

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS FLORES DE MANZANILLA (*Matricaria chamomilla*) FRENTE A CEPAS DE *Streptococcus pyogenes* ATTC 19615, IN VITRO”

**Tesis para optar al Título Profesional de Químico
Farmacéutico y Bioquímico**

TESISTAS:

**Bach. MARIBEL ROXANA MORENO OLARTE
Bach. GUISELLA YESENIA NUÑEZ GABRIEL**

ASESOR:

Mg. Q.F. LUIS ALEJANDRO ROA CHUNGA

**LIMA – PERÚ
2018**

TÍTULO:

**“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE LAS FLORES DE MANZANILLA
(*Matricaria chamomilla*) FRENTE A CEPAS DE *Streptococcus
pyogenes* ATTC 19615, IN VITRO”**

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos, por su amor, su apoyo incondicional y ánimo constante, que siempre me ofrecen con lo cual he podido lograr uno de mis objetivos, que es ser profesional

AGRADECIMIENTO

A mis maestros universitarios por consolidar en mí la base de conocimientos y actitudes para mi vida como profesional.

A mi asesor Químico Farmacéutico Luís Roa Chunga, por su permanente disposición e incondicional apoyo, y por compartir sus conocimientos, tiempo y dedicación a esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria

Agradecimiento

Índice General

Índice de Tablas

Índice de Figuras

Índice de Anexos

Resumen

Abstract

Introducción	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
1.1 Descripción de la realidad problemática.....	3
1.2 Identificación y formulación del problema.....	4
1.2.1 Problema general.....	4
1.2.2 Problema específicos.....	4
1.3 Objetivos de la investigación	5
1.3.1 Objetivo general	5
1.3.2 Objetivos específicos	5
1.4 Justificación de la investigación	5
1.5 Limitaciones de la investigación	6
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	7
2.1 Antecedentes de la investigación	7
2.1.1 Antecedentes nacionales	7
2.1.2 Antecedentes internacionales	9
2.2 Bases teóricas.....	11
2.2.1 Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>).....	11
2.2.1.1 Descripción botánica de la Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>).....	11
2.2.1.2 Habidad y distribución.....	12
2.2.1.3 Ubicación taxonómica.....	12

2.2.1.4	Composición química de Manzanilla	12
2.2.1.5	Principios activos	14
2.2.2.	Extractos	14
2.2.2.1	Definición de extractos.....	14
2.2.2.2	Clasificación de extractos	15
2.2.3.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	16
2.2.3.1	Taxonomía.....	16
2.2.3.2	Características morfológicas.....	16
2.2.4.	Faringoamigdalitis bacteriana	16
2.3	Formulación de hipótesis.....	17
2.3.1	Hipótesis general	17
2.3.2	Hipótesis específicas	17
2.4	Operacionalización de variables e indicadores	17
2.5	Definición de términos básicos	18
 CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....		21
3.1	Tipo y nivel de investigación.....	21
3.2	Diseño de la investigación.....	21
3.3	Población y muestra	22
3.3.1	Población	22
3.3.2	Muestra	22
3.4	Técnica de Procesamiento y Análisis de Datos.....	22
3.5	Técnicas de procesamiento y análisis de datos	22
3.5.1	Procedimiento experimental	22
3.6	Metodología	23
3.6.1	Preparación del pulverizado.....	23
3.6.2	Obtención del extracto	23
3.6.3	Cepa bacteriana.....	26
 CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS		30
4.1	Procesamiento de Datos: Resultados	30
4.2	Contrastación de hipótesis	39
4.3	Discusión de resultados	39

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	40
5.1 Conclusiones.....	40
5.2 Recomendaciones.....	41
Referencias Bibliográficas	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1	Interpretación de la cantidad de metabolitos presentes.	30
Tabla N° 2	Lectura de la investigación del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcoholico de las flores de Manzanilla (<i>Matricaria chamonilla</i>).	31
Tabla N° 3	Registro Microbiológico de la inhibición de miel sobre <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615.	31
Tabla N° 4	Estadística descriptiva de las medias de los halos de inhibición obtenidos de los diferentes extractos.	32
Tabla N° 5	Prueba de homogeneidad de varianzas de las medias de los halos de inhibición obtenidos de los diferentes extractos.	32
Tabla N° 6	Prueba de ANONVA One Way de las medias de los halos de inhibición obtenidos de los diferentes extractos.	33
Tabla N° 7	Comparaciones múltiples de las medias de los halos de inhibición obtenidos de los diferentes extractos.	34
Tabla N° 8	Subconjunto homogéneo Prueba de Tukey de las medias de los halos de inhibición obtenidos de los diferentes extractos.	35
Tabla N° 9	Medidas de los halos de inhibición, valor de la mediana, media, desviación estándar e intervalos de confianza.	36
Tabla N° 10	Efecto inhibitorio in vitro del extracto hidroalcoholico de las flores de manzanilla sobre <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 según la escala de Duraffourd.	37
Tabla N° 11	Resumen 95% del Intervalo de Confianza con el post-test de comparación múltiple de Dunnett. Intervalo de confianza 95%.	38

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Figura N° 1	Flujograma de la extracción del extracto de las flores de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>)	24
Figura N° 2	Media de los halos de inhibición El Grafico 1 muestra la media de los halos de inhibición donde se puede apreciar un halo superior de la concentración de 50% seguido de las concentraciones 30% y 10%.	37
Figura N° 3	Efecto inhibitorio in vitro del extracto hidroalcohólico de las flores de manzanilla sobre <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615.	38

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Matriz de consistencia.....	48
Anexo 2	Certificado obtención de cepas ATCC 19615	50
Anexo 3	Factura de la cepa <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC	52
Anexo 4	Constancia por haber realizado la parte experimental	54
Anexo 5	Ficha de recolección de datos.....	56
Anexo 6	Preparación del extracto hidroalcoholico de las flores Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>).....	57
Anexo 7	Reconstitución de la cepa <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC®19615.....	61
Anexo 8	Determinación de la actividad antibacteriano de las Flores de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) frente a <i>Streptococcus pyogenes</i> mediante la técnica difusión en pozos de agar	64

RESUMEN

El Objetivo de este estudio fue determinar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las inflorescencias de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) en relación a cepas de la *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, in vitro.

Para determinar la actividad antibacteriana se utilizó el método de difusión en pozos, se obtuvo las flores Manzanilla de puestos de mercados del distrito de la Victoria Lima-Perú ;y se realizó diluciones para obtener concentraciones de 10%,30% y 50%,las tres concentraciones se colocó en una placa de agar de Mueller - Hilton, que previamente fue sembrada con una suspensión de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 a una turbidez 0.5 de la escala de McFarland.se incubó las placas en condiciones de anaerobiosis y luego se midió los halos de inhibición después de 24 horas.Se observó halos de inhibición (mm) en las concentraciones de 10% (11.2810 ± 0.7743); 30% (17.1440 ± 1.2933); 50% (21.014 ± 0.9046), siendo la concentración del 50% el que presente el mayor efecto antibacteriano con un nivel de significancia del 95% y un error relativo del 5%.

