanol, etanol y acuoso respectivamente, siendo el butanol el mejor extracto.

Pérez¹⁷ (Perú, 2016) investigó el efecto bactericida del extracto de etanol de *Eleutherine bulbosa* en concentraciones del 10%, 20%, 40% y 60% sobre *E. coli*. Demostró que a partir de una concentración del 20% se obtuvo una sensibilidad límite, con halo inhibitorio de 8.06 mm, y a concentraciones del 40% y 60% el halo inhibitorio fue de 15.63 mm y 18.16 mm respectivamente, indicando ser muy sensible.

Costa¹⁸ (Perú, 2016) determinó la eficacia microbicida del extracto etanólico de *Eleutherine bulbosa* al 25%, 50%, 75% y 100% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35668; obteniendo halos de inhibición promedios entre 20.5mm, 20.75mm, 21.25 mm; 23.70 mm, en las respectivas diluciones. Evidenciándose que a mayor concentración mayor sensibilidad.

En relación a los textos teóricos encontramos que *Staphylococcus aureus*, miembro más virulento del género de *Staphylococcus*, es un coco gram positivo que se agrupa en forma de racimos de uva. Con diámetro de 0.5 y 1,5 μm y sin movilidad. Esta bacteria está presente en las mucosas y piel de los seres humanos; y origina enfermedades sistémicas severas que ponen en riesgo la vida, además de infecciones cutáneas, de tejidos blandos, huesos, etc. Este agente ocasiona las enfermedades mediante toxinas o por invasión de forma directa y la destrucción del tejido; a través de su proliferación ocasiona los abscesos, y mediante la destrucción tisular genera infecciones cutáneas, osteomielitis, endocarditis, empiema, neumonía y artritis séptica.¹⁹

S. aureus posee una pared celular que consiste en peptidoglucano entrelazado con considerables cantidades de ácido teicoico. Éste peptidoglucano comúnmente está recubierto de proteínas de superficie y polisacáridos.²⁰

Con el abuso e inadecuado uso de antibióticos se inició la resistencia bacteriana, generando la aparición de la resistencia frente a meticilina por parte del *S. aureus*, la cual fue conferida por la producción de penicilinasas por parte de la bacteria.²¹ El tratamiento para este agente se basa en penicilinas y cefalosporinas, debido a que son fármacos activos contra los peptidoglucanos de la pared.²⁰

Oxacilina es un antibiótico betalactámico ácido estable de administración parenteral, de la familia de las penicilinas semi sintética, con resistencia a penicilinasas,²² su mecanismo de acción lo realiza a través de la inhibición de la terminación del enlace

cruzado de la pentaglicina, proceso que es normalmente catalizado por transpeptidasas, evitando así el último paso de la formación de la pared bacteriana, conduciendo a la bacteria a la lisis.²³

Vancomicina es un antibiótico bactericida que pertenece a los glucopéptidos, activa contra bacterias grampositivas, especialmente contra *Staphylococcus aureus* contra quien presenta una actividad excelente. Producido por *Streptomyces orientalis*, fue introducido cuando aparecieron cepas resistentes de *S. aureus*, éste fármaco es la primera elección cuando se trata de combatir bacterias con resistencia a meticilina; actúa inhibiendo la formación de la pared bacteriana²⁴ mediante su unión con el extremo terminal D-alanina-D-alanina de las cadenas polipeptídicas, que son unidades precursoras de la pared celular.²³

Eleutherine bulbosa, conocida comúnmente como Yahuar piri-piri. Forma parte de la familia botánica *Iridaceae*, y es oriunda de América tropical, y en nuestro país se encuentra ampliamente distribuida en Loreto, Ucayali y Cuzco; es una hierba que crece hasta alrededor de 50 centímetros de altura; presenta flores de color blanquecino con 5 a 6 pétalos que se están soldados en la base; además posee un bulbo subterráneo de color rojizo de 4 centímetros de longitud por 2,5 centímetros de diámetro, que se conforman por envolturas que originan a las hojas.²⁵

Tradicionalmente esta planta es utilizada como anticonceptivo, antidisentérico, antiparasitario, en la conjuntivitis, hemorragias, cicatrizante de úlceras o heridas cutáneas, entre otros más.²⁶

Dentro de la composición se determinó que la planta presenta auronas, chalconas, cumarinas finas, flavonoides, esteroides libres, pigmentos carotenoides, taninos y quinonas (naftoquinonas y antraquinonas)²⁶ De todos ellos son las quinonas quienes muestran diversas actividades farmacológicas, como bactericidas, fungicidas y antiprotozoarios, y se señala que causan estrés oxidativo al inducir la formación endógena de especies reactivas de oxígeno.²⁷

Las quinonas son compuestos que de acuerdo a su complejidad química se clasifican monocíclicas, bicíclicas y tricíclicas, siendo las benzoquinonas, naftoquinonas y antraquinonas respectivamente. De estas últimas las naftoquinonas se encuentran distribuidas de manera amplia en bacterias, hongos, plantas y también hasta en animales. Su mecanismo de acción con actividad antibacteriana

radica en sus propiedades de oxidación-reducción, como también en su capacidad ácido-base responsables de su actividad biológica. Sin embargo, su actividad bactericida está atribuida principalmente al estrés oxidativo que generan especies de oxígeno altamente reactivas que son capaces de inhibir al complejo de topoisomerasa I y II, induciendo así la apoptosis celular. Además 1,2-naftoquinona posee un carácter electrofílico y es capaz de unirse a las proteínas y provocar su ruptura.²⁸

Otros mecanismos que se relacionan con la toxicidad de estas naftoquinonas y de sus derivados están relacionadas con el anillo farmacóforo de la 1,4-naftoquinona, que es capaz de interactuar con la membrana de la célula microbiana, en función de la lipofilia de los sustituyentes, o también con ácidos nucleicos intercalando su parte 1,4-naftoquinona entre los pares de bases de la hélice doble del ADN, inhibiendo consecuentemente la replicación y transcripción evitando la viabilidad celular a través de la división y la expresión genética de las bacterias.²⁹

Sin embargo, la actividad de *Eleutherine bulbosa* sobre *Staphylococcus aureus* no solo es causada por las quinonas sino también por la presencia de alcaloides, flavonoides y taninos. Los alcaloides pueden inhibir el crecimiento bacteriano al alterar los componentes del peptidoglucano, generando que las capas de la pared celular no se formen intactas, causando así la muerte bacteriana, además son aceleradores de ADN que pueden inhibir la enzima topoisomerasa bacteriana; por otro lado los flavonoides destruyen la permeabilidad de las paredes bacterianas, los microsomas y los lisosomas como resultado de las interacciones entre éstos y el ADN bacteriano a través de la inhibición, lo que resulta en la incorporación de cadenas de glicina no unidas en las membranas celulares de peptidoglucano para formar una estructura débil. Por último, los taninos tienen objetivos en los polipéptidos de la pared celular para que la formación de la pared celular sea menos que perfecta, ocasionando de esta forma la lisis bacteriana debido a la presión osmótica y física.¹²

III. METODOLOGÍA

3.1 Tipo y diseño de la investigación

Tipo de estudio: Básico³⁰

Diseño: Experimental de estímulo creciente con repeticiones múltiples, post prueba.³⁰ (Anexo 01)

3.2 Variables y operacionalización (Anexo 02)

Variable independiente: Agente antibacteriano para cepas de *Staphylococcus aureus*

- No farmacológico: Extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa*
- Farmacológico: Oxacilina dosis de 1µg

Variable dependiente: Eficacia antibacteriana de acuerdo al CLSI.³¹

- Con eficacia: zona inhibitoria ≥ 13 mm.
- Sin eficacia: zona inhibitoria < 13 mm.

