



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA

EFICACIA ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Oenothera rosea* “YAWAR SOQO”, SOBRE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 COMPARADO CON DICLOXACILINA, IN VITRO

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
MÉDICO CIRUJANO**

AUTOR:

Emmanuel Yauli Ñaupas

ASESOR:

**DRA. MARÍA ROCÍO DEL PILAR LLAQUE SÁNCHEZ
DR. LUIS ENRIQUE CÁCERES ÁLVAREZ**

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

ENFERMEDADES INFECCIOSAS Y TRANSMISIBLES

PERÚ - 2019

DEDICATORIA

A mis padres Manuel Yauli Valladolid y Teresa Ñaupas Quispe por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluyen este. Me formaron con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos.

A mi adorada hija Emma Avril Yauli Quispe, por ser mi motor y motivo para seguir adelante y cumplir todas mis metas. Tu afecto y cariño son los detonantes de mi felicidad, de mi esfuerzo y de mis ganas de buscar lo mejor para ti.

A mi Ángel de la guarda; mi adorada abuelita Rosa Valladolid Romero que siempre me brindó su apoyo y respaldo en todos los aspectos de mi vida. Estaré eternamente agradecido.

A mi hermano Christian Amiel Yauli Ñaupas por el apoyo moral y su amistad brindada a lo largo de todos estos años.

A mi tía María Isabel Ñaupas Quispe por sus consejos, su amistad y su apoyo incondicional para no dejarme derrumbar por problemas que siempre se presentan a lo largo de este trayecto.

Gracias a todos por brindarme el apoyo necesario para poder cumplir todo lo que me he propuesto a lo largo de mi vida.

Emmanuel Yauli Ñaupas

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme todas las fuerzas para llegar hasta el final de mi carrera y darme la buena voluntad de ayudar al prójimo

Al Dr. Luis Enrique Cáceres Álvarez por el apoyo moral y académico durante mi Internado Médico el cual participó a lo largo de esta travesía; con la amistad, conocimientos brindados y mi guía para ser más disciplinado.

A mi Asesor de tesis la Dra. María Rocío Del P. Llaque Sánchez por su compromiso, su dedicación y su paciencia para asistir en el desarrollo de mi trabajo de investigación.

A la Universidad por acogerme y orientarme a fin de culminar mi tesis, a los docentes por inculcarme sus conocimientos y a mis compañeros por su amistad.

Emmanuel Yauli Ñaupas

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: **EFICACIA ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Oenothera rosea* "YAWAR SOQO", SOBRE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 COMPARADO CON DICLOXACILINA, IN VITRO**, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Médico Cirujano.

Emmanuel Yauli Ñaupas

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| PÁGINAS PRELIMINARES | |
| Página del Jurado..... | i |
| Dedicatoria | ii |
| Agradecimiento | iii |
| Declaratoria de autenticidad | iv |
| Presentación | v |
| Índice | vi |
| RESUMEN | vii |
| ABSTRACT | viii |
| | |
| I. INTRODUCCIÓN | 01 |
| 1.1. Problema | 06 |
| 1.2. Hipótesis | 07 |
| 1.3. Objetivos | 08 |
| | |
| II. MARCO METODOLÓGICO | |
| 2.1. Diseño de Investigación y Tipos de Investigación | 09 |
| 2.2. Variables y Operacionalización | 10 |
| 2.3. Población y muestra | 11 |
| 2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos | 12 |
| 2.5. Métodos de análisis de datos | 12 |
| 2.6. Aspectos éticos | 13 |
| | |
| III. RESULTADOS | 14 |
| IV. DISCUSIÓN | 18 |
| V. CONCLUSIONES | 20 |
| VI. SUGERENCIAS | 21 |
| VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS. | 22 |
| | |
| ANEXOS | 24 |

RESUMEN

Se evaluó la eficacia antibacteriana del extracto hidroalcohólico de la *Oenothera rosea* sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con la Dicloxacilina in vitro. Se diseñó un esquema experimental compuesto por 4 diluciones (40%-60%-80%-100%), 1 control positivo (dicloxacilina 3µg) y 1 control negativo; El estudio demostró que las diluciones al 40% y 60% no presentan efecto inhibitorio; al 80%, el diámetro del halo de inhibición fue de 7.5 mm (DS 0.1±0.13 IC95%: 7.4 a 7.5) entre los intervalos de 7.4 a 7.6 mm; pero también se logra evidenciar que a la concentración de 100% el valor máximo de halo inhibitorio llegó a 11.6 mm (DS 0.0±0.03 IC95%: 11.5 a 11.6) entre los intervalos de 11.5 a 11.6 mm. En relación a la Dicloxacilina tuvo una zona de inhibición de 16,6 mm (DS 0.1±0.05 IC 95%: 16.6 a 16.6) entre los intervalos 16.5 a 16.7mm. Concluyéndose que no presenta eficacia antibacteriana en ninguna de las concentraciones de la *Oenothera rosea*.

Palabras claves: Extracto hidroalcohólico *Oenothera rosea*, eficacia antibacteriana *Oenothera rosea*.

ABSTRACT

The antibacterial efficacy of hydroalcoholic extract of *Oenothera rosea* on strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 was evaluated as compared with Dicloxacillin in-vitro. An experimental scheme was designed consisting of 4 dilutions (40%-60%-80%-100%), 1 positive control (dicloxacillin 3 μ g) and 1 negative control. The study showed that dilutions at 40% and 60% have no inhibitory effect; at 80%, the diameter of the zone of inhibition was 7.5 mm (SD 0.1 \pm 0.13 95% CI: 7.4 to 7.5) between the intervals of 7.4 to 7.6 mm; but it is also evident that at 100% concentration the maximum zone of inhibition value reached 11.6 mm (SD 0.0 \pm 0.03 95%CI: 11.5 to 11.6) between the intervals of 11.5 to 11.6 mm. In relation to Dicloxacillin, it had an inhibition zone of 16.6 mm (SD 0.1 \pm 0.05 CI 95%: 16.6 to 16.6) between the intervals 16.5 to 16.7 mm. It was concluded that there was no antibacterial efficacy in any of the concentrations of *Oenothera rosea*.

Keywords: Hydroalcoholic extract *Oenothera rosea*, antibacterial efficacy *Oenothera rosea*.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 REALIDAD PROBLEMÁTICA:

Diferentes estudios microbiológicos y epidemiológicos demuestran que los seres humanos son los principales reservorios de *Staphylococcus aureus*. La mayor parte de infecciones por *Staphylococcus aureus* adquiridas en la comunidad son cepas portadas de la piel representando el diagnóstico dermatológico más frecuente y la forma más común es el impétigo (80%). Dado la alta prevalencia e incidencia de infecciones por esta bacteria piógena y del empleo de tratamientos estandarizados se viene presentando una elevada resistencia del *Staphylococcus aureus* a las penicilinas.¹

La *Oenothera rosea* “Yawar Soqo” o hierba del golpe, es una planta usada comúnmente como cataplasma en el tratamiento de traumatismos de partes blandas e infecciones superficiales de la piel, así como también para el control de dolor en casos de reumatismo, ciática y dolores musculoesqueléticos. Las partes más usadas de la planta son las hojas, pero también los tallos y las flores. Sin embargo, de manera tradicional se emplea localmente para el tratamiento de heridas infectadas superficiales, producidas por estafilococos y estreptococos, observadas comúnmente en comunidades alejadas de los centros urbanos y desprovistos de una cobertura básica de salud.²