Palabras clave: efecto antibacteriano, *Streptococcus pyogenes*, Manzanilla, halo de inhibición.

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the antibacterial effect of the hydroalcoholic extract of the inflorescences of Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) in relation to strains of *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, in vitro.

In order to determine the antibacterial activity, the well diffusion method was used, the Manzanilla flowers were obtained from market stalls in the district of Victoria Lima-Peru, and dilutions were made to obtain concentrations of 10%, 30% and 50%. Three concentrations were placed on a plate of mueller-Hilton agar, which was previously seeded with a suspension of *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 at a turbidity 0.5 of the McFarland scale. The plates were incubated under conditions of anaerobiosis and then the halos of inhibition after 24 hours. Halos of inhibition (mm) were observed in the concentrations of 10% (11.2810 ± 0.7743); 30% (17.1440 ± 1.2933); 50% (21.014 ± 0.9046), being the 50% concentration the one with the highest antibacterial effect with a level of significance of 95% and a relative error of 5%.

Key words: antibacterial effect, *Streptococcus pyogenes*, Chamomile, inhibition halo.

INTRODUCCIÓN

Los niños entre 3 y 12 años de edad son altamente vulnerables a infecciones bacterianas. Frente a ello, resultan conocidos los diversos inconvenientes en lo que a recurrir a antibióticos se refiere, como por ejemplo la llamada resistencia bacteriana o resistencia a los antibióticos. Por ello se hace necesaria la reconsideración de una farmacopea de origen vegetal.

Las propiedades antibacterianas de las inflorescencias de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*), resultan conocidas; sin embargo, no se cuentan con datos de mayor precisión que den cuenta de su efecto específico sobre *Streptococcus pyogenes*.

El *Streptococcus pyogenes* 19615 es uno de los patógenos humanos más comunes. Este origina diversas enfermedades supurativas y no supurativas. Entre las supurativas, el *S. pyogenes* constituye la causa más frecuente de faringitis bacteriana; aunque produce, asimismo, otitis media; mastitis; infecciones en las capas superficiales de la piel (impétigo); en las capas profundas (erisipela) y en los casos más severos, así como fascitis necrotizante. Las características de este último cuadro clínico explican el apelativo de «bacteria comedora de carne». Dentro de las enfermedades no supurativas encontramos la fiebre reumática y la glomerulonefritis pos estreptocócica.⁽¹⁾

Al analizar la problemática de las diferentes enfermedades causadas por el patógeno, se hace necesario señalar sus causas. Estas se resumen en: pobreza, edad, y ausencia de una cultura sanitaria que pueda conducir, con prontitud, al paciente y sus familiares al tratamiento médico en un centro de salud.

La presente investigación buscó conocer, en lo específico, en qué medida el extracto de flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) inhibe las cepas bacterianas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

Conociendo la inhibición provocada por las flores de Manzanilla será posible proporcionar un tratamiento no farmacológico a las personas más vulnerables a la bacteria, como por ejemplo a las que sufren de faringoamigdalitis. Por otra parte,

una farmacología novedosa podría verse potenciada con una medicación basada en esta fuente vegetal.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Para la presente investigación, el problema planteado incluye las siguientes características:

1.1 DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

Actualmente, la infección respiratoria aguda por *Streptococcus pyogenes* o *Estreptococcus β -hemolítico* es una de las más frecuentes en nuestro medio. Esta sigue siendo la principal causa de la enfermedad de faringoamigdalitis en todas las edades; siendo que, usualmente, los reportes dan cuenta de una incidencia de entre 20 y 30% a nivel de las diferentes faringoamigdalitis en niños. Además, entre un 5 y un 15% en adultos muestran una mayor incidencia de los síntomas durante la época de invierno. Asimismo, la faringitis originada en *Streptococcus pyogenes* se expresa en más de un 50% en infantes menores a los 15 años de edad. Esta se constituye en una cifra relativamente alta, dejando en evidencia la necesidad de un diagnóstico más oportuno.⁽²⁾

La necesidad de un diagnóstico diferenciado en materia de etología del mal es uno de los mayores inconvenientes a los que el diagnóstico médico se enfrenta, en busca de la obtención del diagnóstico más adecuado. La prescripción de antibióticos puede resultar, en muchos casos, inadecuada. El tipo de infección explica la inducción al error en la prescripción de un

antibiótico en nuestro medio. Ello explica una tasa aproximada a un 80% en prescripciones erradas. Así y en lo que a resistencias se refiere, los efectos secundarios en la salud del paciente conllevan no sólo a un deterioro en su salud, sino que implican un incremento negativo en su economía sanitaria.⁽³⁾

Frente a las complicaciones expuestas, las inflorescencias de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) se constituyen en una clara alternativa antibacteriana.

1.2 IDENTIFICACIÓN Y FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1 Problema general

¿Cuál es el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) frente a cepa de *Streptococcus pyogenes* ATTC 19615, in vitro?

1.2.2 Problemas específicos

1. ¿De qué manera la concentración del extracto hidroalcohólico de las flores de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) al 10 % tiene efecto antibacteriano frente a cepa de *Streptococcus pyogenes* ATTC 19615, in vitro?
2. ¿De qué manera la concentración del extracto hidroalcohólico de las flores de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) al 30 % tiene efecto antibacteriano frente a cepa de *Streptococcus pyogenes* ATTC 19615, in vitro?
3. ¿De qué manera la concentración del extracto hidroalcohólico de las flores de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) al 50 % tiene efecto antibacteriano frente a cepa de *Streptococcus pyogenes* ATTC 19615, in vitro?

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.3.1 Objetivo general

Determinar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) frente a cepa de *Streptococcus pyogenes* ATTC 19615, in vitro.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto antibacteriano de extracto hidroalcohólico de las flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) al 10% frente a cepa de *Streptococcus pyogenes* ATTC 19615, in vitro.
2. Determinar el efecto antibacteriano de extracto hidroalcohólico de las flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) al 30% frente a cepa de *Streptococcus pyogenes* ATTC 19615, in vitro.
3. Determinar el efecto antibacteriano de extracto hidroalcohólico de las flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) al 50% frente a cepa de *Streptococcus pyogenes* ATTC 19615, in vitro.

