



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA

Efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (neem)
sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

MÉDICO CIRUJANO

AUTORA:

Vílchez Carrasco, Ana María Del Jesús (ORCID: 0000-0002-8011-9196)

ASESOR:

Mg. Blgo. Ronald Alexander Vilchez Sanchez (ORCID: 0000-0002-8650-5186)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Enfermedades Infecciosas y Transmisibles

PIURA – PERÚ

2021

DEDICATORIA

A Dios, quien me ha permitido estar presente en esta etapa de mi vida, por ser mi fuerza y soporte.

A mis padres; Manuel y Marleny que siempre me han apoyado incondicionalmente y me han acompañado en cada paso.

A mis bellos tesoros Mariana Naela y bebé, quienes llegaron en el momento justo para alegrarme la vida, los cuales se convirtieron en mi motor y motivo para seguir adelante ¡Los Amo!

A mi compañero de vida; Edson quien a pesar de las dificultades siguió alentándome hasta el final, demostrándome su apoyo y amor incondicional. ¡Te amo amorcito mío!

AGRADECIMIENTO

A mis asesores, que me han ayudado en la realización de este actual trabajo de investigación

A todos mis docentes de la Escuela de quienes aprendí mucho, que supieron contribuir no solo en mi formación académica sino humanística.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

| | |
|--|-----|
| DEDICATORIA..... | ii |
| AGRADECIMIENTO..... | iii |
| RESUMEN..... | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| 2. MARCO TEÓRICO | 5 |
| 3. METODOLOGÍA..... | 12 |
| 3.1 Tipo y diseño de investigación | 12 |
| 3.2. Variables y operacionalización: (Anexo 1) | 12 |
| 3.3. Población, muestra y muestreo..... | 13 |
| 3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos:..... | 13 |
| 3.5. Procedimiento | 14 |
| 3.6. Métodos de análisis de datos..... | 14 |
| 3.7. Aspectos éticos | 15 |
| 4. RESULTADOS | 16 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 19 |
| 6. CONCLUSIONES | 22 |
| 7. RECOMENDACIONES..... | 23 |
| REFERENCIAS:..... | 24 |
| ANEXOS | 30 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1 Comparación del efecto antibacteriano in vitro de las concentraciones de 250 µg/mL, 500 µg/mL y 750 µg/mL del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> A. juss (neem) con el control positivo vancomicina a la concentración de 30 µg/mL sobre <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente ATCC 43300. | 17 |
| Tabla 2 Eficacia antibacteriana de vancomicina a la concentración de 30 µg/mL sobre <i>Staphylococcus aureus</i> meticilino resistente ATCC 43300. | 18 |
| Tabla 3. Matriz de operacionalización de variables | 30 |
| Tabla 4. Ficha de Recolección de Datos | 35 |
| Tabla 5 Efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> A. juss comparado con vancomicina a concentración de 30 µg, en un estudio in vitro.... | 39 |
| Tabla 6 Efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> A. juss comparado con vancomicina a concentración de 30 µg, en un estudio in vitro.... | 39 |
| Tabla 7 Efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> A. juss comparado con vancomicina a concentración de 30 µg, en un estudio in vitro.... | 40 |
| Tabla 8 Efecto antibacteriano del extracto etanólico de <i>Azadirachta indica</i> A. juss comparado con vancomicina a concentración de 30 µg, en un estudio in vitro.... | 40 |

Índice de gráficos y figuras

Figura 1 Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. juss “Neem” sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300..
----- 16

Gráfico 1 Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. juss comparado con vancomicina a concentración de 30 µg, en un estudio in vitro.... 41

RESUMEN

Objetivo: Indicar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. juss "Neem" contra *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300.

Material y métodos: estudio cuantitativo, diseño experimental de estímulo creciente. Se utilizaron tres concentraciones de volumen del extracto, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, vancomicina 30 µg (control positivo) y suero fisiológico (control negativo). Para evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico se utilizó la técnica Kirby Bauer mediante el diámetro de halo de inhibición.

Resultados: Se ha determinado que el extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. juss "Neem" obtuvo halos de inhibición de 13,13 mm, 15,65 mm y 19,76 mm para cada concentración, respectivamente; y de 15,06 mm para vancomicina.

Conclusión: Se concluyó que el extracto etanólico foliar de *Azadirachta indica* A. juss "Neem" mostró actividad antibacteriana. A una concentración de 500 µg/ml.

Palabras clave: Efecto antimicrobiano, *Azadirachta indica* A. juss, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, vancomicina.

Abstract

Objective: To indicate the in vitro antibacterial effect of the ethanolic extract of *Azadirachta indica* A. juss "Neem" against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* ATCC 43300.

Material and methods: quantitative study, experimental design of increasing stimulus. Three volume concentrations of the extract were used: 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 30 µg vancomycin (positive control) and physiological saline (negative control). To evaluate the antibacterial effect of the ethanolic extract, the Kirby Bauer technique was used through the diameter of the inhibition halo.

Results: It has been determined that the ethanolic extract of *Azadirachta indica* A. juss "Neem" obtained inhibition halos of 13.13 mm, 15.65 mm and 19.76 mm for each concentration, respectively; and 15.06 mm for vancomycin.

Conclusion: It was concluded that the foliar ethanolic extract of *Azadirachta indica* A. juss "Neem" showed antibacterial activity. At a concentration of 500 µg/ml.

Keywords: Antibacterial Effect , *Azadirachta indica* A. juss, Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*, vancomycin

1. INTRODUCCIÓN

La OMS (Organización Mundial de la Salud) indica que alrededor del 80% de habitantes (es decir, un poco más de 4 mil millones de personas) usa plantas como principal sustituto de la medicina para satisfacer sus necesidades de salud.¹

Hoy en día el uso de medicamentos a base de hierbas y antimicrobianos es muy importante en la cura de diversas afecciones. Se han publicado diversos estudios en distintos países para ilustrar este efecto. Según la OMS, los remedios a base de hierbas son la mejor fuente de diversos medicamentos que se pueden producir industrialmente.²

La presente investigación se centra en dos áreas muy importantes. Primeramente, en el estudio de alternativas que se encuentran en la naturaleza como son los productos vegetales o sustancias relacionadas que tengan la capacidad para eliminar o controlar microorganismos. Perú es conocido mundialmente por su diversidad natural única, especialmente plantas. Las cuales en su gran mayoría se ha determinado en estudios previos que tienen propiedades beneficiosas al ser utilizadas por los residentes peruanos a lo largo de la historia. Las hierbas se consideran medicinales porque pueden aliviar los síntomas y, en algunos casos, curar enfermedades.

La utilización de vegetales como *Azadirachta indica* conocida como Neem para eliminar a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, que es la principal causa de infecciones graves en hospitales y comunidades que causan una variedad de enfermedades, desde enfermedades de la piel hasta tejidos blandos y osteoarticulares; como abscesos profundos, celulitis, heridas quirúrgicas, osteomielitis. Estas enfermedades pueden agravarse sin un tratamiento adecuado y oportuno pudiendo poner en peligro la vida de las víctimas.

Ante el problema descrito, surge la siguiente pregunta: ¿Cuál es el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (neem) contra *Staphylococcus aureus* meticilino resistente?

Se plantea como objetivo general: Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *Azadirachta indica* "Neem" contra *Staphylococcus aureus*

meticilino resistente ATCC 43300. Asimismo, se plantearon dos objetivos específicos:

1. Comparar el efecto antibacteriano *in vitro* de las concentraciones 250 µg/mL, 500 µg/mL y 750 µg/mL del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. juss (neem) con el control positivo vancomicina a la concentración de 30 µg sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300.
2. Medir la eficacia antibacteriana de vancomicina a la concentración de 30 µg contra *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300.

2. MARCO TEÓRICO

Los medicamentos y las plantas medicinales se han utilizado durante mucho tiempo, desde el papiro egipcio de Ebers, babilonios asirios, etruscos y romanos hasta Pietro Andri Pietro Andrea Mattioli 500 AC, ³. Puesto que la fitoterapia fue el fundamental y único recurso disponible para los médicos, el cual condujo al entendimiento y empleo de diversas ramas de la medicina.⁴

Hay evidencias que detallan que los conocimientos culturales se han transmitido desde nuestros ancestros y explican los efectos beneficiosos de las propiedades de *Azadirachta indica A. juss* (neem), que se ha establecido como alternativa médica. En la antigüedad, los chamanes hindúes develaron los atributos del Neem y su empleo se ha registrado durante 4000 años. Se sabe que el Neem se ha utilizado para muchos fines de salud, incluido el tratamiento y curación de muchas dolencias.⁵

Existen muchas plantas medicinales en nuestro país., de las cuales una de ellas es el *Azadirachta indica A. juss* (Neem) que se encuentra en gran cantidad en nuestro territorio peruano, la cual no siendo originaria de nuestra región se adaptado muy bien a nuestros suelos⁶.