La Dicloxacilina, es un antibiótico comúnmente empleado para el tratamiento de infecciones de piel por gram positivos, pero su empleo está restringido a las poblaciones urbanas en general, las cuales gozan de una atención básica y especializada en salud. Además este antibiótico, se contraindica en pacientes con antecedentes de hipersensibilidad a penicilinas y/o cefalosporinas. Está demostrado que existe alergenicidad cruzada con betalactámicos y carbapenémicos, por lo cual se restringe el uso durante el embarazo y lactancia, no está establecido la seguridad del uso de la Dicloxacilina y cabe resaltar que su excreción es a través de la leche materna, por lo se valora el riesgo beneficio.³

El Perú, destacado por la diversidad biológica; posee alrededor de 25,000 especies de plantas medicinales, muchas poseen propiedades terapéuticas a su alto contenido en flavonoides y taninos. La OMS reconoce la importancia de uso de las plantas medicinales en la atención primaria de salud; por lo cual recomienda y da respaldo a su integración en el primer nivel de atención de salud; se estima que el 80% a nivel mundial hacen uso de plantas medicinales para resolver sus problemas de salud.³

Dada la frecuencia de infecciones agudas de piel y la falta de oportunidad para los tratamientos alternativos para estas infecciones sobre todo para los más desprotegidos como son las poblaciones sin posibilidad de atención básica hemos creído conveniente la realización de este estudio preliminar que busca conocer la eficacia del empleo del extracto de la *Oenothera rosea* “Yawar Soqo” como un agente antibacteriano.

1.2. TRABAJOS PREVIOS

Chena F ⁵ (México, 2013) realizó un estudio de “Actividad antimicrobiana de plantas de uso medicinal” en la localidad de Veracruz. Seleccionó nueve especies de plantas nativas caracterizadas por ser utilizados como antibacterianos en dicha región: *Ageratum houstonianum*, *Aldama dentata*, *Bidens pilosa*, *Cuphea nitidula*, *Eupatorium pichinchense*, *Lopezia racemosa*, *Moussonia deppeana*, *Oenothera rosea* y *Tithonia diversifolia*. En primera instancia, obtuvo extractos etanólicos por maceración de cada una de las nueve plantas y realizó pruebas de susceptibilidad microbiana en quince aislados clínicos de diferentes bacterias y levaduras. Como resultado mostraron que todos los extractos presentaron actividad biológica contra algunas de las especies de microorganismos utilizados en las pruebas de susceptibilidad. En el caso de la *Oenothera rosea*, mostró actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes* y *S. pyogenes* β hemolítico.

Gómez R. et al ⁶ (México, 2012) realizaron el estudio “Antibacterial Activity of *Oenothera rosea* Leaf Extracts”, con el objetivo de determinar el efecto antibacteriano de *Oenothera rosea* contra *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Vibrio cholerae*. Para ello, estudiaron el efecto antibacteriano in vitro del metanol y extractos acuosos de la planta *Oenothera rosea* contra las cepas de *Escherichia coli*, *S. enteritidis* y *V. cholerae* en medio líquido por el colorimétrico dimetiltiazol y difeniltetrazolio bromuro de ensayo de reducción. El metanol y los extractos acuosos inhibieron significativamente el crecimiento de todas las cepas de bacteria ensayadas. El extracto de metanol causó hasta 55%, 66% y 87% de crecimiento contra *E. coli*, *S. enteritidis* y *V. cholerae*, respectivamente, mientras que el extracto acuoso indujo hasta 54%, 69% y 88% de inhibición de crecimiento bacteriano, respectivamente. Se concluyó que el efecto antibacteriano observado de extractos *Oenothera rosea* puede ser de beneficio como tratamiento adyuvante de enfermedades causadas por las enterobacterias estudiadas.

Kasay M, et al ⁴ (Perú, 2013) investigaron la actividad antimicrobiana de los taninos de la *Oenothera rosea*, sobre cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella gallinarum*. Se obtuvieron extractos etanólicos (diluidos con alcohol al 50%) a concentraciones de 5, 25, 50 y 100%. Encontraron que los extractos de hojas tienen mayor actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* desde una concentración del 5% (2,0 mm de halo de diámetro), 25% (3,0 mm), 50% (5,0 mm) hasta 100% (6,5 mm). Sin embargo, frente a *Salmonella gallinarum*, no se evidenció efecto inhibitorio. Se concluyó que el extracto etanólico al 50% tiene actividad antimicrobiana desde una concentración del 5% ($p < 0,001$).

Bautista R. et al ⁷ (Perú, 2011) investigaron la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea*; se utilizaron diferentes concentraciones (3,0; 1,5 y 0,75 mg), y como control positivo discos de sensibilidad para bacterias Gram negativas la Ceftriaxona 30 µg, para bacterias Gram positivas, la Amoxiciclina 25 µg. y para *Candida albicans* la Nistatina 100.000UI/mL, las bacterias Gram negativas utilizadas fueron *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella typhi*, bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Bacillus cereus* y una levadura de *Candida albicans*. El extracto hidroalcohólico frente a *Staphylococcus aureus* presentó halos de inhibición de 17,7 - 14,3 y 11,3 mm., frente al *Bacillus cereus* fue de 16,3 - 14,0 - 11,7 mm., y frente al *Streptococcus pyogenes* fue de 9,7 cuando la concentración fue de 3,0 mm. En cuanto a la concentración mínima inhibitoria fue la siguiente: para *Staphylococcus aureus* 0,60 mg, para *Bacillus cereus* 0,70 mg. y para *Streptococcus pyogenes* fue 2,0 mg. Se concluye que el extracto tuvo actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *B. cereus* y *S. pyogenes* (p<0,005).

1.3. TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA

El *Staphylococcus aureus* se caracterizan por ser células esféricas de aproximadamente 1 µm de diámetro y ser Gram positivas, habitualmente se presentan en forma de racimos irregulares parecidos a racimos de uvas. No presentan motilidad y no tienen la capacidad de formar esporas. Viven de manera libre en el ambiente. Los estafilococos crecen con facilidad en condiciones microaerófilas o aerobias y crecen con rapidez a 37 °C. Las colonias son redondas, lisas de color gris o amarillo.⁸

Las características y diferenciación con el grupo de los estreptococos se basan en la producción de catalasa y por la fermentación de carbohidratos los cuales llegan a producir ácido láctico. Son medianamente resistentes a la desecación (resisten 50 °C durante 30 minutos) y al cloruro de sodio al 9%. Su grado de patogenicidad está dada por factores extracelulares y toxinas. Patológicamente la lesión producida por *Staphylococcus aureus* es el forúnculo y otros abscesos localizados.⁹

Los *Staphylococcus aureus* por su metabolismo activo y su facultad de fermentar carbohidratos les da la capacidad de producir pigmentos que varían desde una coloración blanquecina hasta un amarillo intenso. Así como forman parte de la flora normal de la piel y de las mucosas de las personas también llegan a causar supuración, abscesos y causan infecciones piógenas e incluso septicemia mortal. Los estafilococos patógenos casi siempre causan hemólisis y coagulación del plasma.¹⁰

El género *Staphylococcus* tiene cerca de 30 especies. Las tres de importancia clínica son *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus saprophyticus*. El primero caracterizado por ser coagulasa positivo es ahí la diferenciación con el resto de especies. Esta denotado que toda persona presenta algún tipo de infección por *Staphylococcus aureus* en lo largo de su vida en la cual varía en gravedad y presentación; desde intoxicación alimentaria o infecciones cutáneas menores hasta infecciones graves potencialmente mortales.¹¹