1.4 JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La presente investigación busca dar a conocer el grado de acción bactericida de la Manzanilla (*Matricaria chamomilla* (L.) Rydb.) Diversos sustentos técnicos en relación a sus propiedades curativas y farmacológicas de esta especie vegetal así lo testifican. La Manzanilla muestra indicios de una acción natural bactericida contra enfermedades bacterianas a nivel respiratorio. En tal sentido, notorio es el caso de la faringoamigdalitis aguda, dolencia altamente frecuente en nuestro medio. Por esta razón, la mayoría de los médicos prescriben antibióticos para dolencias como esta. Esto puede conducir a los temidos efectos por resistencia a los antibióticos, sobre todo en niños; así como, en general, a un incremento en la resistencia bacteriana. En cuanto al estreptococo se refiere, no se cuenta con pruebas rápidas para

su detección. De contar con ello, podría disminuirse su incertidumbre diagnóstica.⁽⁴⁾

El *Streptococcus pyogenes* es responsable de 616 millones de casos de infección a nivel de la faringe (faringitis, amigdalitis, etc.) al año en el mundo. Diferentes estudios en niños muestran que aproximadamente el 30% de las faringoamigdalitis presentes entre edades de 2 y 3 años de edad son causadas por esta bacteria.⁽⁵⁾

Para el caso del impétigo, esta es una dolencia más frecuente en latitudes y zonas tropicales que en otras. Prospera en períodos estacionales de altas temperaturas. Su transmisión se produce por contacto directo; siendo su período de incubación el comprendido entre 7 y 10 días. Se requiere de un trauma para que se produzca la enfermedad.⁽⁵⁾

La presente investigación busca abrir más campos en la industria farmacéutica, de manera que logren generarse propuestas innovadoras para una industria farmacéutica natural, en busca de las más convenientes alternativas para los tratamientos de las vías respiratorias.

1.5 LIMITACIONES DE LA INVESTIGACIÓN

Se considera en la investigación con las diversas limitaciones:

- La presente investigación tuvo como limitación el retraso para poder obtener cepas ATCC estudio (*Streptococcus pyogenes*).ya que fueron importadas teniendo como tiempo de entrega 30 días
- Otra limitación fue la dificultad para poder obtener las cepas debido a que no se encontraron en el INS (Instituto Nacional De Salud), ni en hospital Cayetano Heredia por lo que se retrasó el inicio de la parte experimental.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

A continuación, se expone el marco teórico sobre el cual se sostiene la presente investigación.

2.1 ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

Los antecedentes nacionales e internacionales son los siguientes:

2.1.1 Antecedentes nacionales

Cosco Robles (2010) mediante su investigación: "Actividad inhibitoria del crecimiento de *Streptococcus mutans* y de flora mixta salival por acción del aceite esencial de la *Matricaria chamomilla*, manzanilla", señala que el *Streptococcus mutans*, la bacteria que ocasiona la caries dental, requiere de varias medidas para su eliminación. Así, un incremento en el uso de plantas medicinales resulta conveniente para el tratamiento de afecciones dentobacterianas.⁽⁶⁾

Rengifo Penadillos (2009) desarrollando un estudio experimental enfocado en la determinación de la actividad antibacteriana in vitro de extractos de *Piper aduncum* sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, evaluó extractos de tipo acuoso, metanólico, clorofórmico y diclorometánico. En el extracto acuoso quedó evidenciada la presencia de flavonoides y saponinas; en el extracto metanólico la de alcaloides y flavonoides; en el

extracto clorofórmico de triterpenoides; mientras que en el extracto diclorometánico la de alcaloides y triterpenoides. El procedimiento para la extracción de extracto acuoso logró ser fraccionado mediante la metodología de la cromatografía flash. La caracterización de las fracciones se llevó a cabo por espectroscopía UV-VIS, IR y ¹H-NMR, así como por métodos GC/MS. En este último caso se encontraron flavonoides. Asimismo, se llevaron a cabo ensayos de la actividad antibacteriana de los diferentes extractos así como de las fracciones del extracto acuoso, siempre en relación a cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. El extracto acuoso mostró la actividad más sobresaliente y el extracto metanólico actividad moderada, mientras que los extractos diclorometánico y clorofórmico expresaron muy escasa actividad. Mediante esta investigación las fracciones del extracto acuoso y las de la fracción B produjeron una mayor actividad que la fracción A.⁽⁷⁾

Chillón Quispe, (2015) estudiando el “Efecto inhibitorio in vitro de *Rosmarinus officinalis* L. (romero) comparado con penicilina y sobre cepas de *Streptococcus pyogenes*”, halló un significativo efecto inhibitorio in vitro. Como resultados experimentales se encontraron diferencias significativas respecto a una inhibición de cepas de *Streptococcus pyogenes* por efecto de distintas concentraciones del extracto, más en lo específico, en lo que a concentraciones de 50% y 75% se refiere.⁽⁸⁾

Jáuregui Álvarez, (2013) mediante el estudio: “Efecto antibacteriano in vitro del colutorio a base de *Matricaria chamomilla* (manzanilla) a diferentes concentraciones sobre la cepa ATCC 2652263 de *Streptococcus mutans*”, determinó la eficacia de tres colutorios de inflorescencias de manzanilla a diferentes concentraciones, todas sobre cepas de *Streptococcus mutans*, siendo que no se evidenció una alta diferencia entre los mencionados tres colutorios.⁽⁹⁾

Zuta Arroyo, (2014) en su trabajo: “Actividad antibacteriana in vitro de extractos de *Piper angustifolium* (matico) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en cepas de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple”, determinó la eficacia de la actividad antibacteriana de hojas de matico e inflorescencias de manzanilla sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. Tratándose de una bacteria multirresistente el extracto que contó con una mayor actividad antibacteriana en relación a la bacteria fue el preparado de *Piper angustifolium*, aunque sin diferencias estadísticas significativas respecto al de *Matricaria chamomilla*.⁽¹⁰⁾

2.1.2 Antecedentes internacionales

Rojas Camacho & Villca Vega (2011) mediante su investigación: “Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del ajo (*Allium sativum*) contra *Streptococcus pyogenes* mediante el método por dilución”, estudiaron la actividad antimicrobiana del ajo (*Allium sativum*). Este trabajo, de carácter tanto prospectivo como descriptivo, describió cómo fue la actividad antibacteriana in vitro del ajo sobre la cepa ATCC 19615 de *Streptococcus pyogenes*, siendo que hubo óptimos resultados con el extracto etílico. Para la consecución de los resultados, la concentración mínima inhibitoria del extracto etílico corresponde a los 12 mg/ml. Además, se emplearon tres solventes, los que correspondieron a agua destilada, éter de petróleo entre 60-80 °C, y etanol a 96°C de temperatura, en busca de una actividad antibacteriana del ajo contra el *Streptococcus pyogenes*. Para la obtención del macerado de ajo se hizo uso de 3 tipos de solventes de distinta polaridad, como son: agua destilada estéril; éter de petróleo de entre 60-80 °C; y etanol a 96°C. Se utilizó ajo (*Allium sativum*) de la Variedad Colorada. Para el reconocimiento y verificación del *Streptococcus pyogenes* se empleó el antibiótico Bacitracina.⁽¹¹⁾

Llapa Y, Luna C, Macao C, (2013) estudiaron la “Prevalencia de faringoamigdalitis aguda estreptocócica mediante el test de detección rápida

del antígeno de *Streptococo beta hemolítico* y los factores asociados en pacientes entre 5 y 19 años en el Centro de Salud N° 1 de Cuenca”, en Ecuador. Estos investigadores encontraron una prevalencia de la faringoamigdalitis en un determinado grupo de personas. Entre los más afectados se observó que los niños y adolescentes son más susceptibles a la enfermedad. La estadística levantada sugirió que los inconvenientes se originaron en una deficiente disposición de medicinas y una baja condición económica entre los afectados, así como en otros factores asociados a esta infección respiratoria. Se desarrollaron metodologías diversas para una detección perentoria con una inmediata observación del *Streptococcus beta hemolítico*.⁽¹²⁾