3.3 Población, muestra, muestreo

Población: Cada una de las cepas de *Staphylococcus aureus* cultivadas dentro del laboratorio.

Criterios de inclusión: cultivos de *Staphylococcus aureus* con evidencia de crecimiento en las primeras 24 horas.

Criterios de exclusión:

- Cultivos con contaminación.
- Cultivos sin evidencia de proliferación bacteriana.

Muestra: El tamaño de la muestra se obtuvo a través de la fórmula de comparación de dos promedios, determinándose como muestra 06 repeticiones para cada grupo en estudio. Sin embargo, se trabajó con 10 repeticiones por grupo.³² (Anexo 03)

Muestreo: Probabilístico, aleatorio simple.³³

Unidad de análisis: cada una de las placas Petri que alberga a las cepas de *Staphylococcus aureus* junto al extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa* a su correspondiente concentración .

Unidad de muestreo: cada una de las colonias de *Staphylococcus aureus* cultivadas en las placas Petri.³³

3.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad

La técnica: Se basó en la observación de campo experimental que consistió en visualizar directamente el crecimiento microbiano de las cepas de *Staphylococcus aureus* y los halos de inhibición en todas las placas Petri.³⁰

Instrumento: Se utilizó una ficha para recolección de campo, para registrar el número de placa, las diluciones y la medida de las áreas inhibitorias a las 48 h. (Anexo 04).

Validación y confiabilidad del instrumento: La ficha de campo, fue revisada por dos profesionales de medicina y un microbiólogo quienes analizaron que la información recolectada cumpliera los objetivos del estudio. (Anexo 05).

3.5 Procedimiento: (Anexo 06)

Todos los procedimientos realizados en el laboratorio particular, estuvieron enmarcadas en el protocolo de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC).³⁴

- a) *Eleutherine bulbosa* fue obtenida durante el verano del año 2020 del Jardín botánico del Departamento de etnobotánica del Instituto de Medicina Tradicional de Iquitos.
- b) Se efectuó la autenticación de la planta en el laboratorio del Herbarium Amazonense del CIRNA, de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.
- c) La sustracción del extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa* se utilizó alcohol etílico de 96° para la maceración.
- d) La sensibilidad antibacteriana se determinó a través del método de disco difusión Kirby-Bauer y como medio de cultivo bacteriano se empleó Agar Müller- Hinton.

3.6 Métodos de análisis de datos

La información obtenida en la ficha para recolección de datos, se pasó al programa Excel y posteriormente se procesó en la base de datos del programa

SPSS de la versión 26. Se utilizó además el análisis de varianza (ANOVA) para el análisis estadístico, y para la determinación de la eficacia antibacteriana relacionado con los promedios de los halos inhibitorios se utilizó la prueba de homogeneidad de Tukey (POST ANOVA).³³ (Anexo 07)

3.7 Aspectos éticos:

Para la ejecución del estudio en el laboratorio, con relación de la protección personal se tomaron en cuenta las normas de bioseguridad determinadas por la OMS.³⁵ (Anexo 08)

La investigación se llevó a cabo respetando el principio de ética que se encuentra en el código de ética del Colegio Médico del Perú, capítulo 6, Artículo 48.³⁶ (Anexo 09)

Fueron cumplidos los criterios para la protección de la biodiversidad enmarcados en el artículo 24 de la Ley N°29763, Ley forestal y de fauna silvestre.³⁷ (Anexo 10)

IV. RESULTADOS

Tabla 1. Análisis descriptivo de los halos de inhibición de la *Eficacia antibacteriana* del extracto alcohólico del bulbo de *Eleutherine bulbosa* “*Yahuar piri-piri*” e isoxazolil penicilina (Oxacilina 1 µg), sobre *Staphylococcus aureus*, *in-vitro*.

Concentración	Media (mm)	Desviación estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
			Límite inferior	Límite superior		
25%	11.60	1.430	10.58	12.62	9	14
50%	12.70	1.160	11.87	13.53	11	15
75%	20.00	1.333	19.05	20.95	17	21
100%	22.80	1.135	21.99	23.61	21	25
OXACILINA	36.00	1.054	35.25	36.75	34	38

Fuente: Salida De SPSS Vs 26.0

Tabla 02. Análisis de Varianza de las medias de la *Eficacia antibacteriana* del extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa* sobre *Staphylococcus aureus* comparado con isoxazolil penicilina (Oxacilina 1 µg), *in-vitro*.

ANOVA

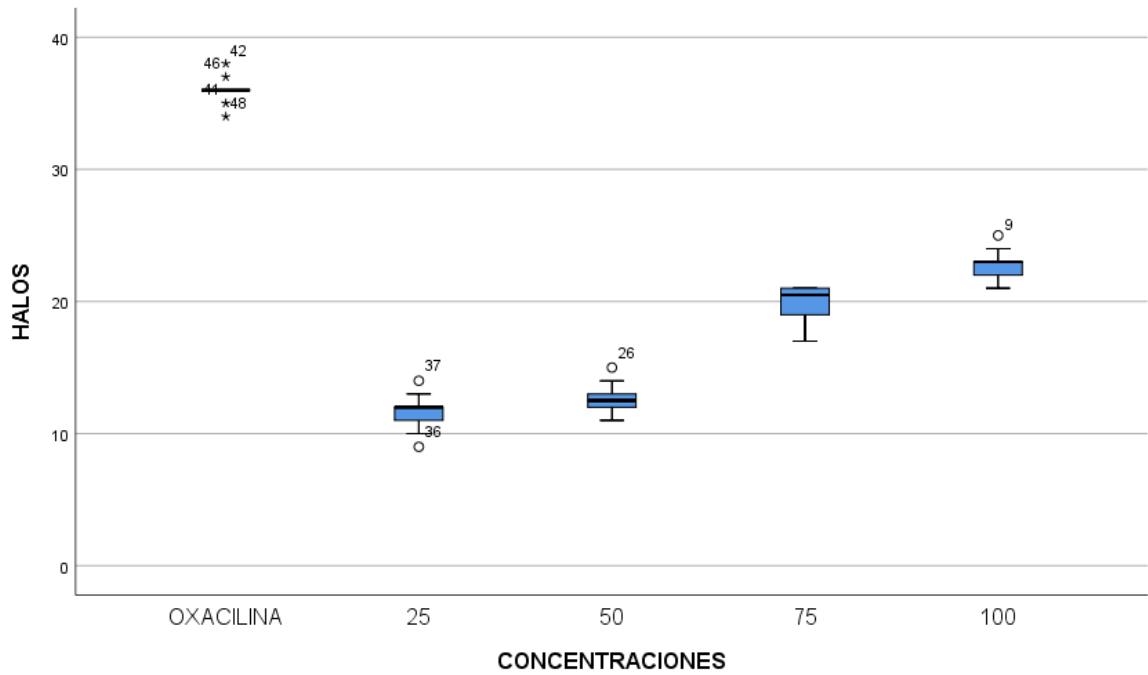
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	3857.680	4	964.420	637.282	0.000
Dentro de grupos	68.100	45	1.513		
Total	3925.780	49			