Según la unidad de infectología de la universidad de la Frontera, existen 33 especies de estafilococo, siendo la variedad *Aureus*, la más patogénica y resistente. El *Staphylococcus aureus* produce una serie de enzimas como catalasa, hialuronidasa, coagulasa, fibrinolisisina, así como de su estructura de la pared celular lo cual le otorga gran resistencia frente a agentes destructivos, como peptidoglicano, ácido tectóico y proteína A. Para una lesión por *Staphylococcus aureus* el diagnóstico se hace por medio de la tinción gram y estudio microscópico del exudado o del tejido. En la piel causa característicamente: Folliculitis, celulitis, forúnculo, impétigo, hidradenitis supurativa, entre otras, y el tratamiento es con dicloxacilina dos gramos diarios por 10 días.¹²

El impétigo; considerada una infección cutánea superficial es causada por estafilococo y estreptococo, cuya etiología es difícil de distinguir por cuadro clínico, aunque en el 80% de los casos es producido por estafilococo. Es considerado altamente contagioso y con capacidad de propagación por contacto directo. Su incidencia es máxima entre los 2 y 6 años.¹³

La Comisión Nacional de Biodiversidad en su estudio: Herbolaria Mito o Realidad sobre el estado actual y perspectivas de las plantas medicinales, consideran a *Oenothera rosea* “Yawar Soqo” como una planta medicinal nativa y silvestre de uso intensivo, como antiinflamatoria y cicatrizante. Asimismo, es considerada dentro de las plantas medicinales y aromáticas Latinoamericanas con mayor demanda comercial en México, utilizándose el tallo y las hojas. *Oenothera rosea* es nativa de Perú, introducida a los Estados Unidos en 1783 por Thouin, publicada en Hortus Kewensis en 1789 y en 1796 en el Botanical Magazine editado por Curtis. En el Perú es reportada por Mc Bride en 1941 como parte de la flora peruana, perteneciente a la Familia *Onagraceae*.¹⁴

También llamada hierba del golpe, pertenece a la familia *Onagraceae*, género *Oenothera*. Es una planta herbácea perenne de raíz tuberosa, de más o menos 30 centímetros de alto. Las Hojas son lanceoladas dentadas, de dos a cinco centímetros de longitud. Las flores nacen a partir de las hojas reducidas de la parte superior de la planta. El Fruto de la *Oenothera rosea* tiene forma de cápsula ovoide de 8 a 10 mm de longitud, extraídos con ocho costillas longitudinales y caras arrugadas, poseen como base un pedúnculo hueco. Semillas de forma oblonga, aovada y asimétrica, de color marrón.^{15,16}

Crece en forma libre en las orillas de las acequias y en contornos de terrenos cultivados en niveles bajos y medios de climas templados o subtropicales, se encuentra en las zonas alto andinas a alturas entre 1,500 m.s.n.m. a 4,000 m.s.n.m., pero con mayor frecuencia en valles intermedios a uno y otro lado de la cordillera de los andes: Amazonas, Ayacucho, Cajamarca, Cuzco, Huánuco, Junín y Pasco; como también en Estados Unidos, México, Costa Rica, Bolivia y hasta en la India.¹⁷

El uso de esta planta en medicina data desde épocas precolombinas, era aplicada como infusión y cataplasma en el tratamiento de lesiones y traumatismos; también como infusión en casos de afecciones respiratorias, en el reumatismo, ciática y dolor en general. Las flores y hojas son usadas para el alivio renal. Las hojas son usadas en forma de infusión como depurativa, sudorífica, para el dolor de cabeza. Las ramas frescas son usadas para el tratamiento de la hemorragia durante el periodo menstrual, dismenorrea, en heridas y contusiones. La planta entera es usada para el tratamiento de la diarrea, en forma de decocción.¹⁸

El análisis fitoquímico de las hojas de *Oenothera rosea*, permite identificar: taninos, flavonoides, quinonas, alcaloides y saponinas. Los flavonoides, son compuestos fenólicos con un grupo carbonilo, los flavonoides también contienen grupos hidroxilo y se agrupan generalmente en anillos aromáticos, cuya actividad antimicrobiana se debe a su afinidad y unión a proteínas solubles extracelulares como las quinonas. Los flavonoides son lipofílicos y también pueden romper membranas microbianas. Los taninos, son más bien astringentes, con capacidad de unirse a las proteínas y desnaturalizarlas. Los taninos tienen propiedades fagocíticas, antitumorales y cuentan con un espectro amplio de actividad antibacteriana y antimicóticas. Su capacidad antimicrobiana proviene de su habilidad para inactivar adhesinas, enzimas y proteínas de transporte.^{5,19}

La dicloxacilina es usada en el manejo de las infecciones por *Staphylococcus aureus* resistentes a la penicilina. Pertenece a la familia de las isoxazolicas; es activa por vía oral, su absorción digestiva es rápida pero irregular. Estas penicilinas isoxazólicas son denominadas antiestafilocócicas, por su selectividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*; tiene un tiempo de vida media corta de 30 a 60 minutos, una elevada ligadura a las proteínas de hasta 95%, la eliminación es amplia al 70% \pm 10% y por vía renal se eliminan en 6 horas. ²⁰

Cabe resaltar que la dicloxacilina puede provocar reacciones de hipersensibilidad siendo parte de los efectos adversos con mayor incidencia por lo cual es la causa más frecuente de alergia medicamentosa; la presentación de una reacción de hipersensibilidad no depende de dosificación y no necesariamente cuando exista el antecedente de una exposición previa conocida. ²¹

1.4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿El extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* “Yawar Soqo”, es eficaz como antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con dicloxacilina 3µg, en un estudio in vitro?

1.5. JUSTIFICACIÓN

En forma general las plantas siempre fueron fuente importante de recursos para el hombre. Su uso se extiende desde el consumo como alimento hasta un uso de mayor complejidad por su actividad biológica por los compuestos que poseen y por la diversidad nos posibilita usarlas para el tratamiento de diferentes patologías. Nuestra población viene empleando preparados a base de plantas con fines medicinales para tratar diferentes infecciones, sin conocer a plenitud su efectividad, por lo que solo con un verdadero estudio analítico se podrá validar estas creencias. El presente trabajo, es una contribución al conocimiento científico de la medicina tradicional, en el uso de plantas medicinales para el tratamiento de diversas patologías de la piel causadas por *Staphylococcus aureus*.²²

El interés por desarrollar este tipo de estudios ha ido en aumento debido a la aparición de resistencia bacteriana, lo cual pone en riesgo la seguridad de la población, aunque se ha direccionado su interés hacia el empleo de las plantas, las cuales por su bajo costo y arraigo en la comunidad son vistas como una alternativa terapéutica.

El limitado e insuficiente registro de estudios locales, regionales y nacionales, nos motivó a realizar el siguiente trabajo sobre la Eficacia Antibacteriana de la *Oenothera rosea*. Muy pocos estudios que se han realizado en el mundo, y siendo nuestro país muy rico en plantas con propiedades medicinales, hace nuestro estudio aún más importante, pues busca rescatar el conocimiento ancestral y avanzar en la validación del conocimiento.

El uso tradicional de *Oenothera rosea* y algunos estudios farmacológicos indican un uso como agente de acción anti inflamatoria y una posible utilización como agente antibacteriano, por lo que se decidió realizar el presente trabajo.⁷

1.6 . HIPÓTESIS

H1: El extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* “Yawar Soqo”, es eficaz como antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 comparado con dicloxacilina a 3µg, en un estudio in vitro

H0: El extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* “Yawar Soqo”, no es eficaz como antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 comparado con dicloxacilina a 3µg, en un estudio in vitro

1.7 OBJETIVO

1.7.1 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar si el extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* “Yawar Soqo”, es eficaz como antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC25923 comparado con dicloxacilina a 3µg, en un estudio in vitro

1.7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la eficacia antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* “Yawar Soqo” al 40%.
- Determinar la eficacia antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* “Yawar Soqo” 60%.
- Determinar la eficacia antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* “Yawar Soqo” 80%.
- Determinar la eficacia antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* “Yawar Soqo” 100%.
- Determinar la eficacia antibacteriana de la Dicloxacilina a 3µg.