Astudillo Sánchez (2013) estudiando la prevalencia del *Streptococcus beta hemolítico del grupo A* sobre paciencias de 5 a 15 años diagnosticados con faringoamigdalitis bacteriana, encontró que en el Hospital de la Policía Nacional de la ciudad de Guayaquil, Ecuador, se produce un desmedido uso de antibióticos, siendo los niños de tres años los más afectados. Debido a un uso inadecuado así como por una ausencia de cultura sanitaria, los niños menores a los tres años de la muestra, no fueron, al momento del estudio, nunca remitidos a un centro de salud; de manera que tratándose de algunos de los más afectados, estos niños menores a 3 años fueron reconocidos con faringitis, tratándose por ello de un mal diagnóstico.⁽¹³⁾

Collantes Mendoza (2014) mediante su investigación: “Infecciones respiratorias agudas en niños menores de 10 años que llegan a la emergencia del hospital Federico Bolaños Moreira y sus factores de riesgo clínico epidemiológicos”, en Ecuador, confirmó que las infecciones respiratorias son causadas, principalmente, por virus y bacterias. La frecuencia de muertes estadísticamente cuantificadas estuvo dirigida a niños menores a diez años de edad. A manera de conclusión se sostuvo que una promoción de la prevención resulta necesaria para promover la prevención y evitar consultas por infecciones respiratorias como la faringoamigdalitis. La

investigación, asimismo, determinó que los factores notorios de riesgo fueron: la falta de lactancia materna; bajo peso; hacinamiento; falta de recursos económicos; y escaso nivel educativo.⁽¹⁴⁾

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 Manzanilla (*Matricaria chamomilla*)

2.2.1.1 Descripción botánica de la manzanilla (*Matricariachamomilla*)

Se trata de una especie botánica herbácea, de arquitectura erecta y de amplia difusión geográfica. Es posible encontrarla prácticamente en cualquier ubicación: desde parcelas secas y pedregosas hasta praderas. Por altitud suele encontrarse hasta los 500 msnm. Tiene un tallo erguido que puede alcanzar los 60 cm de altura. Su raíz es pivotante perenne, articula y fibrosa.

El tallo de la manzanilla alcanza entre los 40 y 70 cm de altura, siendo muy ramificada en la parte alta. Es de forma redondeada y hueca.

Sus hojas son alternas, pinnadas y sectas. El color de estas es verde claro, con incisiones muy profundas.

Sus flores son perfectas; es decir, hermafroditas (hay órganos de reproducción femenina y masculina), asociadas en capítulos con pedúnculos alargados sobre un cáliz vacío. Presente flores externas e internas. Sus flores externas muestran una lígula blanca; mientras que las internas son tubulosas y con una corola amarilla.

Los frutos de la manzanilla son aquenios, indehiscentes (que no se abre) y contienen, cada uno, una sola semilla. Estos frutos son cilíndricos. Asimismo suelen ser muy pequeños, con una longitud de entre 0.3 a 5.5 mm. A la sequedad, el fruto forma la colina del receptáculo, logrando ser más cónico⁽¹⁵⁾

2.2.1.2 Hábitat y distribución

La manzanilla es nativa de la región de los Balcanes, desde donde se difundió al resto de Europa. Su alto nivel adaptativo ha hecho que se haya naturalizada en varias regiones del continente americano. Su cultivo se encuentra, prioritariamente, hacia la industria. Se desarrolla con facilidad en suelo con buen drenaje y alta luminosidad. Tiene buena resistencia a las heladas, y tolera niveles relativamente bajos en fertilidad y acidez del suelo. Fue introducida por los españoles en Perú en 1928, como insecticida.⁽¹⁶⁾

2.2.1.3 Ubicación taxonómica

Nombre científico: *Matricaria chamomilla* (L.) Rydb.

Taxonomía:

División: ANGIOSPERMAE

Clase: DICOTYLEDONES

Orden: SYNANDRAE

Familia: ASTERACEAE

Género: *Matricaria*

Especies: *Matricaria chamomilla*; *Matricaria recutita*

Nombre Vulgar: "Manzanilla"

2.2.1.4 Composición química de la manzanilla

Aceite esencial (0,3%-1,5%): Es el componente más relevante, y se obtiene de la región superior de la planta. El aceite esencial forma parte del grupo lipofílico. Conforme a la farmacopea argentina, la droga no deberá contener más de un 10% de materia fresca de la planta, ni más de un 2% de materia orgánica extraña. La Farmacopea Británica exige un contenido de aceite esencial entre 0.25 y 0.70%. La mayoría de su esencia (más del 50% del total), expresa la siguiente composición:

Azulenos (26-46%): El principal es el camazuleno (6-15%) y en menor medida guajazuleno. Se trata de un aceite volátil. Este otorga a la esencia un color azulado. Esta coloración surge por acción del calor durante el proceso de extracción. Esta es la razón por la que dicha característica no se expresa a la preparación convencional de su infusión.

Sesquiterpenos: Posee los siguientes compuestos: a-bisabolol (10-25%) y derivados (bisabolóxidos A, B y C, bisabonlonóxido A).

Lactonas sesquiterpénicas: Matricarina y desacetilmatricarina. La matricina sería, asimismo, una precursora del camazuleno.

Flavonoides (1-3%): Junto con los mucílagos constituye el grupo hidrofílico de la droga. En la manzanilla han sido identificadas numerosas flavonas y flavonolesmetoxilados, como por ejemplo la apigenina (0.25 a 42%) y la quercetina, con sus correspondientes glucósidos (7 - glucosil - apigenina y 7-glucosil quercetina). Asimismo la apiína, la luteolina, el lisorhamnetol, la rutina y la patuletina, entre otros, forman parte de los flavonoides de la manzanilla.

Cumarinas: Las principales cumarinas de la manzanilla son la dioxicumarina, la umbeliferona y la herniarina

Otros: Asimismo y en proporciones menores, en la manzanilla encontramos: ácido valeriánico; ácido ascórbico; ácido angélico; ácido salicífico; ácidos grasos diversos; diversos taninos; mucílagos urónicos (10%); esteroides derivados del estigmasterol; mucopolisacáridos; principio amargo (ácido antémico), xiloglucuranos; sales minerales (8-10%), triacontano y fitosterina (resinas).⁽¹⁷⁾

2.2.1.5 Principios activos y propiedades

Los principios activos de la manzanilla se basan en: farneseno; spathulenol; (pro) camazufen; (-)-alfa bisabolol; (-) alfa bisabololoxide y (-)-alfa bisabolonoxide.

Estos, contenidos en las inflorescencias de la manzanilla, pueden ser de naturaleza hidrosoluble o liposoluble. Los liposolubles están presentes en los aceites esenciales.