Fuente: Salida De SPSS Vs 26.0

Tabla 03. Valoración Post ANOVA de la *Eficacia antibacteriana* del extracto alcohólico del bulbo de *Eleutherine bulbosa* sobre *Staphylococcus aureus* comparado con isoxazolil penicilina (Oxacilina 1 µg), *in-vitro*.

CONCENTRACIONES	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
25%	10	11.60			
50%	10	12.70			
75%	10		20.00		
100%	10			22.80	
OXACILINA	10				36.00
Sig.		0.283	1.000	1.000	1.000

Fuente: Salida De SPSS Vs 26.0



Fuente: Salida De SPSS Vs 26.0

Figura 01. Diagrama de caja de los halos inhibitorios por los grupos estudiados de la *Eficacia antibacteriana* del extracto alcohólico del bulbo de *Eleutherine bulbosa* sobre *Staphylococcus aureus* comparado con isoxazolil penicilina (Oxacilina 1 µg), *in-vitro*.

V. DISCUSIÓN

En el presente trabajo de investigación, se evaluó la Eficacia antibacteriana del extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa* sobre *Staphylococcus aureus* comparado con isoxazolil penicilina (Oxacilina 1 µg) in-vitro, utilizándose 10 repeticiones por cada grupo de estudio, se observaron los siguientes resultados.

En la tabla 01, se observa que las medias de los halos de inhibición del extracto alcohólico del bulbo de *Eleutherine bulbosa*, evidencian eficacia antibacteriana según los criterios de CLSI (≥ 13 mm), a partir de las concentraciones del 75% (20mm, DS: ± 1.33 IC 95% 19.05 - 20.95) y al 100% (22.8mm, DS ± 1.135 IC95% 21.99 - 23.61) siendo Oxacilina el que presentó mayor inhibición (36mm, DS: ± 1.054 IC95% 35.26 - 36.75). Las concentraciones de 50 y 25% mostraron zonas de inhibición menores. Demostrándose así que, a mayor concentración del extracto, mayor capacidad antibacteriana, sin llegar a superar al control.

En la tabla 02, Considerando que las dimensiones de los halos inhibitorios cumplen el criterio de homogeneidad de varianzas (Prueba de Levene, Anexo N°12) se procedió a aplicar el ANOVA; se compararon las cuatro concentraciones del extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa* sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* comparado con Oxacilina indicando que existen diferencias altamente significativas entre los grupos analizados ($p=0,000$).

En la tabla 03, se muestra la prueba post ANOVA de Tukey, en donde podemos evidenciar que los halos inhibitorios por cada concentración se separan en 4 subconjuntos de acuerdo a la eficacia que produjeron las concentraciones del extracto alcohólico del bulbo de *Eleutherine bulbosa* y Oxacilina sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*, donde tuvieron diferencias significativas ($p<0,05$), y donde se demostró que la Oxacilina posee una mejor eficacia antibacteriana comparado con las diferentes concentraciones de la planta. Los resultados evidencian que, a mayor concentración de la planta, mayor eficacia antibacteriana, sin llegar a superar al tratamiento estándar. La diferencia de la eficacia inhibitoria también puede ser visualizado en la Figura 01.

Al comparar los resultados del estudio frente a las investigaciones realizadas por otros autores con diferentes extractos obtenidos del *Eleutherine bulbosa*, se observó que se evidenciaban eficacia antibacteriana a concentraciones menores,

entre ellos está el estudio de: Novaryatin¹¹ quien utilizó diluciones del acetato de etilo de *Eleutherine bulbosa* (1.25; 2.5; 5; 10 y al 20%) y obtuvo halos mayores (13.7 ± 2.3 mm, 16.9 ± 1.7 mm, 18.3 ± 2.5 mm, 20.7 ± 2.2 mm, 23.6 ± 2.3 mm para *S. aureus*); Novaryatin¹² utilizó también el extracto de etanol de *Eleutherine bulbosa* a diferentes diluciones (1, 5, 10 y 15%) y encontró zonas de inhibición de 14.3 ± 2.5 ; $16,6 \pm 1,7$; $16,2 \pm 2,0$; y 18.0 ± 1.7 mm respectivamente.

De igual manera se observaron resultados semejantes al de este estudio con las investigaciones de: Rani¹⁴ (CMI más baja de 3,125 $\mu\text{g/ml}$.), Kumar, et al¹⁵ (extracto acuoso 16 mm; extracto metanólico 18 mm), Laxmipriya, et al¹⁶ (24.0 ± 0.0 ; 14.5 ± 2.6 ; 20.0 ± 2.6 mm para los extractos de butanol, etanol y acuoso),

Otros investigadores demostraron que la *Eleutherine bulbosa* también tiene eficacia antibacteriana sobre bacterias gram negativas y gram positivas anaerobias, entre ellos, Pérez¹⁷ (estudió el efecto sobre *E. coli*, obteniendo con concentración del 20% un halo inhibitorio límite 8.06 mm, 40% 15.63 mm y 60% 18.16 mm), Costa¹⁸ (al 25, 50, 75 y 100% sobre *Streptococcus mutans* ATCC 35668, obtuvo halos inhibitorios de 20.5mm, 20.75mm, 21.25 mm; 23.70 mm, en las respectivas diluciones) y Novaryatin¹³ (1, 5, 10 y 15%) para *Staphylococcus epidermidis*, 16.9 ± 3.6 ; $17,6 \pm 1,8$; $18,6 \pm 0,0$; y $18,4 \pm 0,4$ mm respectivamente.