II. METODOS

2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN Y TIPOS DE INVESTIGACIÓN

TIPO DE INVESTIGACIÓN: Básica

DISEÑO DE INVESTIGACIÓN: EXPERIMENTO CON MÚLTIPLES REPETICIONES, con post prueba

RG1: – X1 – O1

RG2: – X2 – O2

RG3: – X3 – O3

RG4: – X4 – O4

RG5: – X5 – O5

RG6: – X6 – O6

Donde:

RG: Cepas de *Staphylococcus aureus*.

X1: Control negativo: agua destilada

X2: Extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* a 40%

X3: Extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* a 60%

X4: Extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* a 80%

X5: Extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* a 100%

X6: Control positivo: dicloxacilina

O: Diámetro de los halos de inhibición

2.2. VARIABLES Y OPERACIONALIZACIÓN

Variable Independiente: Agente antibacteriano

- a) No farmacológico: Extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea*
- b) Farmacológico: Dicloxacilina

Variable Dependiente: Eficacia antibacteriana.

- a) Eficacia antibacteriana: ≥ 13 mm
- b) No eficacia: < 13 mm

Operacionalización de variables:

| Variable | Definición conceptual | Definición operacional | Indicadores | Escala de medición |
|-------------------------|--|---|--|---------------------|
| Agente antibacteriano | Sustancia que elimina microorganismos o inhibe su crecimiento, tales como bacterias, hongos o parásitos. | La población se dividió en los siguientes grupos: a) Control negativo b) <i>Oenothera rosea</i> al 40% c) <i>Oenothera rosea</i> al 60% d) <i>Oenothera rosea</i> al 80% e) <i>Oenothera rosea</i> al 100% f) Dicloxacilina a 3 μ g | X1 X2 X3 X4 X5 X6 | Cualitativa nominal |
| Eficacia antibacteriana | Capacidad que tiene un determinado agente antibacteriano para erradicar o atenuar a un probable agente bacteriano. | Se consideró eficaz si: a) Aumento del halo de inhibición ≥ 13 mm. b) No aumento del halo de inhibición < 13 mm. | Eficaz - Sensible: ≥ 13 mm No eficaz - resistente: < 13 mm | Cualitativa Nominal |

2.3. Población y muestra

Población: Fue constituida por el conjunto de colonias de *Staphylococcus aureus* cultivadas en la placa Petri.

Muestra:

Tamaño de muestra: Por tratarse de un trabajo experimental se aplicó la fórmula estadística de diferencia de promedio sobre halos de inhibición ¹⁴, para definir el número de placas necesarias que validen la investigación. Se obtuvo 6 repeticiones por cada grupo experimental de estudio, pero se aumentó a 10 repeticiones por cada dilución (Ver Anexo 01)

Unidad de análisis: Cada uno de los cultivos de cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Unidad de muestra: Cada placa Petri con cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Método de muestreo: Se evaluó todas las placas que se utilice para desarrollar los experimentos y se obtuvo la muestra en forma aleatoria.

CRITERIOS DE SELECCIÓN: Se consideró los siguientes criterios.

Criterios de inclusión:

- Placas Petri con cultivos viables
- Cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 cultivadas entre 18 - 24 horas.
- Hojas frescas de *Oenothera rosea*, que fueron recolectada al alzar y que no mostraban ningún daño mecánico ni biológico.
- Plantas de *Oenothera Rosea* que han alcanzado un buen desarrollo biológico.

Criterios de exclusión:

- Cepa no compatible con *Staphylococcus aureus*.
- Placas Petri en mal estado.
- Placas Petri que presenten algún tipo de contaminante.
- Medio de cultivo contaminado.

2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos:

TÉCNICA

Fue la observación del crecimiento bacteriológico en las placas de observación.

PROCEDIMIENTO: (Ver Anexo 03)

- a) Certificación de la planta por parte de la UNSCH.
- b) Extracción del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera Rosea*, con el método de maceración en alcohol etílico de 96°.
- c) La técnica de cultivo empleada fue Agar.
- d) La Evaluación de la sensibilidad Kirby Bauer.

INSTRUMENTO

La información fue recolectada en la ficha de recolección de datos para medir el tamaño de los halos de inhibición sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. (Ver Anexo 02)

VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

La ficha de recolección de datos fue validada por 3 profesionales de salud (médico, biólogo y farmacéutico), quienes manifestaron la pertinencia del instrumento. No fue necesario aplicar prueba alguna que mida la confiabilidad, por cuanto es un extracto de datos puntuales que mide las variables de estudio y serán obtenidas de la experimentación. La técnica para hacer la lectura del antibiograma ya está validada, del cual se muestra en la sección. (Ver Anexo 03).

2.5. Métodos de análisis de datos:

Los datos fueron analizados en el programa SPSS versión 24, para Windows. Las pruebas estadísticas realizadas fueron

- Análisis de varianza (F) Fisher, para evaluar la diferencia del efecto medio por dilución.
- La prueba ANOVA permitió ver cual dilución presento mayor tamaño del halo de inhibición, complementariamente se realizó la prueba Post ANOVA de T3 de Dunnett porque las varianzas no fueron homogéneas
- Diagrama de Cajas para comparar los extractos a distintas diluciones.

2.6. Aspectos éticos:

En el presente estudio se respetaron los criterios de las normas de ética en la investigación considerados en la Declaración de Helsinki. Se obtuvo también la aprobación del Comité de Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad César Vallejo de Trujillo.

Se necesitó la veracidad de los datos recolectados para que el estudio sea confiable y fidedigno. Además, se tomó en cuenta los protocolos de calidad del Instituto de Estándares para la Clínica y Laboratorio (CLSI), revisando los parámetros M2, M23 y M100.

III. RESULTADOS

Tabla 1: Eficacia antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* “Yawar Soqo”, sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con Dicloxacilina, In vitro.

DATOS DESCRIPTIVOS

| Tratamiento | N | Media | 95% de IC para la media | | Me | D.E | Mínimo | Máximo | Rango intercuartil |
|---------------|----|-------|-------------------------|-----------------|------|-----|--------|--------|--------------------|
| | | | Límite Inferior | Límite Superior | | | | | |
| 40% | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 60% | 10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 80% | 10 | 7.5 | 7.4 | 7.5 | 7.5 | 0.1 | 7.4 | 7.6 | 0.13 |
| 100% | 10 | 11.6 | 11.5 | 11.6 | 11.6 | 0.0 | 11.5 | 11.6 | 0.03 |
| Dicloxacilina | 10 | 16.6 | 16.6 | 16.6 | 16.6 | 0.1 | 16.5 | 16.7 | 0.05 |

DE=Desviación Estándar; Min=Mínimo; Máx=Máximo; Me = Mediana

Fuente: reporte de resultados del SPSS versión 25

Tabla 2: Eficacia antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* “Yawar Soqo”, sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con Dicloxacilina, In vitro.