La Región de Piura alberga una amplia variedad de plantas que se cree que tienen propiedades medicinales que se utilizan para tratar eficazmente diferentes afecciones humanas. Una de las fuentes principales es *Azadirachta indica A. juss* (Neem). Un árbol grande, frondoso con hoja perenne y de rápido crecimiento; aunque relativamente inofensiva, es una planta silvestre bien adaptada que se encuentra en áreas urbanas debido a su falta de necesidades especiales de desarrollo.⁷

Gualtieri y colaboradores, en Caracas en el 2004 evaluaron el efecto antimicrobiano de los extractos acuosos, etanólicos y cetónicos de las hojas sobre: *E. coli* enteroinvasiva y *E. coli* enterotóxica, *S. aureus* ATCC 25923, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *C. krusei* ATCC 6258 y *C. albicans* ATCC 90028. Los resultados de este estudio mostraron que en 0.02 g / ml de concentración se evidencio el efecto antibacteriano y anti fúngico en diferentes organismos. El extracto etanolico y cetónico mostro actividad antibacteriana sobre *E. coli* intestinal y *E. coli*. enterotoxina, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 y *Candida crusei* ATCC 6258. Mientras que los extractos acuosos no mostraron actividad en ninguna de las cepas aplicadas.⁸

Mustafa M. en Arabia Saudita, 2016 evaluó la eficacia in vitro de *Azadirachta indica* (Neem) sobre *Enterococcus faecalis*. Ensayo de difusión de agar también se utilizó para estudiar el efecto antibacteriano del uso de sales como controles. En un estudio comparativo, hubo una gran desigualdad entre el diámetro del dominio de clorhexidina, excluidas las hojas de Neem, y el hipoclorito de sodio al 3% de *E. faecalis* ($p < 0.05$). Se concluyó que la remoción de las hojas del árbol de Neem presentó una zona de supresión similar a la de la clorhexidina y el hipoclorito de sodio.⁹

Sánchez y colaboradores, México 2016 realizaron una investigación antibacteriana y antifúngica de extracto hidrohidoetanol de plantas en ensayos clínicos. El proceso de investigación es experimental. Se han utilizado métodos preliminares utilizando un ensayo controlado aleatorio para demostrar la acción antibacteriana de *Prosopis laevigata*, *Opuntia ficus indica* y *Microcephala gutierrezia*. En este estudio se encontró que el extracto de *Prosopis laevigata* mostró el MBC más bajo en concentraciones de 2 µg / mL de *E. coli*, 2,8 µg / mL de *E. faecalis*, 3,8 / g / mL de *Klebsiella pneumoniae* y 0,7 mg / ml de *Staphylococcus aureus*. El extracto de *O. ficus-indica* mostró un CMB más alto en el rango de 1.0 a 15 µg / ml y más. Los CMB de *G. Microcephala* fueron de 2,8 y 8,3 µg / ml en *S. aureus* y *E. faecalis*. Concluyendo que algunas de las plantas utilizadas en este estudio tenían efectos antimicrobianos e inmunomoduladores sobre patógenos en aislamiento clínico. Este puede ser un modelo a seguir para nuevos tratamientos.¹⁰

Ramos R. Lima, Perú 2016 midió el efecto del virus *Brassica rapa L.* (rábano silvestre) encontrado en hojas de *Staphylococcus aureus* y *E. coli*. El efecto inhibitorio está determinado por la proliferación. La mezcla se extrajo en agua y se evaluó para dosis de 25, 50 y 100 mg / ml. Se evidenció que el halo máximo obtenido fue con una dosis de 100 mg / ml sobre *Staphylococcus aureus*, dando como resultado un halo de 30 mm de espesor. El halo formado en la concentración de 50 mg / mL es de 27 mm y un halo formado a una concentración

de 25 mg / mL es de 24 mm. Para *E. coli*, se formularon halos de 14, 10 y 8 mm en pequeñas dosis de 100 mg / ml, 50 mg / ml y 25 mg / ml, respectivamente.¹¹

Sandoval Zavaleta y Zuñiga Julca; Trujillo, Perú 2016 en un estudio sobre la acción antibacterial de los alcaloides foliares de *P. pallida* contra *S. aureus* y *E. coli*. Se determina el efecto inhibidor mediante el método de pozo mejorado. Se disolvió un total de 2,5 y 10 mg / ml de alcaloides en dimetilsulfóxido (DMSO) y la concentración fue cloranfenicol. Los halos de inhibición medios se informaron con un diámetro de 13,63 mm a una dosis de 2,5 mg / ml, 16 mm a 5 mg / ml y 18,38 mm a una dosis de 10 mg / ml. La solubilidad del halo fue de 12 mm de diámetro a una concentración de 2.5 mg / mL, 14.13 mm a 5 mg / mL y 15.38 mm a 10 mg / mL. Concluyeron que el alcaloide total de *P. pallida* estaba por debajo de 2.5, 5 y 10 mg / ml tienen un efecto antibacteriano in vitro sobre *S. aureus* y *E. coli*.¹²

Puente Contreras et al en Lima, Perú 2018 midieron la actividad antibacteriana in vitro del extracto a base de etanol de *Z. officinale roscoe* (Kion) y *C. longa L.* (Palillo) en *Staphylococcus aureus*. Se utiliza el método de macrodilución. La CIM del producto clasificado fue Z. 2,34 mg / ml para la operación, C. Durante la duración fue 1,17 mg / ml. Decidieron que tanta agua extra tenía efectos antibacterianos.¹³

De la Cruz Et al en México 2019, determinaron el efecto antibacteriano de las semillas de *Morinda citrifolia* Linneo contra *Staphylococcus aureus* metilino resistente y *S. aureus* ATCC 29213. Los resultados indicaron que el extracto con mayor efecto antibacteriano fue el extracto de metanol. Así, los compuestos identificados y aislados mostraron actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* metilino resistente, confirmando su uso en la medicina tradicional.¹⁴

Existe evidencia de la actividad antimicrobiana de varias plantas medicinales, entre ellas tenemos *Azadirachta indica* (Neem) se encuentra en el género *Azadirachta* de la familia Meliaceae. Es un árbol tropical de hoja perenne, originaria de Pakistán, India, Bangladesh, Sri Lanka, Birmania, Malasia, Tailandia, Australia, e Indonesia.¹⁵

Puede crecer en suelos pedregosos y secos en diferentes condiciones climáticas, hasta una altitud de 700 m y tiene una larga vida útil de más de 200 años. Es abundante en aquellas regiones donde la lluvia, temperatura hasta 49 °C y el pH que varía de 4 a 10. Sin embargo, también puede crecer en aquellas áreas donde la precipitación anual es muy baja, es decir, 150–200 mm. ¹⁶

Azadirachta indica (Neem) posee un tronco semi-recto de ramificación extensa y corteza gruesa. El árbol puede llegar a tener entre 7 m a 15m de altura y 120 cm de diámetro, generando semillas en forma ovalada de color amarillento a la edad de 4 años. Las hojas compuestas e imparipinnadas están dispuestas alternativamente en pares y tienen hasta 15 folios. ¹⁷

Varias partes de plantas como raíces, flores y hojas se utilizan para tratar una serie de dolencias en los sistemas tradicionales de medicamentos debido a la presencia de bioactivos como los esteroides, azúcares, triterpenoides, alcaloides, azúcares reductores, taninos, flavonoides, lactona sesquiterpénica y compuestos fenólicos, los cuales son responsables por las propiedades antibacterianas de casi todas las partes de este árbol mágico.¹⁸

Se ha revelado que los extractos metanólicos, acetónicos y acuosos de hojas inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Enterobacter*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* cuando se estudia usando métodos agar Well y difusión de disco. ¹⁹

El aceite extraído de las semillas de *Azadirachta indica* (Neem) se ha utilizado en cosméticos, jabones, pasta dental y repelentes de insectos. Varias partes del árbol se usan para curar la varicela, problemas dérmicos, fiebre, dolor de cabeza, lepra, estreñimiento, problemas respiratorios, reumatismo y trastornos gastrointestinales.²⁰

Las hojas de *Azadirachta indica* (Neem) se usan para tratar problemas oculares, dolor de oído, reumatismo, anorexia, cicatrización de heridas, infecciones de la piel, contaminaciones sanguíneas, problemas de nariz y trastornos gastrointestinales, gusanos. El dolor de estómago y la fiebre pueden aliviarse usando la corteza del árbol. Las Personas usan las flores para deshacerse de

los gusanos intestinales y suprimir la secreción de bilis. Del mismo modo, usan frutas para curar hemorroides, infecciones urinarias, diabetes, lepra y heridas.²⁰