Al igual que las teorías, Novaryatin¹¹ señala que los efectos de la planta contra el *Staphylococcus aureus* y otro tipo de bacterias se debe a la presencia de flavonoides, saponinas y taninos. Cada una de las cuales actúa de manera específica para provocar la muerte celular; señala que la acción de los flavonoides se relaciona con la destrucción de la permeabilidad de la pared bacteriana, provocando así un desequilibrio de fluidos celulares; mientras que el mecanismo antibacteriano de las saponinas está relacionada al daño de la membrana y la pared celular, lo que causa fugas de proteínas y enzimas de la bacteria. Por otro lado, los taninos pueden unirse a proteínas ricas en prolina e interfieren con la síntesis de proteínas o pueden interferir en la formación de la pared celular para que sea menos perfecta, ocasionando de esta forma la lisis bacteriana debido a la presión osmótica y física.

Novaryatin¹² menciona también que la presencia de alcaloides en el *Eleutherine bulbosa* inhibe el crecimiento bacteriano al alterar los componentes constituyentes del peptidoglicano, ocasionando que la capa de la pared bacteriana no se forme

completamente causando así la muerte celular. Además, menciona que los alcaloides también se conocen como intercaladores de ADN y pueden inhibir la enzima topoisomerasa de las bacterias.

Rani¹⁴ demostró que la actividad antibacteriana se atribuye a que *Eleutherine bulbosa* en su composición presenta el bis (2-6,7-diamino-5,8-dioxo-naftaleno-1il) propanal, derivado de la naftoquinona, y al igual que las teorías que señalan a este compuesto, se ha asociado su efecto bactericida al estrés oxidativo que provoca, conllevando a la formación de especies de oxígeno altamente reactivas capaces de inhibir al complejo de topoisomerasa I y II, induciendo así la apoptosis celular tanto en bacterias gram negativas y positivas²⁸. Se conoce también que el efecto bactericida de la planta se lleva a cabo gracias a que las naftoquinonas, también pueden interaccionar con los ácidos nucleicos inhibiendo así la replicación y transcripción evitando la supervivencia de las bacterias²⁹

Pérez¹⁷ relaciona el efecto antibacteriano de la planta a la presencia de quinonas, las cuales actúan sobre las adhesinas expuestas en la superficie de las bacterias, sobre los polipéptidos de la pared celular y sobre las enzimas unidas a la membrana, además de poseer acción pro-oxidante generando así especies de oxígeno altamente reactivas.

Según los resultados encontrados en este trabajo, se demuestra que gracias a su composición, *Eleutherine bulbosa* posee una importante eficacia antibacteriana, los cuales se respaldan por los resultados obtenidos en otras investigaciones, por lo que su uso y aplicación en medios rurales serían de gran impacto, debido a que en esas zonas existe limitado acceso a servicios de salud y a tratamientos farmacológicos; además por el buen efecto antibacteriano contra diversos tipos de bacteria, por su bajo costo, fácil y rápido acceso a la planta, sería una excelente alternativa de tratamiento o como complemento del mismo.

VI. CONCLUSIONES

- El extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa* presenta eficacia antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* en las concentraciones al 75% y 100%.
- El isoxazolil penicilina (Oxacilina 1 μ g), mostró halos de inhibición con mayores diámetros que lo obtenido con el extracto en estudio.

VII. RECOMENDACIONES

- Fomentar la realización de estudios para la determinación de los componentes fitoquímicos del bulbo de *Eleutherine bulbosa* para determinar su actividad antimicrobiana.
- Realizar estudios con diferentes extractos: cetónico, acuoso, oleoso.
- Evaluar el posible efecto antimicótico y antiparasitario del *Eleutherine bulbosa*.
- Evaluar la acción sinérgica con los antimicrobianos.
- Realizar estudios con modelos biológicos, a fin de tener mejor conocimiento sobre su acción en seres vivos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Carmona E, Sandoval S, García C. Frecuencia y susceptibilidad antibiótica del staphylococcus aureus proveniente de hisopados nasales en una población urbano marginal de Lima, Perú. Rev. perú. med. exp. salud publica. 2012 Junio; 29(2): 206-211 [citado: 19/07/2019]. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S172646342012000200006&script=sci_abstract
2. Hernández W, Padrón J, Pérez A, González J, Riesgo L, Barrabí I, et al. Staphylococcus aureus resistente a meticilina. Rev Cub Med Trop. 2018 Agosto; 70(2): 1-9. [citado: 19/07/2019]. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S037507602018000200011&lng=es&nrm=iso
3. Guillén R, Carpinelli L, Rodríguez F, Castro H, Quiñonez B, Campuzano A, et al. Staphylococcus aureus adquiridos en la comunidad: caracterización clínica, fenotípica y genotípica de aislados en niños paraguayos. Rev Chilena Infectol. 2016 Diciembre; 33(6): 609-618. [citado: 19/07/2019]. Disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v33n6/art02.pdf>
4. Portillo ME, Del Pozo JL. Infecciones por estafilococo. Medicine- Programa de Formación Médica Continuada Acreditado. 2018 Febrero; 12(49): 2890-2894. [citado: 19/07/2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304541218300210>
5. García C. Resistencia antibiótica en el Perú y América Latina. Acta méd. peruana. 2012 Abril; 29(2): 99-103. [citado: 31/07/19]. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S172859172012000200010
6. Tamariz J, Agapito J, Horna G, Tapia E, Vicente W, Silva M, et al. Staphylococcus aureus resistente a meticilina adquirido en la comunidad aislados en tres hospitales de Lima-Perú. Rev Med Hered. 2010 Enero; 21(1): 4-10. [citado: 19/07/2019]. Disponible en:

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018130X20100010100002

7. Vega M. Etnobotánica de la Amazonía Peruana. 1ra ed. Quito: Abya Yala; 2001. [citado: 19/07/2019]. Disponible en: https://digitalrepository.unm.edu/cgi/viewcontent.cgi?referer=https://www.google.com/&httpsredir=1&article=1306&context=abya_yala
8. Salaverry O, Cabrera J. Florística de algunas plantas medicinales. Rev. perú. med. exp. salud pública, 2014 enero-diciembre; 31(1): 165-168. (citado: 19/07/2019). Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726463420140010100025#fig05
9. Florián A, Rengifo C, Arévalo F. Análisis Fitoquímico y relación farmacológica de Eleutherine bulbosa. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina, Química. 2012. [citado: 31/07/2019]. Disponible en: http://www.lamolina.edu.pe/facultad/ciencias/dquimica/pergreenchemistry/?wpfb_dl=2
- 10 Shi P, Du W, Wang Y, Teng X, Chen X, Ye L. Total phenolic, flavonoid content, and antioxidant activity of bulbs, leaves, and flowers made from Eleutherine bulbosa (Mill.) Urb. Food Sci Nutr. 2019 Enero; 7(1): 148-154. [citado: 31/07/19]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6341144/>
- 11 Novaryatin S, Ardhan SD. Potential Anti-acne: Bawang Dayak (Eleutherine bulbosa (Mill.) Urb.) from Central Kalimantan-Indonesia. Pharmacog J. 2020 Febrero; 12(1). 52-57. [citado: 06/04/20]. Disponible en: https://www.phcogj.com/sites/default/files/PJ-12-1-277_0.pdf
- 12 Novaryatiin S, Ramli A, Ardhan SD. Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Bawang Dayak (Eleutherine bulbosa (Mill.) Urb.) terhadap Bakteri Staphylococcus aureus. JSM. 2019 Febrero; 4(2): 51-59. [citado: 31/07/2019]. Disponible en: <http://journal.umpalangkaraya.ac.id/index.php/jsm/article/view/565>
- 13 Novaryatiin S, Pratiwi A, Ardhan SD. Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Bawang Dayak (Eleutherine bulbosa(Mill.) Urb.) terhadap Bakteri Staphylococcus