ANALISIS DE VARIANZA (ANOVA)

| Variación | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. |
|------------------|-------------------|-----------|------------------|--------|-------|
| Entre grupos | 2112.8 | 4 | 528.2 | 212223 | 0.000 |
| Dentro de grupos | 0.1 | 45 | 0.0025 | | |
| Total | 2112.9 | 49 | | | |

Fuente: reporte de resultados del SPSS versión 25

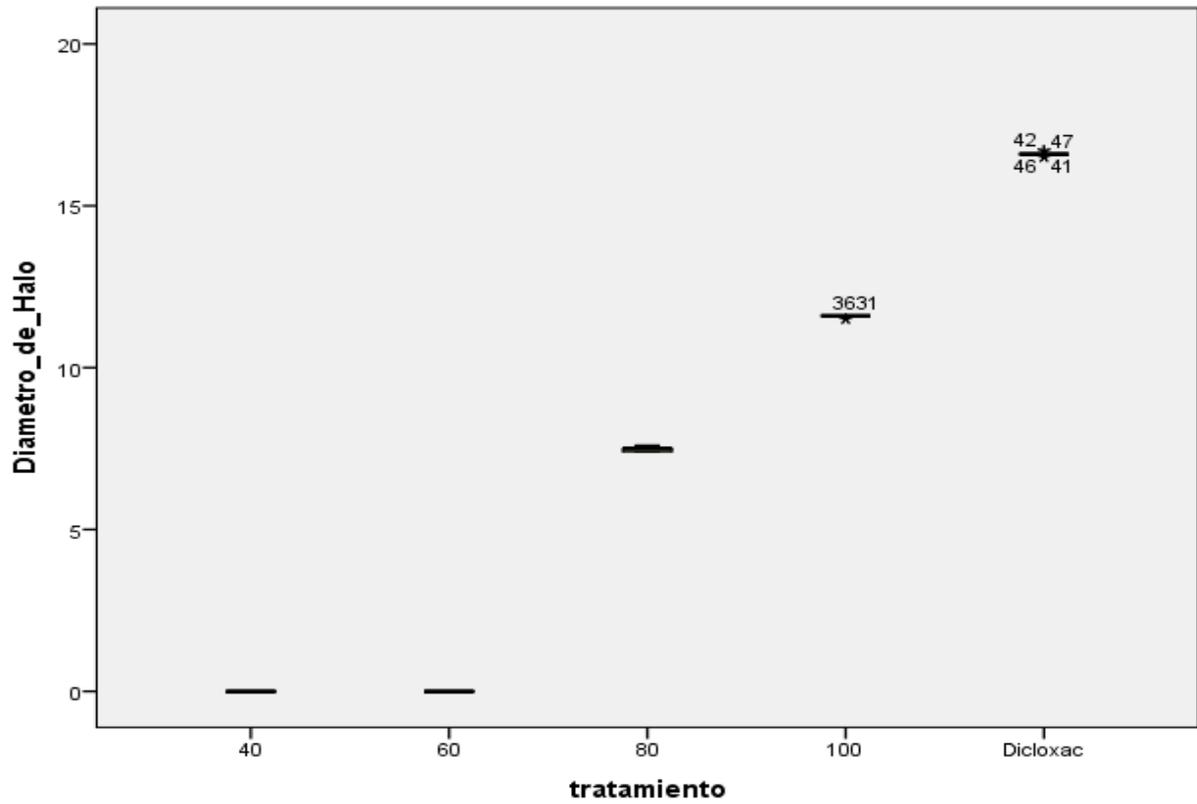
***P*: < 0.01**

Tabla 3: Post Anova en la eficacia antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* “Yawar Soqo” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con la Dicloxacilina, In vitro.

Test De T3 de DUNNETT

| Tratamiento | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | | |
|---------------|----|------------------------------|-----|------|------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| 40% | 10 | 0.0 | | | |
| 60% | 10 | 0.0 | | | |
| 80% | 10 | | 7.5 | | |
| 100% | 10 | | | 11.6 | |
| Dicloxacilina | 10 | | | | 16.6 |
| Sig. | | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |

Fuente: reporte de resultados del SPSS versión 25



Fuente: reporte de resultados del SPSS versión 25

Gráfico 01: Eficacia antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* "Yawar Soqo" sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con la Dicloxacilina, In vitro.

IV. DISCUSIÓN

Con el objetivo de evaluar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* “Yawar Soqo”, sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 comparado con dicloxacilina 3µg. Se desarrolló un estudio in vitro donde se observó 10 placas por grupo con un total de 60 cultivos. En cada placa Petri se colocaron un total de 5 discos de los cuales 4 de ellos representaban el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* “Yawar Soqo” a distintas concentraciones (100%, 80%, 60%, 40%).

En la TABLA 01, se observa la comparación de los diámetros de los halos de inhibición, como manifestación del efecto antibacteriano de cuatro concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* “Yawar Soqo” y Dicloxacilina, sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; se observa que las diluciones al 40% y 60% no presentan efecto inhibitorio a juzgar fueron cero mm. Encontramos que a la concentración 80%, el diámetro del halo de inhibición obtenida fue de 7.5 mm (DS 0.1 ± 0.13 IC95%: 7.4 a 7.5) entre los intervalos de 7.4 a 7.6 mm y a la concentración al 100% se obtiene el halo de inhibición de 11.6 mm (DS 0.0 ± 0.03 IC95%: 11.5 a 11.6) entre los intervalos de 11.5 a 11.6 mm; si bien es cierto se evaluó que a mayor concentración, aumenta el efecto antibacteriano, este no alcanzan aun valores satisfactorios según el CLSI (≥ 13 mm); considerándose que tiene no tiene eficacia antibacteriana.

El análisis de varianza ANOVA obtuvo un valor de 0.0000, $p < 0.01$ indicando que el estudio estadísticamente los resultados obtenidos son altamente significativos. Las diferencias entre las varianzas de los grupos de experimentación indicaron que no fueron homogéneos, por lo que fue necesario realizar la prueba Post ANOVA de T3 de Dunnett, que permitió comprobar el efecto de las concentraciones sobre los promedios de los diámetros del halo de inhibición. (Tabla 2)

La tabla 03 indica que, los halos de inhibición que produjeron las concentraciones de extracto de *Oenothera rosea*, incluido la Dicloxacilina, son distintos entre sí y tienen diferencias significativas por tener $p < 0,05$. Y en el Gráfico 01, se puede visualizar estas diferencias, donde se observa que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* “Yawar soqo”, sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 muestra acción antibacteriana a mayor concentración; pero no supera a la Dicloxacilina.

Al comparar nuestros resultados, con los trabajos previos encontramos que Bautista R.⁷, obtuvo 17.7 mm – 14.3 mm, halos de inhibición mayores a los obtenidos en el presente estudio porque las concentraciones hidroalcohólicas usadas y el tiempo de maceración fueron mayores, también se observó que no especifica el tiempo de recolección de la planta, puesto que la cantidad de taninos, fenoles y flavonoides varía según la estación del año; entre enero a marzo relacionado a la época de floración de la planta.

En el estudio de Gómez R.⁸, obtuvo 86% y 78% respectivamente: metanol y acuoso; de cada uno de los extractos, como porcentaje inhibitorio frente a *Escherichia coli*; en primera instancia el agente bacteriano fue diferente al nuestro; siendo como primer factor a diferenciar del estudio en mención. Y por otro lado el experimento se realizó en base a un extracto diferente al actual estudio (extracto hidroalcohólico); en este caso usó extractos de metanol y acuoso, de este modo se encuentra un efecto antibacteriano de la *Oenothera rosea* frente a *Escherichia coli*.

Sin embargo, Kasay M.⁴, encontró menores halos de inhibición 6.5 mm el mayor, porque las concentraciones hidroalcohólicas fueron menores a las usadas en el actual estudio y los agentes bacterianos fueron diferentes. Huamán E.¹⁶, obtuvo 21.17 mm de halo inhibitorio promedio con una concentración al 70% pero se evidencia el uso de la *Oenothera multicaulis* sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, por lo cual denota una eficacia antibacteriana debido al uso de una diferente especie de *Oenothera*.