Por otra parte, casi toda la comunidad sufrirá alguna forma de la enfermedad por *S. aureus* durante su vida, desde intoxicación por alimentos y enfermedades cutáneas menores hasta enfermedades potencialmente mortales. La incidencia de esta bacteria es alta en trabajadores de salud y pacientes hospitalizados, pacientes con cáncer de piel y en aquellas personas que usan agujas repetidas veces, en particular drogadictos, diabéticos insulino dependientes o pacientes en hemodiálisis.²¹

El género *Staphylococcus*, por clasificación microbiológica está constituido por cocos Gram positivos, cuyo diámetro va desde 0.5 a 1.5 μm , con forma esférica que generalmente forman cadenas cortas o racimos de uvas. Son bacterias inmóviles, no esporuladas, sin cápsula; aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo; son anaerobias facultativas. Varios estafilococos producen catalasa, una enzima que puede descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre. Propiedad utilizada para distinguir el género de *Staphylococcus* de los géneros de *Streptococcus* y *Enterococcus* catalasa negativa.^{22, 23.}

Recientes análisis han observado diferencias entre los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus*, ya que en un inicio eran clasificados en un género común; una de las principales, es la cantidad de guanina-citocina (G+C de 30 a 39%), mientras que los *Micrococcus* poseen un mayor contenido de G+C de 63 a 73%. Los estafilococos, por otra parte, en su pared celular tienen unidos los ácidos teicoicos, los cuales no están presentes en los micrococcos; otra disimilitud es la formación del citocromo y menaquinona de la cadena respiratoria presentes en los estafilococos.^{22, 23,24}

Hay al menos 45 especies en el género de *Staphylococcus*, 16 de las cuales se encuentran en humanos. Los cuatro tipos clínicos más importantes son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus epidermidis*.^{24, 25}

Se requieren pruebas bioquímicas especiales y medios de cultivo para identificar *Staphylococcus aureus*, que permitan su fácil determinación. El desarrollo de los

estafilococos es rápido en casi todos los medios para desarrollo bacteriano que, en condiciones aerobias o microaerofílicas. Se desarrollan rápidamente a 37 °C, pero cuya pigmentación se logra a temperatura ambiente (20 a 25 °C).²⁵ Su crecimiento se efectúa dentro de 18 a 24 horas de incubación, formando colonias cuyo diámetro va desde 0,5 a 1,5 mm. Las cuales son lisas, elevadas, brillantes y de bordes enteros, de consistencia espesa y cuyo color característico va del amarillo a dorado debido a la producción de carotenoides; la mayoría de las cepas generan β -hemólisis o hemólisis total al entorno de las colonias cuando se cultivan en agar sangre. *Staphylococcus aureus*, tiene la particularidad que puede crecer en medios que contienen altas concentraciones de NaCl (7,5%) ya que tiene la capacidad de coagular la sangre, es resistente al calor y causa inflamación representada por sequedad. aureus se propaga en medios de cultivo no selectivos como agar sangre, agar chocolate, agar cerebro – corazón (BHI) y entre otros.^{26, 27}

Según OMS, la vida global ha llegado a la era post antibiótica y amenaza a millones de vidas cada año. Estos efectos desastrosos se atribuyen al uso indiscriminado e inadecuado de medicamentos antimicrobianos en medicina veterinaria, acuicultura, agricultura y tratamiento de infecciones en humanos.²⁸ El uso incontrolado de antibióticos aumenta la presión selectiva y acelera aún más la propagación de resistencias. *Staphylococcus aureus* Meticilino Resistente (MRSA) ha sido desarrollado para ser uno de los principales patógenos bacterianos potencialmente mortales. No se limita a los hospitales y también se está generalizando en entornos naturales, lo que aumenta la preocupación de que esos depósitos de resistencia a los antibióticos puedan amenazar la salud.²⁸

La metilina, un antibiótico activo contra los estafilococos resistentes a la penicilina, se introdujo en 1959. Dentro de dos años, la resistencia a la metilina adquirida había surgido en *S. aureus*, y el nivel de resistencia aumentó constantemente desde entonces. Actualmente, MRSA representa el 60% de los casos clínicos de cepas aisladas de *S. aureus* de las unidades de cuidados intensivos en Estados Unidos, evidenciando que esta cifra puede ser tan alta como 70-80% en gran parte de los países asiáticos. MRSA exhibe resistencia a

múltiples medicamentos, incluida la resistencia a todo β - lactamasa. Por lo tanto, los antibióticos dirigidos a MRSA son limitados, pero incluyen vancomicina, linezolid y daptomicina²⁹. Sin embargo, también se ha informado de resistencia a estos antibióticos. Por lo tanto, el desarrollo de nuevos medicamentos o terapias alternativas efectivas contra MRSA es de gran importancia.^{29, 30}

Actualmente se ha demostrado que los productos naturales, especialmente los derivados de plantas, son agentes efectivos con propiedades antibacterianas únicas a través de diferentes mecanismos.²⁸

3. METODOLOGÍA

3.1 Tipo y diseño de investigación

Tipo de investigación: Básica

Diseño de investigación: Es de tipo comparativo y experimental verdadero con estímulo creciente.³¹ Se llevó a cabo en el Laboratorio de SCIENCE EXPERIMENT Research Laboratory. – Trujillo.

$RG_1 \rightarrow X_1 \rightarrow O_1$

$RG_2 \rightarrow X_2 \rightarrow O_2$

$RG_3 \rightarrow X_3 \rightarrow O_3$

$RG_4 \rightarrow X_4 \rightarrow O_4$

$RG_5 \rightarrow X_5 \rightarrow O_5$

En dónde:

RG₁₋₅: Cepas de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

X₁: Tratamiento con extracto etanólico de *A. indica A. juss* (neem) a 250 µg/mL.

X₂: Tratamiento con extracto etanólico de *A. indica A. juss* (neem) a 500 µg/mL.

X₃: Tratamiento con extracto etanólico de *A. indica A. juss* (neem) a 750 µg/mL.

X₄: Vancomicina 30 µg/mL (control positivo).

X₅: Suero fisiológico (control negativo).

O₁₋₅: Efecto antibacteriano mediante formación de halos de inhibición.

3.2. Variables y operacionalización: (Anexo 1)

Variable independiente:

Las concentraciones de 250 µg/mL, 500 µg/mL y 750 µg/mL del extracto etanólico de *Azadirachta Indica* (neem) y el control positivo vancomicina de 30 µg/mL.

Variable dependiente:

Efecto antibacteriano *in vitro* contra *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300.

3.3. Población, muestra y muestreo

3.3.1. Población

Cepa de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300 reactivada en el Laboratorio de SCIENCE EXPERIMENT Research Laboratory. – Trujillo.

- **Criterios de inclusión:**

Cepa de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300 caracterizada como tal mediante sistema automatizado y sus características culturales.

- **Criterios de exclusión:**

Cepa de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300 contaminada.

Cepa de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300 con resistencia inducible a vancomicina.

3.3.2. Muestra

Inóculo de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300 con un concentrado *equivalente* a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

3.3.3. Muestreo

Dado que se trataba de una investigación experimental, utilizó la fórmula estadística para la diferencia de promedios en halos de inhibición para calcular la cantidad de repeticiones (unidades de prueba) para validar el diseño experimental. **Anexo 2**

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos:

3.4.1. Técnica

El método de difusión en disco se utilizó para la observación del crecimiento de halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300.

3.4.2. Instrumento

Los instrumentos utilizados fueron: Un vernier milimétrico con el cual se midió los halos de inhibición formados. Un espectrofotómetro con el cuál se estandarizo la concentración del inóculo bacteriano. Una balanza analítica con el cual se midieron las concentraciones del extracto en µg/mL. Además, el formato de recolección de datos fue diseñado para tener en cuenta las variables de investigación de acuerdo con el estándar guía Clinical & Laboratory Standards Institute CLSI) versión M100S.^{28 35} **Anexo 6.**

3.5. Procedimiento

Para la realización de este estudio se han tenido en cuenta los siguientes pasos:

- a. Se recibió el permiso para la ejecución de la investigación. **Anexo 03.**
- b. Se consiguió la cepa *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300. **Anexo 4.**
- c. Una muestra de la planta con hojas y/o frutos fue llevada al Herbarium Truxillense y se procedió a la determinación taxonómica, cuyo código de ingreso a la colección general es 61248. **Anexo 5.**
- d. Se colectaron hojas de *Azadirachta indica* A. juss (Neem) de árboles del campus de la Universidad Cesar Vallejo Filial de Piura. **Anexo 7**
- e. Se extrajo el extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. juss (neem) a través del método de maceración.
- f. Se utilizó el medio Infusión Brain Heart para la reactivación de la cepa de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300.
- g. Se cultivó la cepa *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300 en agar Mueller-Hinton y se determinó la susceptibilidad a antibióticos usando el método de difusión en agar de Kirby-Bauer, consideración los criterios del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Por lo cual se tomó en cuenta los estándares versión M02-A12³⁶ y M100.³⁵