- epidermidis. Anterior Jurnal. 2018 Diciembre; 18(1): 92-97. [citado: 31/07/19]
Disponible en: <http://journal.umpalangkaraya.ac.id/index.php/anterior/article/view/392>
- 14 Rani V. Evaluation of antibacterial effect of a noval compound isolated from *Eleutherine bulbosa* (Miller) urban. WJPR. 2018 Febrero. 7(6): 550-555. [citado: 31/07/2019]. Disponible en: https://wjpr.net/dashboard/abstract_id/9502
- 15 Kumar S, Kishore Y, Padhi L, Park YH, Kumar T, Bae H. Large Scale Screening of Ethnomedicinal Plants for Identification of Potential Antibacterial Compounds. *Molecules*. 2016 Marzo; 21(3): 293. [citado: 31/07/2019]. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/21/3/293>
- 16 Laxmipriya P, Kumar S. Antibacterial activity of *Eleutherine bulbosa* against multidrug-resistant bacteria. *JACME*. 2015 Septiembre; 5(3): 53-61. [citado: 31/07/2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211558715000539>
- 17 Pérez J. Efecto antibacteriano In Vitro de *Eleutherine bulbosa* frente a *Escherichia coli* aislada de urocultivo. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2016. [citado: 01/08/2019]. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/1196>
- 18 Costa I, Mejía E, Alvarado O. Efecto antibacteriano in vitro del *Eleutherine bulbosa* (Yahuar piri piri) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668. *Pueblo cont*. 2016 Julio-Diciembre; 27(2): 343-350. [citado: 01/08/2019]. Disponible en: <http://journal.upao.edu.pe/PuebloContinente/article/viewFile/688/638>
- 19 Murray PR Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. *Microbiología médica*. 7th ed. Barcelona: Elsevier; 2013. [citado: 05/08/2019].
- 20 Ahmad N, Lawrence w, Plorde J. *Sherris Microbiología Médica*. 5th ed. México: Mc Graw Hill; 2011. [citado: 07/08/2019].
- 21 Cervantes E, García R, Salazar P. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*. 2014 Enero-Febrero; 61(1): 28-40. [citado: 07/08/2019]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>

- 22 MINSA. Dirección de acceso y uso de medicamentos. Equipo de uso racional de medicamentos. Técnico. Lima: DIGEMID, Lima. 2006. Report No: 29. [citado: 09/08/2019]. Disponible en: http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad%5CUpLoaded%5CPDF/29-06_Oxacilina.pdf
- 23 Lorenzo P, Moreno A, Leza JC, Moro MA, Portolés A. Velázquez: Farmacología básica y clínica. 18th ed. Buenos Aires: Editorial Panamericana; 2008. [citado: 09/08/2019].
- 24 Aristil P. Manual de farmacología básica y clínica. 6th ed. México: Mc Graw Hill; 2013. [citado: 09/08/2019].
- 25 Pinedo M, Rengifo E, Cerruti T. Plantas medicinales de la Amazonía Peruana estudio de su uso y cultivo. 1ra ed. Iquitos: IIAP; 1997. [citado: 10/08/2019]. Disponible en: https://www.academia.edu/16078545/plantas_medicinales_dde_la_amazonia_peruana
- 26 Rengifo E. Las Ramas Floridas del Bosque, experiencias en el manejo de plantas medicinales amazónicas. 1ra ed. Iquitos: IIAP; 2007. [citado: 11/08/2019]. Disponible en: http://repositorio.iiap.org.pe/bitstream/IIAP/147/2/Rengifo_libro_2007.pdf
- 27 Venket R. Phytochemicals: Isolation, characterization and role in human health. Croatia: IntechOpen; 2015. [citado: 11/08/2019].
- 28 Leyva E, Loredó S, López L, Escobedo E, Navarro G. Importancia química y biológica de naftoquinonas. RACO. 2017 enero-marzo; 74(577): 36-50. [citado: 10/08/2019]. Disponible en: <https://www.raco.cat/index.php/afinidad/article/view/320755/411246>
- 29 López L, Leyva E, García R. Las naftoquinonas: más que pigmentos naturales. RMCF. 2011 enero-marzo; 42(1): 6-17. [citado: 10/08/2019]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/579/57918590002.pdf>
- 30 Sampieri H, Fernández C, Baptista P. Metodología de la investigación. 6th ed. México D.F: McGraw Hill; 2016. [citado:09/10/19]

- 31 Corso A. CLSI. INEI. 2009. [citado: 17/08/2019]. Disponible en: http://antimicrobianos.com.ar/category/novedad_clsi/
- 32 García J, Reding A, López J. Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. Elsevier, 2013 Agosto; 2(8): 217-224. [citado: 5/09/2019]. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=349733226007>
- 33 Wayne D. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4ta. Edición. México: Limusa; 2006. [citado: 05/09/2019].
- 34 García J, González J, Orta N, Sánchez M. Procedimientos en Microbiología Clínica: Recogida, transporte y procesamiento general de las muestras en el laboratorio clínico. Madrid: SEIMC; 2017. [citado: 05/10/2019]. Disponible en: <https://seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia1b.pdf>
- 35 Organización Mundial de la Salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3rd ed. Ginebra: OMS; 2005. [citado: 05/10/2019]. Disponible en: https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf
- 36 Colegio Médico del Perú. Código de Ética y Deontología. Lima: CMP; 2007. [citado: 06/08/2019].
- 37 Ley forestal y de fauna silvestre. Publicado en el diario oficial El Peruano, Ley n.º 29763, (22 de julio, 2011). [citado: 06/08/2019]. Disponible en: <http://www.leyes.congreso.gob.pe/Documentos/Leyes/29763.pdf>
- 38 Paredes F, Roca J. Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana. Elsevier. 2004 Marzo; 23(3): 116-124. [citado: 16/08/2019]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-accion-los-antibioticos-perspectiva-medicacion-13059414>
- 39 Calvo J, Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. FMC. 2009 Enero; 27(1): 44-52. [citado: 17/08/2019]. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia->

clinica-28-articulo-mecanismos-accion-los-antimicrobianos-
S0213005X08000177

- 40 Ministerio de Salud. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. Lima: Ministerio de salud. Instituto nacional del Perú; 2002. [citado: 08/10/2019]. Disponible en: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%2002.pdf>

ANEXO 01

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

RG1	X1	O1
RG2	X2	O2
RG3	X3	O3
RG4	X4	O4
RG5	X5	O5
RG6	X6	O6

Estableciendo:

RG1-6: Grupos en estudio.