Debido a la composición química de la *Oenothera rosea*; compuesta en mayores concentraciones por taninos, flavonoides y eicosanoides se le atribuye sus propiedades benéficas en varios efectos positivos en el organismo como son: protectores de la pared vascular, venotónicos, diurético, hepatoprotector, antihemorrágico y sobre todo un efecto antibacteriano ciertamente no eficaz ante *Staphylococcus aureus*, pero sí eficaz frente a otros agentes bacterianos. No hay estudio fitoquímico exacto que determine cual metabolito sea el encargado del efecto antibacteriano.

Respecto a la *Oenothera rosea* se observa en forma general presencia de mayores beneficios como agente antiinflamatorio por lo cual su uso está dirigido a contusiones entre leves a moderadas y heridas cerradas leves como agente cicatrizante; debido a su componente mayoritario que son los flavonoides estos hallados en un screening fitoquímico comparativos con otra especie de *Oenothera*. Y por lo antes ya mencionado; el efecto antibacteriano se restringe al tipo de extracto usado y el agente bacteriano a aplicar.

V. CONCLUSIONES

- El extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* “Yawar Soqo” evidencia que a mayor concentración presenta tener mayor efecto antibacteriano pero no supera el estándar sugerido por el CLSI (≥ 13 mm); por tanto se determina que no presenta eficacia antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y la dicloxacilina muestra ser eficaz puesto que supera el estándar establecido por el CLSI (≥ 13 mm).
- A la concentración de 40% del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* no evidenció halo inhibitorio.
- A la concentración de 60% del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* no evidenció halo inhibitorio.
- A la concentración de 80% del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* comienza a evidenciar efecto antibacteriano con un halo de inhibición 7.6 mm, sin embargo no es eficaz.
- A la concentración de 100% del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea* el halo de inhibición aumenta a 11.6 mm, pero no es considerado eficaz según lo establecido por el CLSI.
- La Dicloxacilina a 3 μ g presentó un halo de inhibición mayor de 16.7 mm considerándose ser eficaz según lo establecido por el CLSI.

VI. SUGERENCIAS

- Cambiar la presentación a un extracto oleoso, acuoso, acetato, clorofórmico o metanólico.
- Cambiar la especie en estudio: *Oenothera rosea* a *Oenothera multicaulis* o *Oenothera Biennis*.
- Cambiar la fecha de recolección de las hojas de *Oenothera rosea* (enero - marzo).
- Aplicar el estudio sobre otros agentes bacterianos.
- Aplicar la investigación en animales de experimentación (roedores).
- Aplicar la investigación sobre otros efectos terapéuticos de la *Oenothera rosea* como un antiinflamatorio, diurético o protectores de pared vascular.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sellares E y Moraga M. *Pediatría Integral* [en línea]. España: Sociedad Española de Pediatría Extrahospitalaria y Atención Primaria; 2015. [Citado: 2017 Agosto 18]. Capítulo 6. Enfermedades bacterianas de la Piel. Disponible en <https://www.aeped.es/sites/default/files/documen>.
2. Puelle M y Gomez V. *Las plantas medicinales en Perú* [en línea]. Perú: Catarata; 2010. [Citado: 2017 Agosto 20]. Capítulo 3. Etnobotánica y viabilidad comercial. Disponible en https://www.catarata.org/libro/las-plantas-medicinales-de-peru_45989/
3. Villena C, Arroyo A. Efecto Antiinflamatorio del extracto hidroalcohólico de *Oenothera Rosea* en ratas con inducción a la inflamación aguda y crónica [Tesis para optar el grado de Doctor en Farmacia y Bioquímica]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2012.
4. Kasay M., Huamán J. y Woolcott J. Actividad Antioxidante y Antimicrobiana de los Taninos de *Oenothera Rosea*, Lima. *Revista científica de ingeniería química*, 2013; 16(1): 61-65.
5. Chena F. Actividad antimicrobiana de plantas de uso medicinal en la localidad de Tlalchylxhuacán de los Reyes [Tesis para optar el Título de Farmacia y Bioquímica]. México: Universidad de Veracruz; 2015.
6. Gómez R, Reyna R, Tamez P y Quintanilla R. Antibacterial activity of *Oenothera rosea* (L'Her) leaf extracts. *British Journal of Medicine & Medical Research* 2012; 2(3): 396-404.
7. Bautista R. Actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo", Ayacucho 2009. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Perú, 2011. [Tesis]. Recuperado el 3 de agosto de 2015, de: <https://onedrive.live.com/view.aspx?ref=name&Bsrc=Share&Bpub=SDX.SkyDrive&resid=57C1DA73E4331254!251&cid=57c1da73e4331254&app=Word&authkey=!AoKEm5NwZv2rf0s>
8. Rojas N, Espino M, Fernandez M. Patrones de droga resistencia de cepas de *Staphylococcus Aureus* de origen clínico humano. *Rev. Cubana. Med. Trop* 2002; 1: 53-58.
9. Marigan M, Martinko J. Parker J. *Brock de Biología de los microorganismos*. 8ed. España: Prentice Hal; 1997.
10. Liébana J. *Microbiología Oral*. Mc Graw Hill – Interamericana De España 1995. Cáp. 29. Pág. 393.
11. Negroni M. *Microbiología Estomatología: Fundamentos Y Guía Práctica*. Ed Médica Panamericana 2009; Pág. 347 - 377.
12. Brooks G, Butel J, Morse S. *Microbiología medica de Jawets, Melnick y Adelberg*. Ed El manual moderno, 2005, Cáp. 14 – 15.
13. Murray P, Rosenthal K, Kobayashi G, Pfaller M. *Microbiología Medica*. Cuarta Ed en Español España, 2002.
14. Mostacero J, Mejia F. *Taxonomía de fanerógamas peruanas*. Perú: Concytec; 2002.

15. Palacios J. Plantas medicinales nativas del Perú. Perú: Concytec; 1997.
16. Huamantupa I, Cuva M, Urrunaga R, Ananya N. Riqueza, uso y origen de Plantas Medicinales expendidas en los mercados de la ciudad de Cusco. Rev. Perú. Biol 2011; 1: 283-291.
17. Díaz H, Fuertes C, Jurado B. Efecto antiagregante plaquetario in vivo y fibrinolítico in vivo del extracto etanólico de las hojas de *Oenothera Rosea*. Rev. Soc. Quím 2011; 77(3).
18. Pio F. Plantas Medicinales. Barcelona: Vander; 1990.
19. Díaz H, Fuertes C, Whu D, Jurado B, Roque M, Arroyo J. Efecto antiagregante plaquetario *in vivo* y fibrinolítico in vitro del extracto etanolico de las hojas *Oenothera rosea* Aiton (chupasangre) Rev. Soc. Quim. del Perú 2011; 77 (3): 225-234.
20. Mensa J, Gatell J M^a, Azanza J R, et al. Guía de terapéutica antimicrobiana. Elsevier Doyma, 2008.
21. Goodman L y Gilman A. Las bases farmacológicas de la Terapéutica. Mc Graw Hill, 2006.
22. Eguizabal M. Actividad Antibacteriana In vitro del extracto etanólico de Propoleo Peruano sobre *Streptococcus mutani* y *Lactobacillus casei*. Lima – Perú; 2005.
23. Ernest E. Herbal Medicine Products. British Journal of General Practice 2002; 410.
24. Chang, R. Química (9^a ed.). México: McGraw Hill. 2007.