3.6. Métodos de análisis de datos

Los resultados fueron tabulados a través del programa Microsoft Excel, los cuales se sometieron a pruebas estadísticas por el Licenciado Alfredo Alcalde

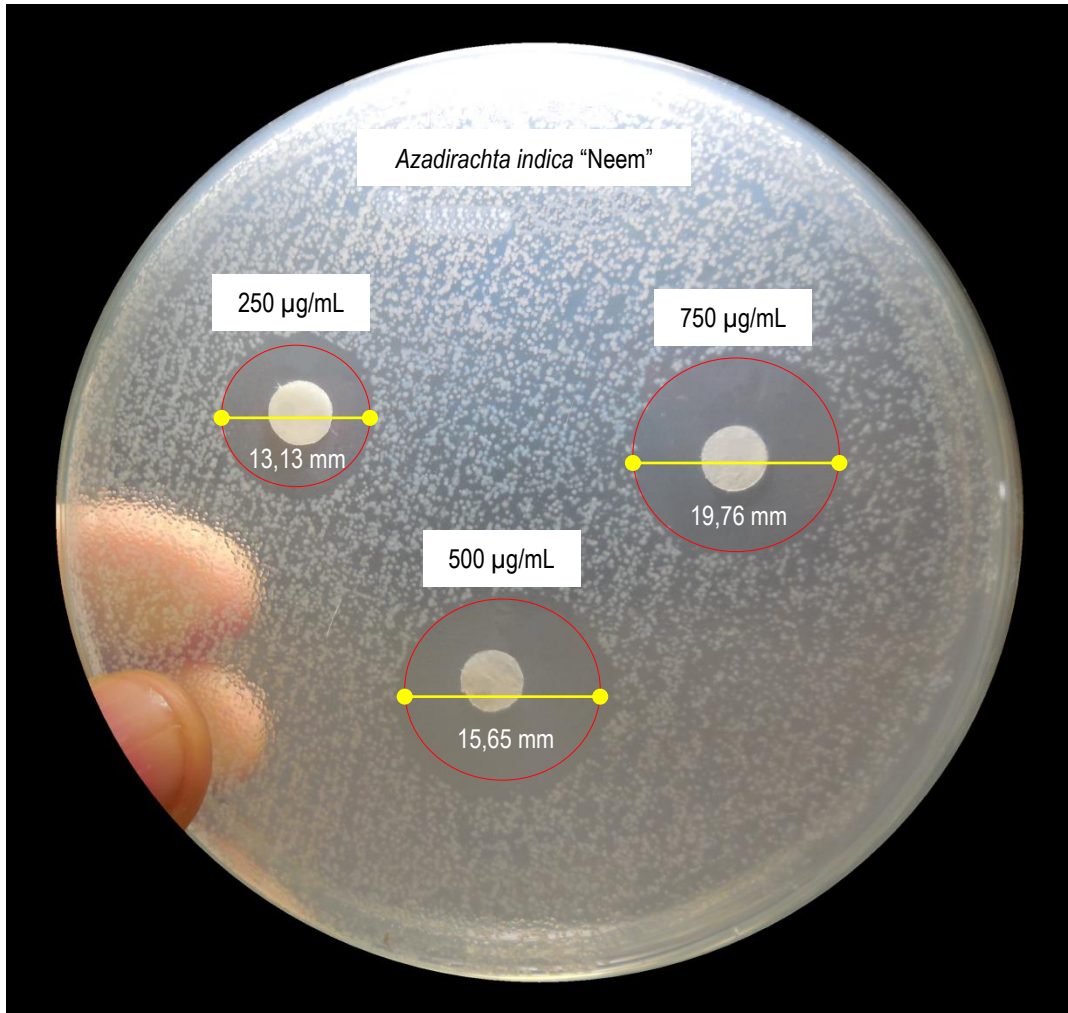
Guerra, el cual utilizó el Software SPSS v25. Se consideró el método estadístico de ANOVA para el análisis de medias de los tratamientos y pruebas de significancia de Tukey para la comparación entre ensayos.

3.7. Aspectos éticos

Fue ejecutada la investigación cumpliendo con las Normas de bioseguridad dictadas por parte del Ministerio de salud.³⁴ Se respetó el principio de ética del Colegio Médico del Perú; Cap. 6, art 48.³⁵

4. RESULTADOS

Figura 1 Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. juss “Neem” sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300.



Fuente: Galería fotográfica de procesamiento.

En la Figura 1 se muestra el efecto antibacteriano de tres concentraciones del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. juss “Neem” sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300 reportado como diámetro del halo de inhibición promedio. En el caso de la concentración de 250 µg/mL se reporta un halo de 13,13 mm, seguido de un halo de 15,65 mm para la concentración de 500 µg/mL y de un halo de inhibición de 19,76 mm para la concentración más alta (750 µg/mL).

Tabla 1 Comparación del efecto antibacteriano in vitro de las concentraciones de 250 µg/mL, 500 µg/mL y 750 µg/mL del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. juss (neem) con el control positivo vancomicina a la concentración de 30 µg/mL sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300.

| COMPARACIONES MÚLTIPLES | | ZONA DE INHIBICIÓN EN mm | | |
|-------------------------|-------------------|--------------------------|---------|---------|
| (I) Concentración | (J) Concentración | Media | D.E** | Sig.*** |
| 250 µg/mL | 500 µg/mL | 15,6480 | 0,90879 | 0,000 |
| | 750 µg/mL | 19,7620 | 1,06443 | 0,000 |
| | 30 µg/mL | 15,0600 | 0,09661 | 0,000 |
| 500 µg/mL | 250 µg/mL | 13,1310 | 0,51215 | 0,000 |
| | 750 µg/mL | 19,7620 | 1,06443 | 0,000 |
| | 30 µg/mL | 15,0600 | 0,09661 | 0,309 |
| 750 µg/mL | 250 µg/mL | 13,1310 | 0,51215 | 0,000 |
| | 500 µg/mL | 15,6480 | 0,90879 | 0,000 |
| | 30 µg/mL | 15,0600 | 0,09661 | 0,000 |
| 30 µg/mL* | 250 µg/mL | 13,1310 | 0,51215 | 0,000 |
| | 500 µg/mL | 15,6480 | 0,90879 | 0,309 |
| | 750 µg/mL | 19,7620 | 1,06443 | 0,000 |

Fuente: Análisis estadístico

*Concentración control positivo: Vancomicina

** Desviación estándar.

*** p=significancia. HSD Tukey

En la tabla 1 se observa el análisis de comparaciones múltiples de Tukey del efecto antibacteriano reportado mediante promedio de halos de inhibición de entre las diferentes concentraciones del extracto de *Azadirachta indica* A. juss (neem) y con el control positivo vancomicina. Se observa que existe diferencia altamente significativa entre la concentración de 500 µg/mL con el control positivo vancomicina 30 µg/mL ($p > 0,05$). Sin embargo, en todas las demás comparaciones si existe diferencia altamente significativa ($p < 0,05$).

Tabla 2 Eficacia antibacteriana de vancomicina a la concentración de 30 µg/mL sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300.

| Vancomicina | N | Media mm | D.E.* | Mínimo mm | Máximo mm |
|--------------------|----------|---------------------------|--------------|----------------------------|----------------------------|
| 30 µg/mL | 10 | 15,0600 | 0,09661 | 14,90 | 15,20 |

Fuente: Análisis estadístico

*Desviación estándar.

En la tabla 2 se muestra el efecto antibacteriano del control positivo vancomicina. Dicho efecto fue expresado mediante el diámetro del halo de inhibición. Se realizaron 10 ensayos reportando una media de inhibición de 15,06 mm. Se observa que el efecto mínimo reportado fue una inhibición de 14,90 mm y el efecto máximo fue de 15,20 mm.

5. DISCUSIÓN

En el Perú contamos con un recurso ilimitado de plantas medicinales, las cuales son cada vez más importantes en la investigación.

Últimamente, el uso de la medicina natural para el tratamiento y / o manejo de una serie de enfermedades se ha vuelto muy común, utilizándolos sin base científica para su efectividad, además teniendo una alta probabilidad de adquirir efectos adversos en la población.

Las bacterias multirresistentes son un problema de salud pública, y el *Staphylococcus aureus* es uno de ellos, el cual ha desarrollado resistencia a través de un mecanismo molecular que inactiva los antibióticos., el cual se encuentra dentro de la lista OMS de patógenos prioritarios con prioridad II y estatus elevado.