X1: Extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa* al 100%

X2: Extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa* al 75%

X3: Extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa* al 50%

X4: Extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa* al 25%

X5: tratamiento con Oxacilina 1µg

X6: Control negativo DMSO (Dimetil Sulfoxido)

O1-6: Observaciones del halo inhibitorio.

ANEXO 02

MATRIZ DE OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN		INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
	CONCEPTUAL	OPERACIONAL		
<p>Variable Independiente:</p> <p style="text-align: center;">Agente antibacteriano para las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p>	<p>Sustancia obtenida de forma biosintética, natural, o completamente obtenida en laboratorio que cumplen como mínimo con 3 condiciones: tener actividad antimicrobiana, efecto a bajas concentraciones y ser tolerado por el huésped.³⁸</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Agente antibacteriano no farmacológico: <i>Eleutherine bulbosa</i> ● Agente antibacteriano farmacológico: Oxacilina 	<p>Se formarán grupos:</p> <p>Extracto alcohólico de <i>Eleutherine bulbosa</i> dividido en las diluciones</p> <p>a) 100% b) 75% c) 50% d) 25% f) Oxacilina 1 µg e) DMSO (Dimetil Sulfóxido)</p>	<p>RG1 RG2 RG3 RG4 RG5 RG6</p>	<p>Cualitativa nominal</p>
<p>Variable dependiente:</p> <p style="text-align: center;">Efecto antibacteriano (bactericida)</p>	<p>Resultados de la sustancia que posee propiedades con capacidad de eliminar agentes microbianos, bactericidas; o producir la inhibición de su crecimiento o proliferación, bacteriostático, sin producir daño en el organismo que las porta.³⁹</p> <p style="text-align: center;">Se medirá el halo inhibitorio mediante la técnica de Kirby Bauer.</p>	<p>Según la CLSI se considerará.³¹</p> <p>Sensible: ≥ 13mm Intermedio: 11-12 mm Resistente: ≤ 10mm</p>	<p>Con eficacia antibacteriana ≥ 13 mm</p> <p>Sin eficacia antibacteriana < 13 mm</p>	<p>Cualitativa nominal</p>

ANEXO 03

TAMAÑO DE MUESTRA

Fórmula

Se utilizó la fórmula para comparación de dos medias:

$$n = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2\sigma^2}{(X_1 - X_2)^2}$$

Dónde:

$Z_{\alpha/2}$: 1,96. Para un intervalo de confianza del 95%.³²

Z_{β} : 0,842.³²

X_1 : 13 mm. Halo inhibitorio de Oxacilina.³¹

X_2 : 16.2 mm. Halo inhibitorio del extracto alcohólico del *E. bulbosa*.¹²

σ : 2 mm.¹²

$$n = 6.13375$$

Para este estudio se obtuvo 6 repeticiones por grupo sin embargo se consideró realizar 10 repeticiones por grupo.

ANEXO 04

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA MEDIR EL DIÁMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm) SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*

PATÓGENO <i>Staphylococcus aureus</i>	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO DE <i>Eleutherine bulbosa</i> "Yahuar piri-piri"				CONTROL POSITIVO	CONTROL NEGATIVO
	100%	75%	50%	25%	OXACILINA 1 µg	DSMO
	Diámetro del halo de inhibición (mm)					
PLACA 1	23	21	13	10	35	0
PLACA 2	24	21	12	12	38	0
PLACA 3	23	21	14	12	36	0
PLACA 4	22	20	11	11	36	0
PLACA 5	23	21	12	13	36	0
PLACA 6	23	19	15	09	37	0
PLACA 7	21	19	12	14	36	0
PLACA 8	22	17	12	11	34	0
PLACA 9	25	21	13	12	36	0
PLACA 10	22	20	13	12	36	0
Promedio del diámetro del halo de inhibición	22.80	20	12.70	11.60	36	0

ANEXO 05

FICHA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO



ANEXO Nº 02

FICHA DE EVALUACIÓN INSTRUMENTO POR EXPERTO

ÍTEM	CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LA VALIDEZ				CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS ESPECÍFICOS							
	CONTENIDO <i>(Se refiere al grado en que el instrumento refleja el contenido de la variable que se pretende medir)</i>		CONSTRUCTO <i>(Hasta donde el instrumento mide realmente la variable, y con cuanta eficacia lo hace)</i>		RELEVANCIA <i>(El ítem es esencial o importante, es decir, debe ser incluido)</i>		COHERENCIA INTERNA <i>(El ítem tiene relación lógica con la dimensión o el indicador que está midiendo)</i>		CLARIDAD <i>(El ítem se comprende fácilmente, es decir, sus sintácticas y semánticas son adecuadas)</i>		SUFICIENCIA <i>(Los ítems que pertenecen a una misma dimensión bastan para obtener la dimensión de esta)</i>	
	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	
4												
5												

CRITERIOS DE EVALUACIÓN DE LOS ASPECTOS GENERALES		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 sugiera los ítems a añadir		X		
VALIDEZ				
APLICABLE	<input checked="" type="checkbox"/>	NO APLICABLE	<input type="checkbox"/>	APLICABLE TENIENDO EN CUENTA OBSERVACIÓN

Validado por:

Fecha


 José Luis Fernández Sesayo
 MÉDICO CIRUJANO


 MIRIAM ESTEFANÍA MOROTE NAVARRO
 MÉDICO CIRUJANO
 C. M. P. 087566


 Jaime A. Polo Gamboa
 MICROBIOLOGO
 C.B.P. 8951

ANEXO 06

PROCEDIMIENTO

1. Se efectuó la autenticación de la planta en el laboratorio del Herbarium Amazonense del CIRNA, de la Universidad Nacional de la Amazonía Peruana.