ANEXOS

ANEXO 01

TAMAÑO DE MUESTRA

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

DONDE:

$$Z_{\alpha/2} = 1.96$$

$$Z_{\beta} = 0.842$$

$$\bar{X}_1 = 16 \text{ (muestra piloto)}$$

$$\bar{X}_2 = 11.6 \text{ (muestra piloto)}$$

$$\sigma^2 = 2.1 \text{ (muestra piloto)}$$

$$n = 6$$

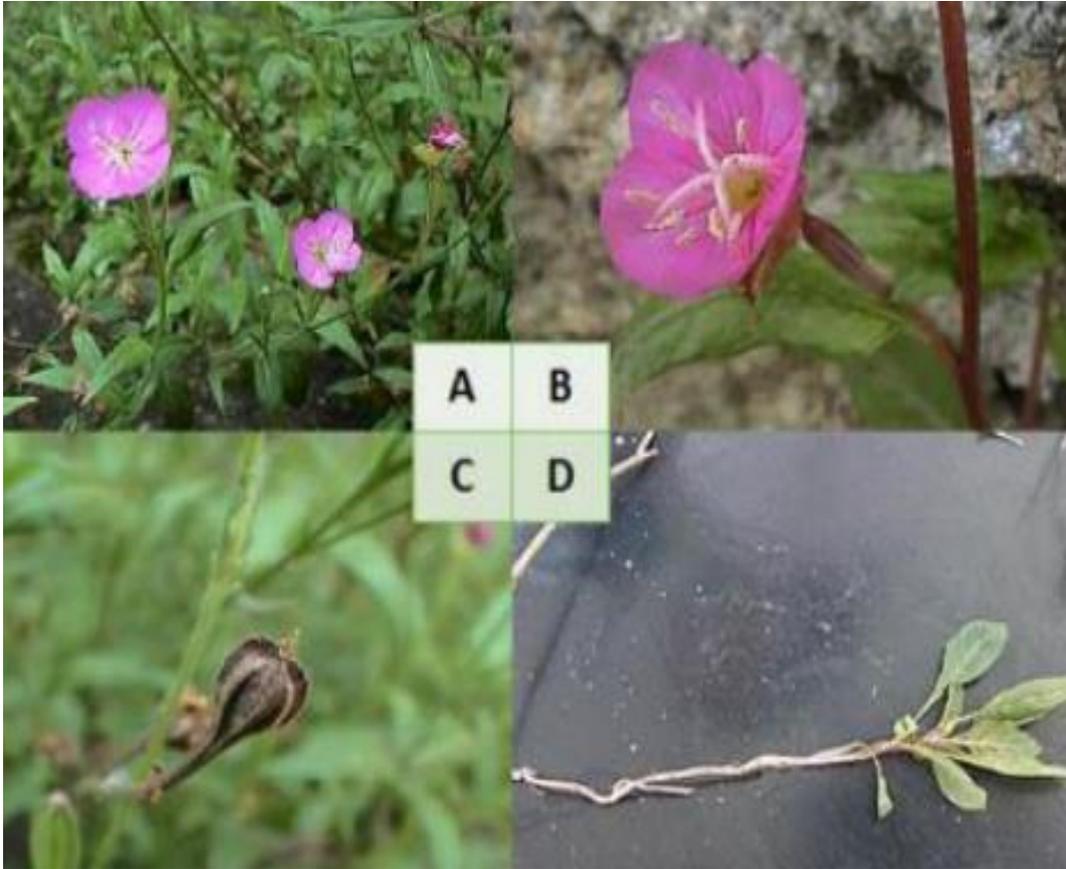
Se aumentó a un número de 10 repeticiones por cada dilución.

ANEXO 02

| | DIAMETRO DE HALO (mm) | | | | | |
|----------------------------|------------------------------|------------|------------|-------------|---|-----------------------------|
| | CONCENTRACIONES % | | | | | |
| CODIGO (PLACA) | 40% | 60% | 80% | 100% | CONTROL POSITIVO (DICLOXACILINA) | CONTROL NEGATIVO |
| 1 | 00 | 00 | 7.5 | 11.5 | 16.7 | 00 |
| 2 | 00 | 00 | 7.5 | 11.6 | 16.5 | 00 |
| 3 | 00 | 00 | 7.4 | 11.6 | 16.6 | 00 |
| 4 | 00 | 00 | 7.4 | 11.6 | 16.6 | 00 |
| 5 | 00 | 00 | 7.6 | 11.6 | 16.6 | 00 |
| 6 | 00 | 00 | 7.5 | 11.5 | 16.7 | 00 |
| 7 | 00 | 00 | 7.5 | 11.6 | 16.5 | 00 |
| 8 | 00 | 00 | 7.4 | 11.6 | 16.6 | 00 |
| 9 | 00 | 00 | 7.4 | 11.6 | 16.6 | 00 |
| 10 | 00 | 00 | 7.6 | 11.6 | 16.6 | 00 |

ANEXO 03

PLANTA DE *Oenothera rosea* "YAWAR SOQO"



| | |
|---|--------|
| A | tallo |
| B | flores |
| C | fruto |
| D | hojas |

CONSTANCIA DE APROBACIÓN PARA EJECUCIÓN DE PROYECTO DE TESIS EN INSTALACIONES
DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Av. Independencia S/Nº - Ciudad Universitaria "Los Módulos"



EL QUE SUSCRIBE; DOCENTE DEL LABORATORIO
DE QUÍMICA DE LA SALUD DE LA ESCUELA
PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE
HUAMANGA,

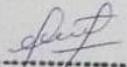
HACE CONSTAR:

Que, el **Sr. Emmanuel Yauli Ñaupas** estudiante de la Escuela Profesional de Medicina de la Facultad de Ciencias de la Salud de la **Universidad César Vallejo** como indica su identificación, viene ejecutando el proyecto de tesis "**Eficacia antibacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Oenothera rosea* "yawar soqo", sobre cepas de *staphylococcus aureus* comparado con dicloxacilina, *in vitro***" en los ambientes del laboratorio de química de la salud de la **Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica** de la UNSCH, la misma que estará bajo mi responsabilidad el monitoreo y asesoramiento durante el proceso de ejecución del proyecto de tesis.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado, para los fines pertinentes.

Ayacucho, 4 de diciembre de 2017.




Farmacia y Bioquímica - UNSCH
Q.F. Américo Quinteros Quispe
DOCENTE

ANEXO 05
CERTIFICADO DE AUNTENTICIDAD DE "*Oenothera rosea*"



EL DOCENTE DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA

CERTIFICA

Que el Sr. Emmanuel Yauli Ñaupas ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis, dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist A. 1988 y es como sigue:

| | | |
|-----------|---|------------------------|
| DIVISIÓN | : | MAGNOLIOPHYTA |
| CLASE | : | MAGNOLIOPSIDA |
| SUB CLASE | : | RUSIDAE |
| ORDEN | : | MYRTALES |
| FAMILIA | : | ONAGRACEAE |
| GÉNERO | : | <i>Oenothera</i> |
| ESPECIE | : | <i>Oenothera rosea</i> |
| N.V. | : | "Yawar sogo" |

Se expide la certificación correspondiente a solicitud del interesado para los fines que estime conveniente.

REBELINO ACUÑA MARTÍNEZ
BIOLOGO
CSP: 9658

ANEXO 06

1. SECADO, SELECCIÓN Y MOLIENDA DE LAS HOJAS DE *Oenothera rosea* "YAWAR SOQO"

Se recolectará al azar 1,0 Kg de hojas frescas de *Oenothera rosea*, las cuales no muestren ningún daño mecánico ni biológico y que alcanzaron un buen desarrollo biológico.