En una infusión se libera de un 10 a un 15% del contenido total de los compuestos activos. En las flores, el aceite esencial oscila entre un 0.4 y un 1 % del peso seco.

La esencia de Manzanilla recién destilada es de color azul. Ello se explica por la presencia de sesquiterpenos. Entre estos destaca el llamado azuleno. El azuleno es el responsable del efecto antiinflamatorio de la Manzanilla. En el aceite, el contenido de azuleno varía entre 1 y 18%. Los aceites con alto contenido de azuleno son producidos por determinadas variedades cultivadas.

Resulta característico que en la Manzanilla y mediando procesos oxidativos, pueda encontrarse el (-)-alfa bisabolol. Mediando procesos análogos, el (-)-alfa bisabolol ingresa, dentro de la planta, buscando formar, como por ejemplo alcoholes secundarios denominados óxido de bisabolol.

Glicósidos sulfurados: En este caso se trata de geninas azufradas. Estas cuentan con propiedades antibióticas. Requieren de un tiempo de maceración de diez minutos en agua tibia, siendo que sólo de esta manera una genina es aislada haciéndose activa.⁽¹⁸⁾

2.2.2 Extractos

Los aspectos relevantes en cuanto a los extractos son los siguientes:

2.2.2.1 Definición de extractos

Son preparados concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia. Se trata de derivados de materia seca vegetal. Estos se

obtienen a la evaporación parcial o total del disolvente en los líquidos extractivos de origen vegetal. Los extractos, según su consistencia y concentración de principio activo, logran ser clasificados como: extractos secos, fluidos, blandos y crio extractos.

2.2.2.2 Clasificación de extractos

Los extractos fluidos: Son extractos de drogas que mereced a la concentración prescrita de etanol, están preparados de forma tal que una parte de droga corresponde a una o dos partes del extracto fluido. Así y de 85 partes de droga seca 100 corresponden a la planta fresca. Por lo general los extractos fluidos se obtienen por percolación.

Los extractos secos: Son aquellos que presentan una consistencia seca. Son fácilmente pulverizables y se consiguen por evaporación del disolvente y desecación del residuo. Los extractos secos no deben presentar un contenido de humedad mayor al 5%. Por otra parte y al tratarse de materia seca, cuentan con una concentración mayor de principio activo que la droga original. En cuanto a su preparación esta puede lograrse de manera muy estable hasta lograrse un preparado de bastante estabilidad y fácil manipulación. Como líquido extractor se utiliza alcohol y agua.

Extractos Blandos: Cuentan con una concentración de principio activo superior a la de la droga original. Su consistencia es semisólida. El solvente suele ser agua o mezcla hidroalcohólica. Los extractos blandos son escasamente estables y resultan difíciles de manipular; por lo que no suelen emplearse.⁽¹⁹⁾

2.2.3 Streptococcus pyogenes

2.2.3.1 Taxonomía

Reino	: Bacteria
Phillum	: Firmicutes
Clase	: Bacilli
Orden	: Lactobacillales
Familia	: Streptococcaceae
Género	: Streptococcus
Especie	: S. pyogenes

2.2.3.2 Características morfológicas

El *Streptococcus pyogenes* pertenece al género *Streptococcus* y se caracteriza por agruparse en cocáceas Gram positivas de 0,5-2 um de diámetro, anaerobios facultativos, crecen en pares o en cadenas en medio líquido, inmóviles, no formadores de esporas, capsulados, requieren medio nutricionalmente rico y una baja tensión de oxígeno para crecer. Su energía la obtienen a través de metabolismo fermentativo, productor principalmente de lactato, pero no de gas. Son catalasa(-). Generalmente atacan glóbulos rojos provocando lisis total (beta hemólisis). El rango de la temperatura de crecimiento varía entre 25 – 45°C (óptima: 37°C) ⁽²⁰⁾

2.2.4 Faringoamigdalitis bacteriana aguda

Según (Almeida A.) La faringoamigdalitis es una de las enfermedades más comunes que se presentan en los niños, y por lo tanto una de las principales causas de consulta en el mundo. Esta infección puede ser causada por virus o bacterias con una evolución menor de 15 días, entre las bacterias el grupo que más la ocasiona es el *Streptococcus pyogenes* o beta hemolítica. ⁽²¹⁾

2.3 FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS

2.3.1 Hipótesis general

Existe efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) frente a cepa de *Streptococcus pyogenes* ATTC 19615, in vitro.

2.3.2 Hipótesis específicas

1. La concentración del extracto hidroalcohólico de las flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) al 10% tiene efecto antibacteriano in vitro frente a cepa de *Streptococcus pyogenes* ATTC 19615.
2. La concentración del extracto hidroalcohólico de las flores de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) al 30% tiene efecto antibacteriano in vitro frente a cepa de *Streptococcus pyogenes* ATTC 19615.
3. La concentración del extracto hidroalcohólico de las flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) al 50% tiene efecto antibacteriano in vitro frente a cepa de *Streptococcus pyogenes* ATTC 19615.

2.4 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES E INDICADORES

VARIABLE	CONCEPTO	INDICADOR	TIPO
V.I: Extracto Hidroalcoholico de las flores de manzanilla(<i>Matricaria Chamomilla</i>)	Sustancia antibacteriana a diferentes concentraciones con propiedades beneficiosas para la salud.	10% 30%,50%	cualitativo
V.D. Efecto antibacteriana <i>in vitro</i>	Capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano de: <i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615) debido a la presencia de extracto hidroalcoholico de Manzanilla	Medición de halos de inhibición expresada en (mm)	Cuantitativo

2.5 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS BÁSICOS

- **Extracto**

Producto sólido o espeso obtenido por evaporación de un zumo o de una disolución de sustancias vegetales o animales. Según el líquido disolvente recibe la calificación de acuoso. ⁽¹⁹⁾

- **Efecto antibacteriano**

Capacidad de matar o destruir o inactivar microorganismos, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena. ⁽²²⁾

- **Bacteriostático**

Un efecto bacteriostático es aquel que aunque no produce la muerte a una bacteria. Impide su reproducción; la bacteria muere sin dejar descendencia. Un efecto bacteriostático está producido por sustancias bacteriostáticas. Estas sustancias son secretadas por los organismos como medios defensivos contra las bacterias. ⁽²³⁾

- **Cepa**

Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento.

- **Eritromicina**

Antibiótico macrólido bacteriostático producido por *Streptomyces erythreus*. La eritromicina A se considera su componente activo principal. En los organismos sensibles, inhibe la síntesis de proteínas mediante la unión a subunidades 50S ribosomales. ⁽²⁴⁾

- **Bacterias Gram Positivas**

Las bacterias Gram positivas se tiñen de color púrpura con la tinción Gram ya que el colorante queda atrapado en la capa de peptidoglucano

(una estructura entrecruzada y gruesa que tiene forma de malla y rodea a la célula).⁽⁴⁹⁾

- **Concentración**

Corresponde al antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana.

- **ATCC**

American Type Culture Collection.