Centro de Investigación de
Recursos Naturales
Herbarium Amazonense - AMAZ

INSTITUCION CIENTIFICA NACIONAL DEPOSITARIA DE MATERIAL BIOLÓGICO
CODIGO DE AUTORTIZACION AUT-ICND-2017-005

CONSTANCIA

El coordinador del Herbarium Amazonense (AMAZ) del CIRNA, de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana

HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentado por **Deborah Esther Rivas Navarro**, Escuela Profesional de Medicina, de la Facultad de Ciencias de la Salud, de la Universidad Cesar Vallejo, pertenece a la tesis titulado: **Eficacia Antibacteriana del Extracto Alcohólico de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. Sobre *Staphylococcus aureus* Comparado con Isoxazolil penicilina *in vitro***; fue verificado y determinado en este Herbarium Amazonense (AMAZ), del Centro de Investigación de Recursos Naturales (CIRNA), de la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana (UNAP), como a continuación se indica:

Cód. AMAZ	Nombre científico	Familia	Nombre vulgar
37527	<i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb.	Iridaceae	"yahuar piri-piri"

Se expide la presente constancia a la interesada, para los fines que estime conveniente.

Atentamente,

Iquitos, 01 de octubre, 2020



Blgo. Richard J. Huaranca Acosta
Coordinador de Herbarium AMAZ
CIRNA-UNAP

2. La sustracción del extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa* se utilizó alcohol etílico de 96° para la maceración.

A. Tratamiento de la muestra

Los bulbos de *Eleutherine bulbosa* “Yahuar piri-piri” se obtuvieron en la ciudad de Iquitos, departamento de Loreto, en una cantidad de 2 Kg y fueron llevadas al laboratorio “san José” de Trujillo, donde se seleccionaron los ejemplares con las mejores condiciones. Los bulbos se



lavaron con agua clorada y se enjuagaron con agua destilada, se colocaron sobre papel absorbente hasta quitarles los residuos de agua. Luego, se cortó en trozos pequeños, se colocó en una bandeja de cartulina y se llevó al horno a deshidratar por convección a 45°C por 72 horas. Después, se trituroó en un mortero hasta obtener partículas muy pequeñas y se reservó almacenándolo herméticamente en recipiente oscuro.

B. Obtención del extracto alcohólico

El extracto alcohólico de *Eleutherine bulbosa* se obtuvo por el método de maceración en etanol de 96°; para ello, se colocó en un frasco de vidrio 20 g de la muestra deshidratada y triturada y 200 ml de etanol, se tapó el frasco herméticamente y se envolvió totalmente



con papel aluminio. Luego, se llevó al horno a 45°C por 8 días con agitación de 4 veces diarias. Después, se hizo una doble filtración; primero se filtró a través de una gasa estéril y segundo a través de papel filtro Whatman N°41. Se midió 100 ml del filtrado y se evaporó por convección en estufa a 45°C, hasta que quedó 20 ml de filtrado. De este modo, se obtuvo el extracto etanólico (EE) considerado al 100%; el cual, se reservó en un frasco de vidrio ámbar a 6°C hasta su utilización.



3. La sensibilidad antibacteriana se determinó a través del método de disco difusión Kirby-Bauer⁴⁰. Para ello, se consideraron los criterios establecidos en el Clinical and Laboratory Standards Institute- CLSI 2009 de los Estados Unidos. Se tomó en cuenta los estándares M02 y M100. Como medio de cultivo bacteriano se empleó Agar Müller- Hinton. Se preparó 250 ml de este medio para las 10 placas Petri. Este medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. Después, fue servida en Placas Petri estériles de plástico desechables, alrededor de 18-20 ml por cada placa, y se dejó en reposo hasta que se solidificó por completo.

a) Preparación del inóculo

Se preparó el inóculo colocando en un tubo de ensayo estéril 3 ml de Cloruro de sodio al 0.9%, al cual se le agregó una alícuota del *Staphylococcus aureus*, que fue cultivado 24 horas antes, de tal modo que se observó una turbidez que fue equivalente al tubo 0,5 en la escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/ml).



b) Siembra del microorganismo

El microorganismo *Staphylococcus aureus* fue sembrado, deslizando un hisopo estéril embebido con el inóculo, sobre toda la superficie del medio de cultivo en todas las Placas Petri (siembra por estrías en superficie); de tal modo, que el microorganismo quedó sobre toda la superficie de la placa como una capa.



c) Preparación de las concentraciones del EA

A partir del EA al 100%, se prepararon 3 concentraciones (75%, 50% y 25%) utilizando Dimetil Sulfóxido (DMSO) como solvente; para ello, se rotularon 3 tubos de ensayo estériles de 13x100mm con las 4 concentraciones y se colocaron 750 μ L de EA y 250 μ L de DMSO al tubo de 75%, 500 μ L de EA y 500 μ L de DMSO al tubo de 50%, y 250 μ L de EA y 750 μ L de DMSO al tubo de 25%.



d) Preparación de los discos de sensibilidad con EA

A partir de cada una de las concentraciones, se colocaron 10 μ L en cada disco de papel filtro Whatman N° 1 de 6mm de diámetro, previamente esterilizados. Se tomaron 10 μ L de EA al 25% y se colocaron en un disco, 10 μ L de EA al 50% en otro disco, 10 μ L de EA al 75% en otro disco y 10 μ L de EA al 100% en otro disco. Esto se repitió 10 veces.



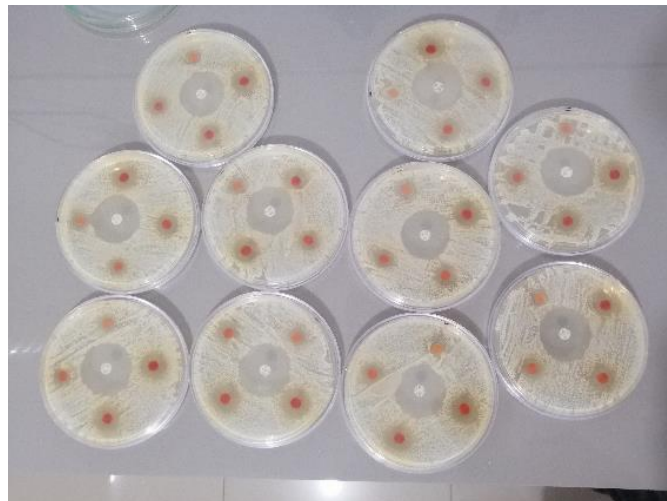
e) Confrontación del microorganismo con el agente antimicrobiano

Se tomaron los discos de sensibilidad preparados, uno de cada concentración con EA con la ayuda de una pinza metálica estéril, y se colocaron en la superficie

del agar sembrado con el patógeno *Staphylococcus aureus*, de tal modo que quedaron los discos (uno de cada concentración) de forma equidistante, a 1 cm del borde de la Placa Petri. Adicionalmente, se colocó el disco con Oxacilina 1µg (control positivo). Se dejaron en reposo por 15 min y posteriormente las placas se incubaron de forma invertida en la estufa a 37°C por 24 horas.

f) Lectura e interpretación

La lectura se realizó observando y midiendo el diámetro de la zona de inhibición de crecimiento microbiano con una regla Vernier. Esta medición se realizó para cada una de las concentraciones de EA de *Eleutherine bulbosa* y para la Oxacilina. Se interpretó como sensible o resistente, según lo establecido en CLSI.