Para el tratamiento inicial de la muestra se seguirá los siguientes pasos:

- ✓ Se seleccionará las hojas en buenas condiciones.
- ✓ Se lavaran con abundante agua para eliminar los componentes de contaminación.

Las hojas de la especie vegetal serán sometidas a un tratamiento de limpieza y selección para eliminar todo elemento extraño. Luego serán desecados a la sombra extendiéndose apropiadamente durante tres semanas y posteriormente se proseguirá con la estabilización en estufa a 40 °C, por



cuatro horas. Las hojas serán sometidos a molienda, utilizando un mortero de porcelana, obteniéndose un polvo menudo, seco y se pasará a través de un tamiz de 0.6 mm. Se obtendrá una cierta cantidad de gramos de muestra de la cual se guardará en un frasco color ámbar.¹⁵

De estos gramos pulverizados obtenidos en el paso anterior de muestra se colocará en 5 frascos y luego se añadirá alcohol al 20%, 40%, 60%, 80% y 100% (500 mL), se dejará a temperatura ambiente por 07 días, con agitaciones permanentes (sometido a una extracción por maceración). Transcurrido el tiempo se filtra utilizando papel filtro (Watman Nº 02) desechando el residuo. El filtrado se concentrará, evaporando el disolvente a 40 °C en estufa, por espacio de 05 días. De esta forma se obtendrá el extracto hidroalcohólico seco.¹⁶



2. PESADA Y DISTRIBUCIÓN DE LAS HOJAS DE *Oenothera rosea* "YAWAR SOQO" EN CANTIDADES IGUALES PARA LA EXTRACCIÓN HIDROALCOHÓLICA.

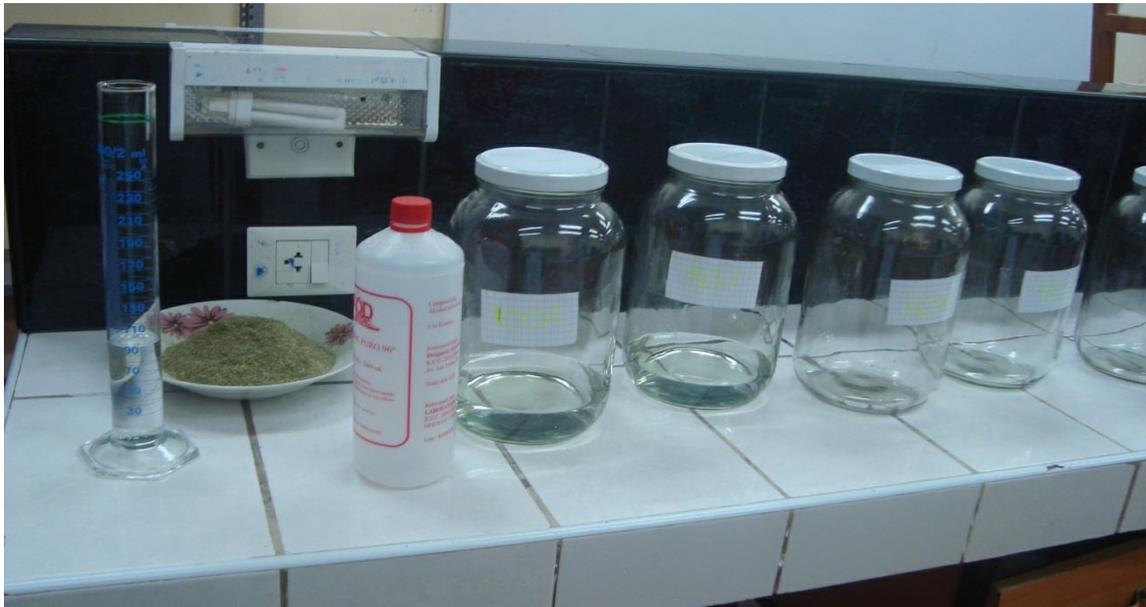
Ahora se realizará la preparación de la solución madre del extracto hidroalcohólico de *Oenothera rosea*, y se realizará de la siguiente manera:



- ✓ Se pesa ciertos gramos del extracto seco de *Oenothera Rosea* que aún está por determinarse según los pasos anteriores, luego se colocará en una fiola de 100 mL, añadiéndole como diluyente agua bidestilada estéril hasta el enrasar adecuadamente, obteniéndose una solución al 100 mg/ml.
- ✓ A partir de esta solución se prepararon las siguientes concentraciones hidroalcohólicas al 40%, 60%, 80% y 100%.



3. PREPARACIÓN DEL SOLVENTE A DIFERENTES CONCENTRACIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE *Oenothera rosea* "YAWAR SOQO"



4. MACERACIÓN HIDROALCOHÓLICA A DIFERENTES CONCENTRACIONES PARA LA EXTRACCIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS DE *Oenothera rosea* "YAWAR SOQO"



5. PREPARACIÓN DEL ANTIBIOGRAMA PARA *Staphylococcus aureus*.

- Se realizó la preparación del antibiograma para *Staphylococcus aureus*, mediante el medio de cultivo Agar Mueller Hinton, para lo que se preparó los discos con el antibiótico dicloxacilina. Preparando una solución concentrada de dicloxacilina en agua destilada. Luego, se esterilizará mediante filtración.
- Se preparó el inóculo por método directo de inoculación a partir de colonias aisladas: el inóculo se extrae mediante suspensión directa de la colonia en el caldo de Mueller-Hinton. Se inoculó la superficie seca de la placa de Mueller Hinton. Para la aplicación de los discos se colocaron discos individuales sobre la superficie del agar. La lectura será a las 16 -18 horas.
- Se determinó la actividad bacteriana del extracto, mediante el uso de la técnica de difusión.
- Se realizó la lectura de las placas e interpretación de los resultados, mediante la lectura en mm (usando regla milimetrada).
- Se debe mantener iluminada la parte posterior de la placa Petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro. La luz usada será transmitida, manteniendo la placa arriba de la luz para examinar un posible ligero crecimiento de las cepas resistentes a dicloxacilina. Teniendo la precaución de conservar la placa siguiendo una vertical directa para evitar una lectura errónea de las marca de la regla por efecto del paralelismo. El punto final debe tomarse como el área que no muestra un crecimiento obvio, visible, que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona.

6. PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN ANTIBACTERIANA.

Se procedió a activar las cepas sembrando una azada de cada microorganismo en placas de Petri conteniendo Agar Trypticase Soya (TSA). Se incubaron a 37 °C por 24 horas.

Para la prueba de sensibilidad se utilizó el agar Mueller Hinton preparado en placas con un grosor de 4 mm, se rotula el nombre del *Staphylococcus aureus* de prueba. Seguidamente se procedió a realizar 04 excavaciones equidistantes en el Agar Mueller Hinton con punch de 06 mm de diámetro. Realizándose diez repeticiones.

La evaluación de los resultados mediante la lectura en mm (usando regla milimetrada) del diámetro del halo de inhibición del crecimiento de todo microorganismo. Los diámetros de inhibición serán interpretados. Halo de inhibición actividad antimicrobiana, sin halo de inhibición sin actividad antimicrobiana.

Lectura de Resultados

| VALORES DEREFERENCIA DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | | |
|---|---|------------|----------|
| | Diámetro de inhibición (mm) | | |
| | RESISTENTE | INTERMEDIO | SENSIBLE |
| DICLOXACILINA | ≤ 10 | 11 – 12 | ≥ 13 |

Fuente: Estándar M100-S25 del CLSI.

ANEXO 07

PROCEDIMIENTO EN PLACAS PETRI