El tratamiento antibiótico inadecuado no solo conlleva a efectos adversos para los pacientes, sino también ejerce una presión selectiva sobre los patógenos, lo que aumenta la resistencia a los antibióticos., lo que lleva a una mayor resistencia a los antibióticos. Por esta razón, muchos investigadores han buscado terapias alternativas basadas en remedios a base de hierbas. para el tratamiento de diversas infecciones, ya que se ha demostrado que varios compuestos biológicos actúan como agentes antibacterianos.^{39,40,41}

La investigación evaluó el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Azadirachta indica A. juss* (Neem) sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300 en comparación con vancomicina a 30 µg, utilizando el método de Kirby - Bauer (difusión en disco). *Azadirachta indica A. juss* (NEEM) es una especie de planta que, aunque no es originaria del Perú, se ha adaptado muy bien a las condiciones geoambientales de la región piura. Es un árbol comúnmente utilizado como ornamental o de sombra. Esta planta se encuentra en el campus de la Universidad César Vallejo filial Piura y en los espacios verdes de esta ciudad.

Referente a la actividad antibacteriana, el extracto etanólico de las hojas de *Azadirachta indica A. juss* (Neem) sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (MRSA) obtenido a una concentración de 250 µg/ml generó un halo de

inhibición promedio de 13,13 mm de diámetro, la concentración de 500 µg/ml, un halo promedio de 15,65 mm y finalmente la concentración 750 µg/ml formó un halo promedio 19,76 mm. Este estudio, además se valoró la actividad antibacteriana de vancomicina (grupo de control positivo) cuando se observó que era activa contra *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 al mostrar un halo de inhibición promedio de 15,06 mm. - IC 95%. (Tabla 2).

Este resultado se puede comparar con el estudio de Alcántara Noriega, et al ⁴² quienes mostraron el efecto antibacteriano del extracto acuoso de semillas de *Moringa oleífera* sobre cepa de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, a una concentración de 120 mg/mL provocando halo de inhibición de > 20 mm. En ambos estudios se utilizó el método de Kirby-Bauer para determinar la actividad antimicrobiana de los fotoquímicos de la planta, sin embargo, la diferencia de halos puede deberse a la concentración obtenida del extracto, encontrada en diferentes estudios. Por otro lado, utilizaron aceite esencial de *Piper angustifolium* el cual presentó actividad antibacteriana a una concentración de 805 mg/mL con halo de inhibición de 20.1 mm. Esta diferencia se debe a que los investigadores usaron una concentración más alta de *Piper angustifolium* a diferencia de nuestro estudio, en el que se emplearon concentraciones de hasta 750 mg/ml para obtener el efecto antibacteriano.

Los resultados obtenidos mostraron un efecto inhibidor superior al reportado por Mahfuzul et al ⁴³, quienes estimaron el efecto del extracto de neem sobre el crecimiento de bacterianas de diferentes organismos, indicando que los extractos de *Azadirachta Indica A. Juss* mostraban actividad antibacteriana de un 7 a 26% en microorganismos del tipo Gram positivo en estudio, también indicó que la actividad antimicrobiana se desarrolla mejor si el extracto vegetal es etanólico, como se logró en este estudio.

Sobre esto Alzohairy. En 2016,⁴⁴ se informó que las hojas de *Azadirachta indica* contienen flavonoides polifenólicos, especialmente quercetina, y que el β-sitosterol fue el primero en ser purificado a partir de hojas frescas de neem conocidas por tener actividades antifúngicas y antibacterianas. Esto es consistente con la hipótesis de que la azadirachtina, un componente fenólico aislado de las hojas de

neem, puede destruir las paredes celulares bacterianas y, por lo tanto, inhibir el crecimiento bacteriano.⁴⁵

Se puede observar que *Azadirachta indica A. juss* (Neem) tiene un gran potencial de uso como agente antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus*, ya que es una planta silvestre que no requiere cuidados especiales. Esta podría ser una alternativa para controlar este microorganismo.

En estudios previos. los resultados obtenidos fueron variables lo que podría explicarse por factores ajenos al estudio que inciden en la calidad de la muestra botánica, tales como la calidad del campo, el clima, la altitud, área y método de recolección, tiempo de secado. Esto se puede mejorar si tiene un mejor control del cultivo, una selección adecuada de la muestra y mejores técnicas para obtener el extracto. Entonces, al aumentar nuestras concentraciones, podemos lograr mejores resultados.

6. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. juss "Neem" presenta efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300 de tipo bactericida pues una de sus concentraciones superó el efecto del control positivo vancomicina.
2. El efecto antibacteriano reportado por el control positivo vancomicina 30 µg/mL fue estadísticamente igual al alcanzado por la concentración de 500 µg/mL del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. juss (neem) pero menor a la concentración de 750 µg/mL.
3. La vancomicina a la concentración de 30 µg/mL mostró actividad antibacteriana de tipo bactericida sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 43300.

7. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios sobre extractos diferentes de *Azadirachta indica A. juss* y sus propiedades antimicrobianas.
- Realizar estudios in vitro sobre *Azadirachta indica A. juss* para determinar sus efectos frente a otros patógenos que causan infecciones comunes en la población son de preocupación médica, teniendo en cuenta ña antibioterapia de primera línea.
- Comprobar los efectos antibacterianos de los extractos de *Azadirachta indica A. juss*, pero provenientes de diferentes partes de la planta para evaluar si tienen las mismas propiedades.

REFERENCIAS:

1. Organización Mundial de la Salud, 2013. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. Disponible en : <https://www.minsal.cl/sites/default/files/files/s21201es.pdf> (Consultado el 15 de Marzo del 2020)
2. García C. Actividad antibacteriana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* Resistencia múltiple. [Tesis de Doctoral]. México. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Unidad Laguna. 2006
3. Grosso L. El uso popular de las plantas medicinales en Uruguay. *Associazione Italiana di Zootecnia Biologica y biodinamica*. 2010; 6.
4. Atal CK, Kapur BM. Cultivos y utilización de plantas medicinales. *Regional Research Laboratory*. Jammu – Tawi, India; 1982, pp. 406.
5. El Arbol del nim: establecimiento y aprovechamiento en la huasteca potosina. Inifap. Disponible en: <http://www.campopotosino.gob.mx/modulos/Docsdescargar/FOLL.%20TEC.%200003.pdf>
6. Acedo C. 2004. Botánica. Disponible en: <http://www.unileon.es/personal/wwdbvcac/index>. (Consultado el 15 de Marzo del 2020)
7. Garcia, j. (2013). Neem The Divine Tree *Azadirachta indica*. En *Medicinal and Aromatic Plants* (Vol. 5).
8. Gualtieri María, Villalta Carolina, M. Guillén Ana, Lapenna Elisa, Andara Emma. Determinación de la actividad Antimicrobiana de los Extractos de la *Azadirachta Indica* A. Juss (Neem). *INHRR* [Internet]. 2004 Ene [citado 2020 Jul 05] ; 35(1): 12-16. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772004000100003&lng=es
9. Mustafa M. Division of Endodontic, Department of Conservative Dental Sciences, College of Dentistry, Prince Sattam Bin Abdulaziz University, P.O.BOX: 153, AlKharj - 11942 Kingdom of Saudi Arabia

10. Sanchez E. Actividad antibacteriana y antibiopelícula de extractos hidroetanólicos de plantas contra microorganismos nosocomiales [Tesis] México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2016
11. Ramos Q. Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso liofilizado de las hojas de brassica rapa I “Nabo Silvestre” sobre las cepas de Staphylococcus 25823 y Echerichia coli 25922 [Tesis] Lima: Universidad Alas Peruanas; 2016. Disponible: [http://repositorio.uap.edu.pe/bitstream/uap/3784/2/RAMOS%20QUISPE Resumen.pdf](http://repositorio.uap.edu.pe/bitstream/uap/3784/2/RAMOS%20QUISPE%20Resumen.pdf)
12. Sandoval E, Zuñiga E, Efecto antibacteriano in vitro de los alcaloides totales extraídos de las hojas del Prosopis pallida (Humb. & Bonpl. ex Willd.) kunth “algarrobo” frente a Staphylococcus aureus y Escherichia coli [Tesis] Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2016. Disponible en: <https://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/1497/Sandoval%20Zavaleta%20Edwing%20Jeanpierre%20II.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
13. Puente Contreras EE, Torres Casanova SJ. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las raíces de zingiber officinale roscoe (kion) y cúrcuma longa I. (palillo) frente a cepas de staphylococcus aureus. 2018.
14. De La Cruz-Sánchez, Natividad Giovana et al. “Antibacterial activity of Morinda citrifolia Linneo seeds against Methicillin-Resistant Staphylococcus spp.” Microbial pathogenesis vol. 128 (2019): 347-353. doi:10.1016/j.micpath.2019.01.030
15. Fathima, S. K. (2004). Investigation on the biology and management of Phomopsis azadirachtea on neem. Ph.D thesis. University of Mysore, Mysore India.
16. Ezz-Din, D., Gabry, M. S., Farrag, A. R. H., & Abdel Moneim, A. E. (2011). Physiological and histological impact of Azadirachta indica (neem) leaves extract in a rat model of cisplatin-induced hepato and nephrotoxicity. Journal of Medicinal Plant Research: Planta Medica, 5(23), 5499–5496.
17. Singhal, S., & Bhatt, M. (2016). Review on a natural drugstore—Neem. World Journal of Pharmaceutical Sciences, 5(8), 379–396.