ANEXO 07

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Pruebas de homogeneidad de varianzas

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Se basa en la media	0.548	4	45	0.702
Se basa en la mediana	0.361	4	45	0.835
Se basa en la mediana y con gl ajustado	0.361	4	41.534	0.835
Se basa en la media recortada	0.540	4	45	0.707

Pruebas de normalidad

CONCENTRACIONES	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
OXACILINA	0.300	10	0.011	0.872	10	0.105
25	0.210	10	,200*	0.955	10	0.732
50	0.227	10	0.155	0.916	10	0.328
75	0.273	10	0.033	0.785	10	0.010
100	0.230	10	0.143	0.933	10	0.479

Comparaciones múltiples

Variable dependiente:

HSD Tukey

CONCENTRACIONES		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
OXACILINA	25	24,400*	0.550	0.000	22.84	25.96
	50	23,300*	0.550	0.000	21.74	24.86
	75	16,000*	0.550	0.000	14.44	17.56
	100	13,200*	0.550	0.000	11.64	14.76
25	OXACILINA	-24,400*	0.550	0.000	-25.96	-22.84
	50	-1.100	0.550	0.283	-2.66	0.46
	75	-8,400*	0.550	0.000	-9.96	-6.84
	100	-11,200*	0.550	0.000	-12.76	-9.64
50	OXACILINA	-23,300*	0.550	0.000	-24.86	-21.74
	25	1.100	0.550	0.283	-0.46	2.66
	75	-7,300*	0.550	0.000	-8.86	-5.74
	100	-10,100*	0.550	0.000	-11.66	-8.54
75	OXACILINA	-16,000*	0.550	0.000	-17.56	-14.44
	25	8,400*	0.550	0.000	6.84	9.96
	50	7,300*	0.550	0.000	5.74	8.86
	100	-2,800*	0.550	0.000	-4.36	-1.24
100	OXACILINA	-13,200*	0.550	0.000	-14.76	-11.64
	25	11,200*	0.550	0.000	9.64	12.76
	50	10,100*	0.550	0.000	8.54	11.66
	75	2,800*	0.550	0.000	1.24	4.36

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

ANEXO 08

Protección personal

1. En todo momento el personal de laboratorio deberá portar monos, batas o uniformes especiales.
2. Para los procedimientos que involucren o puedan entrañar el contacto directo o accidental con líquidos corporales, sangre, animales infectados o materiales con potencial infeccioso se deberá usar obligatoriamente guantes protectores apropiados, que una vez terminado el procedimiento se deberán retirar de forma aséptica y a continuación se llevará el lavado de manos.
3. Después de la manipulación de animales o materiales infecciosos el personal deberá lavarse las manos. así como antes de abandonar las zonas de trabajo del laboratorio.
4. Cuando sea necesario la protección de los ojos, rostros de impactos, salpicaduras y fuentes de radiación artificial se usarán gafas de seguridad, viseras u otros dispositivos de protección.
5. Estará prohibido el uso de las prendas protectoras fuera del laboratorio.
6. No se usará calzado sin puntera.
7. Estará prohibido actos como fumar, comer, beber, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto en las zonas de trabajo
8. Estará prohibido el almacenamiento de bebidas o alimentos para consumo humano en las zonas de trabajo del laboratorio.
9. La ropa protectora de laboratorio se guardará en otros armarios o taquillas que la ropa de calle.

ANEXO 09

Art. 48: “El médico debe presentar la información proveniente de una investigación médica, para su publicación, independientemente de los resultados, sin incurrir en falsificación ni plagio y declarando si tiene o no conflicto de interés”.

ANEXO 10

LEY FORESTAL Y DE FAUNA SILVESTRE

LEY N° 29763

Artículo 4. Patrimonio forestal y de fauna silvestre de la Nación ³⁶

El patrimonio forestal y de fauna silvestre de la Nación está constituido por lo siguiente:

- a. Los ecosistemas forestales y otros ecosistemas de vegetación silvestre.
- b. Los recursos forestales y de fauna silvestre mantenidos en su fuente.
- c. La diversidad biológica forestal y de fauna silvestre, incluyendo sus recursos genéticos asociados.
- d. Los bosques plantados en tierras del Estado.
- e. Los servicios de los ecosistemas forestales y otros ecosistemas de vegetación silvestre.
- f. Las tierras de capacidad de uso mayor forestal y tierras de capacidad de uso mayor para protección, con bosques o sin ellos.
- g. Los paisajes de los ecosistemas forestales y otros ecosistemas de vegetación silvestre en tanto sean objeto de aprovechamiento económico.

Las plantaciones forestales en predios privados y comunales y sus productos se consideran recursos forestales pero no son parte del patrimonio forestal y de fauna silvestre de la Nación.



CONSTANCIA DE ASESORÍA DE PROYECTO DE TESIS

El que suscribe, Polo Gamboa, Jaime Abelardo docente de la Escuela Profesional de Medicina de la Facultad de Ciencias Médicas.

Hace CONSTAR

Que, de conformidad con el Reglamento para elaboración y evaluación de Proyectos de Tesis, el(la) estudiante Rivas Navarro, Deborah Esther de esta Superior Casa de Estudios, viene trabajando bajo mi asesoramiento el Proyecto de Tesis titulado:

Eficacia antibacteriana del extracto alcohólico de Eleutherine
Bulbosa sobre Staphylococcus Aureus comparado con
Isosaxazilpenicilina In vitro

que será presentado para optar el Título Profesional de Médico Cirujano.

En tal virtud, asumo el asesoramiento del Proyecto mencionado en calidad de ASESOR ESPECIALISTA, tarea voluntaria y de cooperación académica con la Escuela de Medicina.

Expedido el presente a solicitud de la parte interesada sólo para fines académicos que estime conveniente.

Dado en la ciudad de Trujillo a los 08 días del mes de Mayo del año 2020.


Jaime A. Polo Gamboa
MICROBIÓLOGO
CBP 6951

CONSTANCIA DE EJECUCIÓN DE PROYECTO

El Laboratorio "San José" deja constancia que ha cedido *ad honorem* sus instalaciones, en donde DEBORAH ESTHER RIVAS NAVARRO, estudiante de Medicina de la Universidad César Vallejo de Trujillo, ejecutó la parte experimental de su proyecto de tesis titulado "Eficacia antibacteriana del extracto alcohólico de *Eleutheria bulbosa* sobre *Staphylococcus aureus* comparado con isoxazolil penicilina *in vitro*", durante los días 01 al 05 de octubre 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 27 días del mes de octubre de 2020.


Jaime Abelardo Polo Gamboa
Microbiólogo
C.R.P. 8561