- **Halos de inhibición**

Zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma, es una medida de la potencia del antibiótico frente al germen.

- **Antibacteriano**

El término se refiere a una sustancia cuyas propiedades son capaces de eliminar agentes bacterianos o la inhibición de su crecimiento o proliferación sin incurrir en el daño del objeto, ambiente u organismo que las porta. Son en esencia fármacos como es el caso de los antibióticos u otros agentes químicos capaces de combatir estos cuerpos.⁽²⁵⁾

- **Principio activo**

Sustancia química responsable de la actividad farmacológica y de uso terapéutico de una droga.⁽²⁶⁾

- **Extracto hidroalcohólico**

Son extractos líquidos concentrados, obtenidos de la extracción de una planta o parte de ella, utilizando como solvente alcohol y agua presentan sedimento, color y aroma característicos de la planta de la cual se obtienen.⁽²⁷⁾

- **Bactericida**

Un efecto bactericida es aquel que produce la muerte a una bacteria y está provocado por alguna sustancia bactericida. Los organismos secretan sustancias bactericidas como medios defensivos contra las bacterias. Los antimicrobianos de efecto lísico o lítico (lisis) en las bacterias, provocan una reducción en la población.⁽²⁸⁾

- **Cultivos**

En biología, bacteriología y específicamente en microbiología, un cultivo es un método para la multiplicación de microorganismos, tales como lo son bacterias en el que se prepara un medio óptimo para favorecer el proceso deseado. Un cultivo es empleado como un método fundamental para el estudio de las bacterias y otros microorganismos que causan enfermedades en medicina humana y veterinaria.⁽²⁹⁾

- **Agar**

Polímero sulfatado complejo de unidades de galactosa, extraído del *Gelidium cartilagineum*, *Gracilaria confervoides* y otras algas rojas asociadas. Se usa en forma de gel en la preparación de medios de cultivo sólidos para microorganismos, como laxante, para la elaboración de emulsiones y como medio de soporte para la inmunodifusión y la inmunoelectroforesis.⁽³⁰⁾

- **Microbiología**

La microbiología es la ciencia encargada del estudio y análisis de los microorganismos, seres vivos pequeños no visibles al ojo humano también conocidos como microbios. Se dedica a estudiar los organismos que son sólo visibles a través del microscopio: organismos procariotas y eucariotas simples.⁽³¹⁾

CAPÍTULO III

METODOLOGIA

3.1 TIPO Y NIVEL DE LA INVESTIGACIÓN

De acuerdo a las características y al alcance de los resultados, es un estudio de tipo:

- **Experimental:** Debido a la introducción y manipulación de los extractos para la determinación del efecto antibacteriano.
- **Transversal:** Debido a que el estudio se realizó en un determinado tiempo, ya que las variables fueron observadas en un solo momento después de transcurrir un corto periodo de tiempo con una aproximación de 24 horas después de realizado el cultivo.
- **In vitro:** Debido a que la investigación se lleva a cabo con parámetros controlados, en medios de cultivo que sirven para el desarrollo de las bacterias y se manipulara de manera intencional las condiciones de la investigación.
- **Prospectivo:** ya que la recolección de datos se realizara de acuerdo a la ocurrencia de los hechos.

3.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

La investigación se realizó con medios de cultivo y cepas ATTC (American Type Culture Collection, las cuales fueron importados a través de laboratorios GenLab S.A.C y cultivados en el laboratorio de ecología microbiana de la universidad Nacional Mayor de San Marcos. Para la

recolección de datos, se utilizó una ficha elaborada donde se anotaron los datos obtenidos a través de una medición de los halos con el vernier. Las pruebas fueron realizadas en el Laboratorio de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, entre los meses de Octubre 2017 y noviembre del 2017.

3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1 Población

Flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*)

3.2.2 Muestra

Se utilizará un total diez placas Petri con medio de cultivo Mueller Hinton.

3.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Instrumento de medición de precisión vernier.

3.5 TÉCNICAS DE PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS

3.5.1 Procedimiento experimental

A. Colecta e identificación de la población en estudio

Las Flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) fueron adquiridas en puestos de mercados del distrito de la Victoria Lima-Perú, cuya procedencia es de la provincia de Tarma, departamento de Junín.

B. Microorganismo

Cepa *Streptococcus pyogenes* ATCC®19615, la cual fue importados a través de laboratorios GenLab S.A.C y cultivado en el laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, entre los meses de Octubre 2017 y noviembre del 2017.

3.6 METODOLOGÍA

3.6.1 Preparación del pulverizado

Las flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) fueron recolectadas y limpiadas con alcohol de 70°, luego se procedió a secarlas al ambiente bajo sombra por 14 días; finalmente se llevaron a secar nuevamente en una estufa a temperatura 40°C por 24 horas hasta obtener una muestra totalmente seca y fácilmente triturable. Posteriormente se pulverizó haciendo uso de un molinillo manual hasta obtener un fino polvo. El pulverizado se guardó en un frasco oscuro debidamente etiquetado. Se conservó en un lugar fresco hasta su posterior uso.

3.6.2 Obtención del extracto

El proceso se realizó siguiendo las recomendaciones del protocolo de Chilon S.⁽¹⁵⁾ En un envase estéril de vidrio ámbar de boca ancha se colocó las flores pulverizadas (250 g), luego se añadió un litro medio alcohol 96°, se cerró herméticamente para evitar que el solvente se evapore durante la extracción. Se dejó macerar por 10 días a temperatura ambiente, agitándose dos veces al día. El extracto hidroalcohólico obtenido se lleva a rota vapor con una temperatura de 40°C y presión de 110 milibares para recuperar solvente y obtener el extracto limpio, obteniendo el extracto hidroalcohólico seco correspondiente.

Luego de realizar las diluciones respectivas:

- Extracto hidroalcohólico al 10%: 4ml extracto hidroalcohólico al 60% + 21ml alcohol de 70°
- Extracto hidroalcohólico al 30%: 13ml extracto hidroalcohólico al 60% + 12ml alcohol de 70°
- Extracto hidroalcohólico al 50%: 21ml extracto hidroalcohólico al 60% + 4ml alcohol de 70°