18. Azman, M. A., Sidek, H. J., Sharudin, M. S., Halim, N. K., & Raja, S. F. (2016). Phytochemical screening and antibacterial activity of *Azadirachta indica* leaves extract on common skin infection bacteria. *Jurnal Intelek*, 11(1), 18–23.
19. Gul, F., Shinwari, Z. K., & Afzal, I. (2012). Screening of indigenous knowledge of herbal remedies for skin diseases among local communities of North West Punjab, Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*, 5, 1609–1616.
20. Saleem S, Muhammad G, Hussain MA, Bukhari SNA. A comprehensive review of phytochemical profile, bioactives for pharmaceuticals, and pharmacological attributes of *Azadirachta indica*. *Phytother Res [Internet]*. 2018;32(7):1241–72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/ptr.6076>
21. Kuroda M, Ohta T, Uchiyama I, Baba T. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 2001; 357: 1225-1240.
22. Kloss WE, Schleir KH, Goirtz F. The genus *Staphylococcus*. In: Balows A, Truper HG, Dwoekin M, eds. *The Prokaryotes*, 2nd Ed. New York, Springer-Verlag; 1992.
23. Kloss We, Bamerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: Murra PR, Baron EJ, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington DC: ASM Press; 1995.
24. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA y Mietzner TA. *Microbiología Médica de Jawetz*. 27va ed. McGraw-Hill Interamericana Editores Sa de CV. México DF. 2011
25. Compennolle V, Verschraegen G, Claeys G. Combined use of Pastorex Staph-Plus and either of two new chromogenic agars, MRSA ID and CHROMagar MRSA, for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol [Internet]*. 2007;45(1):154–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01115-06>
26. Wendt C, Havill NL, Chapin KC, Boyce JM, Dickenson R, Eigner U, et al. Evaluation of a new selective medium, BD BBL CHROMagar MRSA II, for detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in different

- specimens. J Clin Microbiol [Internet]. 2010;48(6):2223–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02374-09>
27. Li J, Liu D, Tian X, Koseki S, Chen S, Ye X, et al. Novel antibacterial modalities against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* derived from plants. Crit Rev Food Sci Nutr [Internet]. 2019;59(sup1):S153–61. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2018.1541865>
28. José Mensa, Alex Soriano, Pedro Llinares, Et al. Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. Rev Esp Quimioter 2013; 26 (Supl. 1):1-84. Disponible en: <https://seq.es/seq/0214-3429/26/sup/guia.pdf> (Consultado el 06 de Junio del 2020)
29. Hong SB, Rhee MH, Yun B-S, Lim YH, Song HG, Shin KS. Synergistic anti-bacterial effects of *Phellinus baumii* ethyl acetate extracts and β -lactam antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Ann Lab Med [Internet]. 2016;36(2):111–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3343/alm.2016.36.2.111>
30. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Microbiología médica. 7a ed. Elsevier; 2014.. pp. 11-12.
31. Sampieri RH, Collado CF, Lucio MPB. Metodología de la investigación. 6a ed. Nueva York, NY, Estados Unidos de América: McGraw-Hill; 2014.
32. García-García, José Antonio, Reding-Bernal, Arturo, López-Alvarenga, Juan Carlos, Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. Investigación en Educación Médica [Internet]. 2013;2(8):217-224. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=349733226007>
33. Zihadi MAH, Rahman M, Talukder S, Hasan MM, Nahar S, Sikder MH. Antibacterial efficacy of ethanolic extract of *Camellia sinensis* and *Azadirachta indica* leaves on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and shiga-toxigenic *Escherichia coli*. J Adv Vet Anim Res [Internet]. 2019;6(2):247–52. [citado 25 de Setiembre de 2021]; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.5455/javar.2019.f340>
34. CLSI.M100 Performance Standards for Antimicrobial Suceptibility Testing. 28ed. USA. Clinical and Laboratory Standars Institute; 2018; 38(3): 95-96.

35. Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Enero 2015; 35(3): 64, 69. Disponible en : <http://file.qums.ac.ir/repository/mmrc/clsi%202017.pdf> (Consultado el 15 de Junio del 2020)
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. Sistema de Gestión de la Calidad del Pronahebas, Ministerio de Salud (MINSA). Manual de Bioseguridad: Programa Nacional de Hemoterapia y Bancos de Sangre, 2004. norma técnica N° 015 - MINSA / DGSP - V.01. 2004. Perú. [citado el 05 setiembre de 2021]. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/MINSA/3371.pdf>
38. Colegio Médico del Perú. Código de Ética y Deontología. Lima [Perú]: CMP; 2007. [citado el 18 de octubre de 2021]. Disponible en: <https://www.cmp.org.pe/wp-content/uploads/2020/01/CODIGO-DE-ETICA-Y-DEONTOLOG%C3%8DA.pdf>
39. Gishen NZ, Taddese S, Zenebe T, Dires K, Tedla A, Mengiste B, et al. In vitro antimicrobial activity of six Ethiopian medicinal plants against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. *Eur J Integr Med* [Internet]. 2020;36(101121):101121. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eujim.2020.101121> (Consultado el 23 de noviembre del 2021)
40. Blum FC, Singh J, Merrell DS. In vitro activity of neem (*Azadirachta indica*) oil extract against *Helicobacter pylori*. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2019;232:236–43. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2018.12.025>
41. Jindal M, Chauhan. In vitro comparison of the antibacterial activity of ethanolic extract of *Azadirachta Indica* leaves with gentamycin, ampicillin, nitrofurantoin, and cotrimoxazole on bacterial pathogens isolated from urinary tract infection patients. *Asian J Pharm Clin Res* [Internet]. 2017;10(8):72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i8.18557>

42. Alcántara Noriega DC, Mejía Delgado EM. Efecto Antibacteriano del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* (Moringaceae) «moringa» sobre *Staphylococcus aureus*. Meticilino resistente comparado con oxacilina in vitro. *Rev Peru Med Integrativa*. 2020; 5(1):28-36
43. Mahfuzul Hoque MD, Bari ML, Inatsu Y, Juneja VK, Kawamoto S. Antibacterial activity of guava (*Psidium guajava* L.) and Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) extracts against foodborne pathogens and spoilage bacteria. *Foodborne Pathog Dis* [Internet]. invierno de 2007;4(4):481–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2007.0040>
44. Alzohairy M. a review Therapeutics Role of *Azadirachta indica* (Neem) and Their Active Constituents in Diseases Prevention and Treatment. Hindawi Publishing Corporation. 2016 Junio; 1(1): p. 111.
45. Subramaniam SK, Siswomihardjo W, Sunarintyas S. The effect of different concentrations of Neem (*Azadirachta indica*) leaves extract on the inhibition of *Streptococcus mutans* (In vitro). *Dental Journal*. 2005; 38(4): p. 176179.

ANEXOS

ANEXO 01:

Tabla 3. Matriz de operacionalización de variables

| VARIABLES DE ESTUDIO | DEFINICIÓN CONCEPTUAL | DEFINICIÓN OPERACIONAL | DIMENSIÓN | INDICADORES | ESCALA DE MEDICIÓN |
|--|--|--|---------------------------------------|--------------------------------------|--------------------|
| V.D. Efecto antibacteriano in vitro frente a <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Meticilino Resistente</i> | Es el efecto que tiene una sustancia para inhibir el crecimiento o eliminar completamente un agente bacteriano sin ocasionar daños sobre los organismos que lo habita. | Inhibición del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> metilino resistente debido a la presencia de un extracto vegetal. | Crecimiento Bacteriano | Halo de inhibición en milímetros. | Razón |
| V.I. Extracto etanólico de <i>Azadirachta Indica</i> (Neem) | Extracto total conteniendo compuestos bioactivos de origen vegetal obtenidos por Maceración etanólica. | Extracto adquirido por maceración etanólica de hojas secas y molidas de <i>Azadirachta Indica</i> (Neem) | Concentraciones de extractos en µg/mL | 250 µg/mL 500 µg/mL. 750 µg/mL | Razón |

ANEXO 02:

Formula estadística de diferencia de promedio sobre halos de inhibición
31:

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

$$n = \frac{(1.96 + 0.84)^2 2(0.71)^2}{(10.5 - 4.9)^2}$$

$$n = \frac{11.1328}{3.36}$$

$$n = 3.31$$

$$n = 10$$

Dónde,

n = número de repeticiones de cada ensayo.