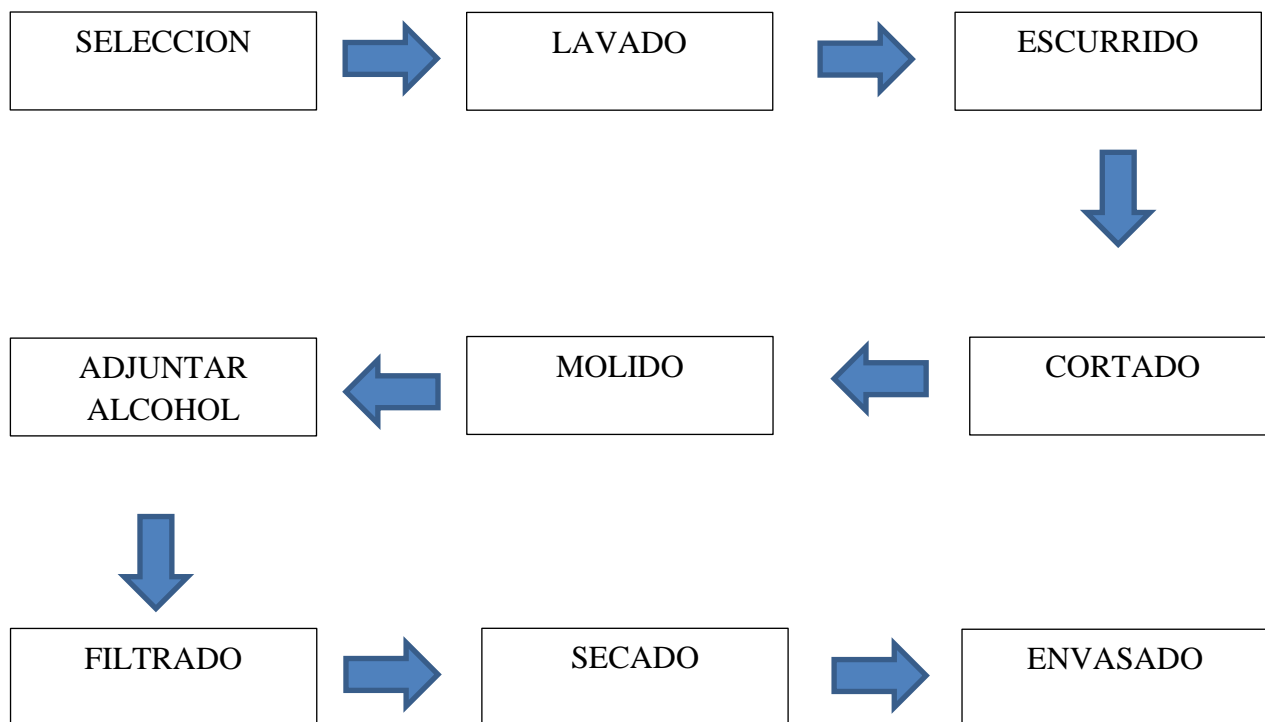


Figura N° 1: Flujograma de la extracción del extracto hidroalcohólico de las flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*)

Marcha Fitoquímica: Identificación de metabolitos secundarios

Se utilizó el extracto hidroalcohólico para la identificación de metabolitos secundarios que incluye reacciones de caracterización química de coloración y precipitación

a) Determinación de taninos

Con gelatina. A 1mL de muestra se agregará 3 gotas de reactivo, en una centrifuga y si queda en el fondo un precipitado de color blanco confirma la presencia de taninos.

Con Cloruro Férrico o Alumbre férrico. A la muestra se agregará unas gotas de cloruro férrico; si se observa una coloración negra azulada nos indicara que el tanino pertenece a los derivados del ácido pirogálico, mientras que la coloración verde nos indicará que deriva de la catequina.

b) Determinación de flavonoides

Con R. Shinoda. En un tubo de ensayo se colocará 1mL de muestra con 1 limadura de magnesio pequeña, con un gotero se añadirá 3 gotas de HCl concentrado. Si se observa un intenso burbujeo por la reacción de las limaduras y la solución va adquiriendo una débil coloración naranja al principio; conforme va reaccionando más, la coloración naranja se va intensificando, hasta que después de 10 minutos la solución tiene un color anaranjado intenso indicara un resultado positivo

c) Determinación de cumarinas

Agregar 1ml de la muestra diluida en un tubo de ensayo, humedecer un papel de filtro en NaOH 10% tapar la boca del tubo, la observación de fluorescencia verde amarillenta bajo la lámpara UV 365 nm indicara la presencia de cumarinas fijas.

d) Determinación de quinonas

Se pesará dos gramos de muestra y se triturara hasta un polvo muy fino en un mortero, luego se realizará los siguientes ensayos químicos:

Solubilidad en NaOH al 5%. En un tubo de ensayo se introducen 10 mg de la muestra, se añade 0,2mL de etanol y 0,4mL de NaOH al 5%. El cambio de coloración indicara la presencia de compuestos quinónicos.

Reacción de Bornträger. Un gramo de muestra se trata con NaOH 5% en caliente, se filtrará, enfriara y se acidulará con HCl 20%, se añadirá benceno, se agitará y se deja en reposo. Luego se separará la fase bencénica a la cual se le añadirá NH₄OH. La formación de una coloración rosada a roja, indicara la presencia de antraquinonas.

e) Determinación de alcaloides

Reactivo de Dragendorff. Coger 1 ml del extracto diluido previamente en alcohol de 70° con ayuda de una pipeta o gotero, agregar a un tubo de ensayo. Adicionarle 0.5 ml de HCl 1% y agitar. Agregamos 0.5 ml de reactivo se observó positivo para este ensayo porque nos dio un precipitado naranja.

Reactivo de Mayer. Se disolverá 1,36 g de HgCl_2 en 60 mL de agua y se adicionará 10 mL de una solución conteniendo 5g de KI y se diluirá hasta un volumen de 100 mL. Al agregar un exceso de reactivo a una solución acidulada de la muestra se deberá observar la aparición de un precipitado de blanco a crema

3.6.3 Cepa bacteriana

Para el estudio de la actividad antibacteriana de extracto hidroalcohólico de las flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) se trabajó con una cepa de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 adquirida en Genlab (anexo N° 3).

a. Reactivación de la cepa bacteriana

Siguiendo las indicaciones del proveedor se procedió a extraer el hisopo que se encontraba en el contenedor de la cepa *Streptococcus pyogenes* ATCC® 19615, se emulsionó en un tubo con Caldo Tripticasa de Soya (TSB) y se incubó a 37°C por 24 a 48 horas en anaerobiosis por el método de la vela en extinción. Al cabo de 48 horas se realizó un repicaje en Agar Sangre (5% de sangre de carnero) y finalmente la cepa fue conservada en un vial con Agar tripticasa de soya (TSA) a 4°C. Certificado de la cepa *Streptococcus pyogenes* ATCC®19615 (anexo N° 7).

b. Identificación bacteriana de *Streptococcus pyogenes* ATCC ® 19615

Para lograr la identificación bacteriana se realizó un frotis bacteriano, que consistió en colocar una gota de agua estéril en el centro de un portaobjetos, luego se flameo el asa de siembra y se tomó en condiciones asépticas una pequeña cantidad del cultivo bacteriano y se transfirió a la gota de agua. Se removió la mezcla con el asa de siembra hasta formar una extensión homogénea. Se dejó secar la preparación, se fijó al calor suave y en seguida se realizó la coloración Gram para la identificación bacteriana. Realizado el frotis y fijadas las bacterias, se realizó el examen microscópico determinando así la forma y el Gram de la cepa bacteriana de *Streptococcus Pyogenes*. (Anexo 10)

c. Prueba de efectividad antibacteriana

c.1. Estandarización de la cepa aislada de *Streptococcus pyogenes*

Se estandarizó la cepa bacteriana según la escala de Mc Farland 0.5, para la cual se extrajeron con un asa de siembra de tres a cuatro colonias de la cepa reactivada de *Streptococcus pyogenes* y se inocularon en 5 ml de suero fisiológico al 0.9 %, se agitó el tubo por 5 minutos, se observó la misma turbidez de la escala de Mc Farland al 0.5. Bajo condiciones estériles se procedió a sembrar con un hisopo el inóculo bacteriano en placas que contenían Agar Mueller Hinton. Las placas se dejaron reposar unos minutos.