Z α /2=1.96 Para un nivel de confianza del 95%

Z β = 0.84 para una potencia de prueba del 80%

\bar{X}_1 = 10.5 mm promedio halo inhibitorio de Vancomicina 30 ug ³³

\bar{X}_2 = 4.9 mm promedio halo inhibitorio de Azadirachta indica ³²

σ = 0.71 ³²

Reemplazando la ecuación propuesta se obtiene que el número mínimo de repeticiones que debe ser 10 para cada evaluación. Se entiende que siendo 5 evaluaciones (X_1 , X_2 , X_3 , X_4 , y X_5) y 10 repeticiones por evaluación, el total de unidades de ensayo es 50

ANEXO 03:

AUTORIZACIÓN PARA EJECUCIÓN DE TESIS



SCIENCE EXPERIMENT
Research Laboratory

AUTORIZACIÓN PARA EJECUCIÓN DE INVESTIGACIÓN

Trujillo, 13 de julio de 2021


Quien suscribe:

Bigo. Mblgo. Esp. Rubi Jackeline Espinola Aguirre

Representante Legal – Laboratorio de Investigación: SCIENCE EXPERIMENT

Vista la solicitud de la Sra. **Vilchez Carrasco Ana María**, identificada con DNI N° 70883928 y domiciliada en Jr. Apurimac 653-1, Chulucanas, Piura. Quien solicita autorización para la ejecución de la investigación titulada: "**EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE AZADIRACHTA INDICA (NEEM) SOBRE STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINO RESISTENTE**". Bajo la supervisión de su asesor especialista Dr. Mblgo. Miguel Angel Ruiz Barrueto y habiendo corroborado el pago de las tasas correspondientes, la que suscribe, **AUTORIZA** la ejecución de la investigación descrita líneas arriba en el periodo de Agosto – Setiembre a solicitud de la interesada.

Atentamente.


Rubi J. Espinola Aguirre
Biólogo Microbiólogo
C.B.P 8258



**ANEXO 04:
DONACIÓN DE CEPA BACTERIANA**

"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

DONACIÓN PARA EJECUCIÓN DE INVESTIGACIÓN

Piura 28 de octubre de 2021

Quien suscribe:

Blgo. Mblgo. Rosa Cruz Ojeda

Microbiología asistencial en el laboratorio de análisis clínico del Hospital de la Amistad
Perú-Corea II-2 Santa Rosa

Vista la solicitud de la Sra. Vilchez Carrasco Ana María, identificada con DNI 70883928, Código universitario N° 7000782233, domiciliada en Jr. Apurímac 653-01 – Chulucanas – Piura; quien solicita obtención de cepa microbiológica de *Staphylococcus aureus* metilino resistente para la ejecución de la investigación titulada "Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Azadirachta indica* (neem) sobre *Staphylococcus aureus* metilino resistente".

La que suscribe, AUTORIZA la donación de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 LOT. 852-76-5 para la ejecución de la investigación descrita líneas arriba a solicitud de la interesada.

Atentamente


Rosa Cruz Ojeda
Biólogo – Microbiólogo
C.B.P. 1632

ANEXO 05:

CERTIFICACIÓN DE LA PLANTA POR EL HERBARIUM TRUXILLENSE

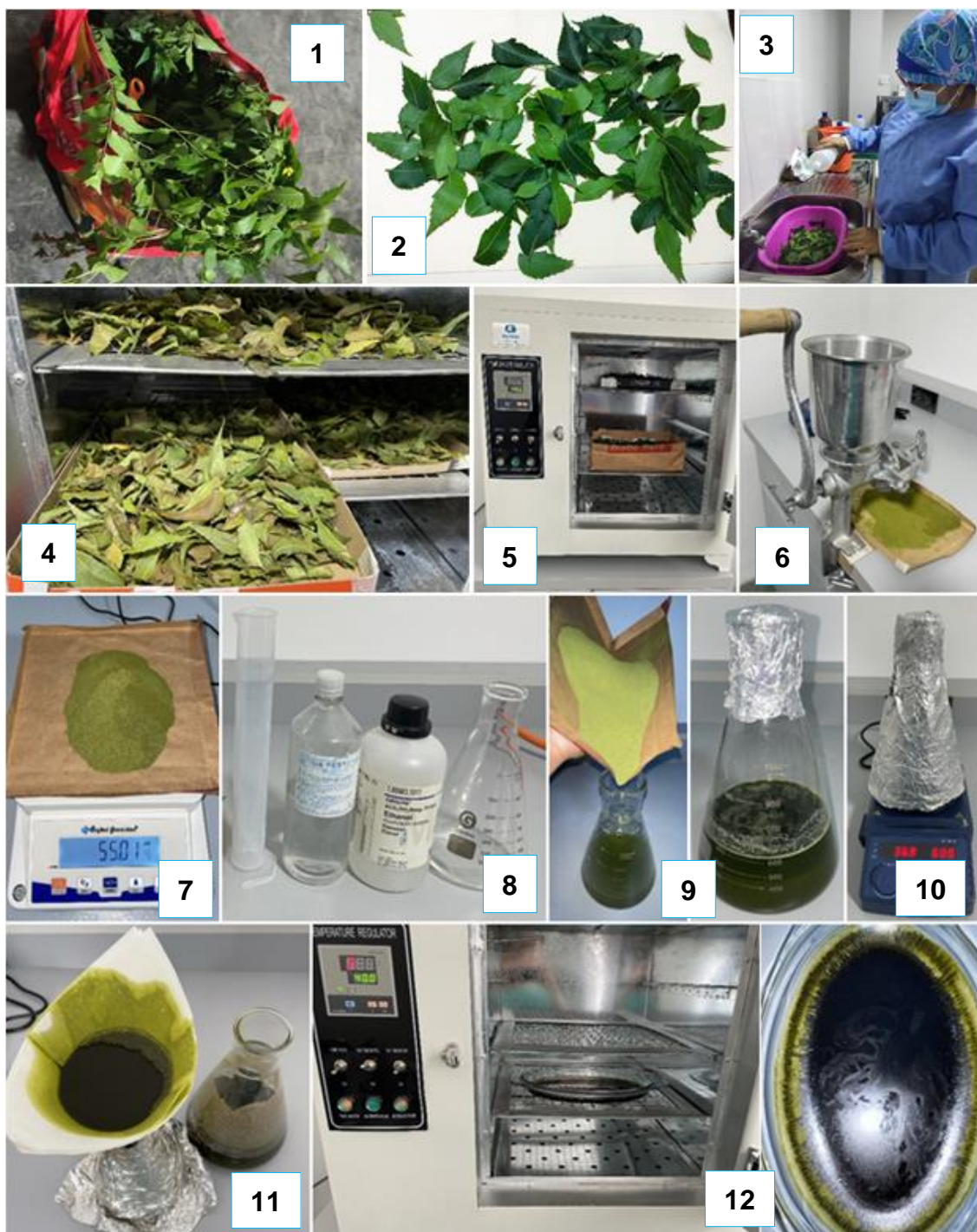


ANEXO 06:**Tabla 4. Ficha de Recolección de Datos**

| Zonas de inhibición (mm) | | | | | | |
|--------------------------|--|-----------|-----------|----------------------|-------------------|-------------------|
| Nº de placa Petri | Extracto Etanólico de <i>Azadirachta Indica</i> (Neem) | | | CONTROL POSITIVO | CONTROL NEGATIVO | SOLVENTE |
| | 250 µg/mL | 500 µg/mL | 750 µg/mL | Vancomicina 30 ug/mL | Suero Fisiológico | Dimetil Sulfoxido |
| 1 | | | | | | |
| 2 | | | | | | |
| 3 | | | | | | |
| 4 | | | | | | |
| 5 | | | | | | |
| 6 | | | | | | |
| 7 | | | | | | |
| 8 | | | | | | |
| 9 | | | | | | |
| 10 | | | | | | |

ANEXO 07:

PROCESAMIENTO MATERIAL VEGETAL Y OBTENCIÓN DE EXTRACTO



| | | | |
|---|---|----|---------------------------------------|
| 1 | Hojas de Neem colectadas. | 7 | Pesado de material vegetal molido. |
| 2 | Clasificación de hojas de Neem. | 8 | Insumos para preparación de extracto. |
| 3 | Desinfección de hojas de Neem. | 9 | Mezcla hidroalcohólica. |
| 4 | Colocación de material vegetal en estufa. | 10 | Maceración en agitación. |
| 5 | Material vegetal seco. | 11 | Filtración del extracto. |
| 6 | Molienda de material vegetal seco. | 12 | Secado de extracto en estufa. |

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO



| | | | |
|---|--|---|--------------------------------------|
| 1 | Pesando caldo nutritivo. | 6 | Hidratación de agar Mueller-Hinton. |
| 2 | Caldo nutritivo en beaker para dilución. | 7 | Esterilización de medios de cultivo. |
| 3 | Hidratación de caldo nutritivo. | 8 | Caldo nutritivo estéril. |
| 4 | Tubos con caldo nutritivo no estéril. | 9 | Placas Agar Mueller Hinton. |
| 5 | Pesado de Agar Mueller-Hinton | | |

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO



| | | | |
|---|------------------------------------|----|-----------------------------------|
| 1 | Inóculo estandarizado. | 6 | Rotulación de placa. |
| 2 | Confirmación microscópica de cepa. | 7 | Reposo de placa por 15 minutos. |
| 3 | Siembra con hisopo en placa. | 8 | Placas inoculadas. |
| 4 | Colocación de discos. | 9 | Halo de inhibición del control. |
| 5 | Aplicación de extracto. | 10 | Halos de inhibición del extracto. |

ANEXO 08:

PROCESAMIENTO ESTADÍSTICO

Tabla 5 Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. juss comparado con vancomicina a concentración de 30 µg, en un estudio in vitro.

| Descriptivos | | | | | | | | |
|-------------------------------------|----|-------------|------------------|-------------|--|-----------------|--------|--------|
| Diámetro de halo de inhibición SARM | | | | | | | | |
| | N | Media | Desv. Desviación | Desv. Error | 95% del intervalo de confianza para la media | | Mínimo | Máximo |
| | | | | | Límite inferior | Límite superior | | |
| 250 µg/mL | 10 | 13,131 0 | 0,51215 | 0,16196 | 12,7646 | 13,4974 | 12,23 | 13,83 |
| 500 µg/mL | 10 | 15,648 0 | 0,90879 | 0,28739 | 14,9979 | 16,2981 | 14,33 | 16,83 |
| 750 µg/mL | 10 | 19,762 0 | 1,06443 | 0,33660 | 19,0006 | 20,5234 | 18,40 | 21,86 |
| 30 µg/mL | 10 | 15,060 0 | 0,09661 | 0,03055 | 14,9909 | 15,1291 | 14,90 | 15,20 |
| Total | 40 | 15,900 3 | 2,54996 | 0,40318 | 15,0847 | 16,7158 | 12,23 | 21,86 |

| Prueba de homogeneidad de varianzas | | | | | |
|-------------------------------------|---|-----------------------|-----|--------|------|
| | | Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | Sig. |
| Diámetro de halo de inhibición SARM | Se basa en la media | 8,449 | 3 | 36 | ,000 |
| | Se basa en la mediana | 4,842 | 3 | 36 | ,006 |
| | Se basa en la mediana y con gl ajustado | 4,842 | 3 | 22,751 | ,009 |
| | Se basa en la media recortada | 8,035 | 3 | 36 | ,000 |

Tabla 6 Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. juss comparado con vancomicina a concentración de 30 µg, en un estudio in vitro.

| ANOVA | | | | | |
|-------------------------------------|-------------------|----|------------------|---------|------|
| Diámetro de halo de inhibición SARM | | | | | |
| | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
| Entre grupos | 233,515 | 3 | 77,838 | 139,586 | ,000 |
| Dentro de grupos | 20,075 | 36 | ,558 | | |
| Total | 253,590 | 39 | | | |

Pruebas post hoc

Tabla 7 Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. juss comparado con vancomicina a concentración de 30 µg, en un estudio in vitro.

| Comparaciones múltiples | | | | | | |
|---|---|----------------------------|-------------|-------|-------------------------------|-----------------|
| Variable dependiente: Diámetro de halo de inhibición SARM | | | | | | |
| HSD Tukey | | | | | | |
| (I) Concentración extracto <i>Azadirachta indica</i> / Control+/- | (J) Concentración extracto <i>Azadirachta indica</i> / Control+/- | Diferencia de medias (I-J) | Desv. Error | Sig. | Intervalo de confianza al 95% | |
| | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| 250 µg/mL | 500 µg/mL | -2,51700* | ,33396 | 0,000 | -3,4164 | -1,6176 |
| | 750 µg/mL | -6,63100* | ,33396 | 0,000 | -7,5304 | -5,7316 |
| | 30 µg/mL | -1,92900* | ,33396 | 0,000 | -2,8284 | -1,0296 |
| 500 µg/mL | 250 µg/mL | 2,51700* | ,33396 | 0,000 | 1,6176 | 3,4164 |
| | 750 µg/mL | -4,11400* | ,33396 | 0,000 | -5,0134 | -3,2146 |
| | 30 µg/mL | 0,58800 | ,33396 | 0,309 | -,3114 | 1,4874 |
| 750 µg/mL | 250 µg/mL | 6,63100* | ,33396 | 0,000 | 5,7316 | 7,5304 |
| | 500 µg/mL | 4,11400* | ,33396 | 0,000 | 3,2146 | 5,0134 |
| | 30 µg/mL | 4,70200* | ,33396 | 0,000 | 3,8026 | 5,6014 |
| 30 µg/mL | 250 µg/mL | 1,92900* | ,33396 | 0,000 | 1,0296 | 2,8284 |
| | 500 µg/mL | -,58800 | ,33396 | 0,309 | -1,4874 | ,3114 |
| | 750 µg/mL | -4,70200* | ,33396 | 0,000 | -5,6014 | -3,8026 |

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

Subconjuntos homogéneos

Tabla 8 Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Azadirachta indica* A. juss comparado con vancomicina a concentración de 30 µg, en un estudio in vitro.

| Diámetro de halo de inhibición SARM | | | | |
|---|----|------------------------------|---------|---------|
| HSD Tukey ^a | | | | |
| Concentración extracto <i>Azadirachta indica</i> / Control+/- | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | |
| | | 1 | 2 | 3 |
| 250 µg/mL | 10 | 13,1310 | | |
| 30 µg/mL | 10 | | 15,0600 | |
| 500 µg/mL | 10 | | 15,6480 | |
| 750 µg/mL | 10 | | | 19,7620 |
| Sig. | | 1,000 | ,309 | 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.

Gráficos de medias

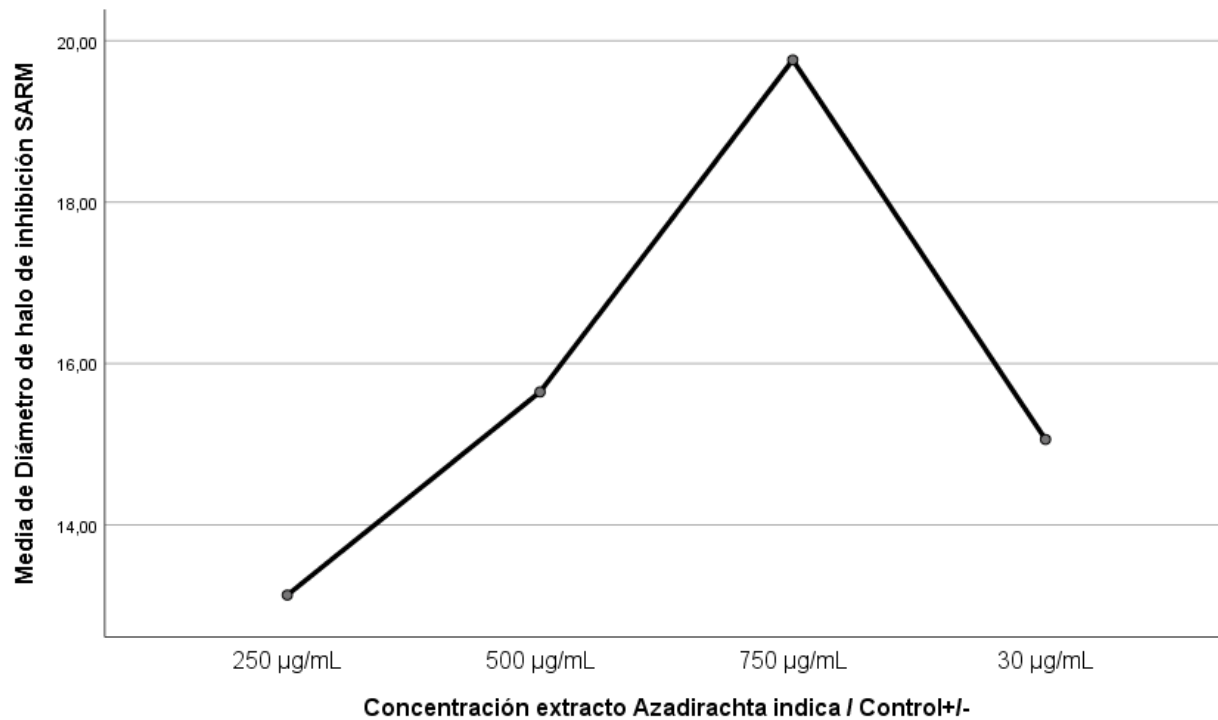


Grafico 1 Efecto antibacteriano del extracto etanólico de Azadirachta indica A. juss comparado con vancomicina a concentración de 30 µg, en un estudio in vitro.