c.2. Difusión en agar con pozos

Se elaboraron pozos sobre la superficie de los agares con ayuda de un sacabocados estéril de 6 mm de diametro. Con una micropipeta se colocó 10 µl de extracto hidroalcohólico al 10%, 30% y 50%,

Dimetilsulfóxido (control negativo) y Eritromicina control positivo se dejó reposar por 30 minutos. Posteriormente, se incubaron las placas se incubaron por 48 horas a 37°C en anaerobiosis.

d. Recolección de datos

d.1. Medición del diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano

Para la medición de los halos de inhibición se utilizó un vernier previamente calibrado, con el fin de minimizar errores.

La lectura se realizó midiendo los halos de inhibición incluyendo el diámetro del disco embebido.

Evaluación del Efecto Antibacteriano

La evaluación se realizó tanto cuantitativamente por medición numérica de los halos de inhibición, y cualitativamente tomando como referencia las pautas por Duraffourd.⁽³²⁾

Escala de Duraffourd: Escala utilizada para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio in vitro, según diámetro de inhibición.⁽³²⁾

- Nula (-): para un diámetro inferior a 8 mm.
- Sensibilidad límite (sensible = +): para un diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.
- Medio (muy sensible = ++): para un diámetro entre 14 y 20 mm. - Sumamente sensible (+++): para un diámetro superior a 20 mm.

CAPITULO IV

PRESENTACION Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS

4.1 PROCESAMIENTO DE DATOS: Resultados

Los datos fueron procesados mediante el paquete estadístico Stata (versión 14), con el que se realizó los siguientes procedimientos estadísticos de análisis:

- a) Obtención de medias con su respectiva desviación estándar.
- b) Se presenta los resultados en tablas con su respectiva representación gráfica.
- c) Se considerará un margen de error estadístico de 5%.

Tabla N° 1: Interpretación de la cantidad de metabolitos presentes

Muy abundante	+++
Abudante	++
Moderado	+
Escaso	+/-
ausencia	-

Tabla N° 2: Lectura de la investigación del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcoholico de las flores de manzanilla (*Matricaria chamonilla*)

Ensayo	Reactivo	Resultado
Taninos	Gelatina – cloruro de sodio	+
	Cloruro ferrico	+
Flavonoides	R. Shinoda	+++
Cumarinas	NaOH 10%	+
Quinonas	NaOH 5%	+
	Rx Borntrager	+
Alcaloides	Dragendorff	+
	Mayer	+

Fuente: Ficha de recolección de datos

Ficha De Recolección De Datos Recolección de datos:

Se ha tomado las medidas de los halos de inhibición (en mm).

Tabla N° 3: Registro microbiológico de la inhibición del extracto hidroalcoholico de las flores de manzanilla sobre *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

N° Placa	Control positivo (mm)	Control negativo (DMSO) (mm)	Extracto al 10% (mm)	Extracto al 30% (mm)	Extracto al 50% (mm)
1	37	6	9.67	15.98	21.43
2	38	6	11.53	14.78	20.32
3	39	6	12.32	16.34	19.45
4	35	6	10.09	17.92	21.5
5	38	6	11.54	14.93	22.54
6	34	6	12.00	16.09	21.67
7	35	6	10.43	19.76	20.68
8	37	6	9.98	19.65	23.00
9	37	6	12.02	18.56	20.54
10	37	6	12.93	17.43	19.01

Fuente: Ficha de recolección de datos

Tabla N°4: Estadística descriptiva de las medias de los halos de inhibición obtenidos de los diferentes extractos

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1,00	10	11,2510	1,12608	,35610	10,4455	12,0565	9,67	12,93
2,00	10	17,1440	1,80785	,57169	15,8507	18,4373	14,78	19,76
3,00	10	21,0140	1,26458	,39989	20,1094	21,9186	19,01	23,00
4,00	10	6,0000	,00000	,00000	6,0000	6,0000	6,00	6,00
Total	40	13,8523	5,90681	,93395	11,9632	15,7413	6,00	23,00

Dónde:

- 1 = Extracto al 10%
- 2 = Extracto al 30%
- 3 = Extracto al 50%
- 4 = Control Negativo (DMSO)

En el cuadro adjunto podemos observar la aplicación de la estadística descriptiva a los datos obtenidos, todas las medias se encuentran dentro de los límites establecidos a un intervalo de confianza del 95% y un error relativo del 5% por ello ningún dato se excluye y por ende se aplicará estadística inferencial para determinar si existen diferencias significativas de las medias de cada tratamiento aplicado.

Tabla N°5: Prueba de homogeneidad de varianzas de las medias de los halos de inhibición obtenidos de los diferentes extractos

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
11,622	3	36	,000

Dónde:

H_0 = Las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneos
($P < 0.05$)

H_1 = Las varianzas de los tratamientos aplicados no son homogéneos
($P > 0.05$)

La prueba de homogeneidad de varianzas nos permite determinar si las varianzas de cada tratamiento aplicado son iguales o diferentes estadísticamente, depende de ello para determinar el tipo de prueba estadística inferencial a ser aplicado. Observamos que $P < 0.05$, por lo tanto se concluye que las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneas, rechazando la hipótesis alternativa. Es importante el resultado ya que esto nos permite elegir la prueba estadística inferencial correspondiente que en este caso será la prueba ANNOVA ONE WAY o de un factor.

Tabla N° 6: Prueba de ANNOVA One Way de las medias de los halos de inhibición obtenidos de los diferentes extractos

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1305,506	3	435,169	283,703	,000
Dentro de grupos	55,220	36	1,534		
Total	1360,726	39			

Dónde:

H_0 = No existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ($P > 0.05$)

H_1 = Existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados
($P < 0.05$)

La prueba ANNOVA One Way nos permite descifrar si existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados comparando la media de cada uno de ellos. Al observar el resultado ($P < 0.05$) se afirma la hipótesis alternativa, es decir, existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. Si deseamos determinar que medias son estadísticamente diferentes se debe aplicar pruebas POST HOC, en este caso se aplicará la prueba de TUKEY.

Tabla N° 7: Comparaciones múltiples de las medias de los halos de inhibición obtenidos de los diferentes extractos

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1,00	2,00	-5,89300*	,55388	,000	-7,3847	-4,4013
	3,00	-9,76300*	,55388	,000	-11,2547	-8,2713
	4,00	5,25100*	,55388	,000	3,7593	6,7427
2,00	1,00	5,89300*	,55388	,000	4,4013	7,3847
	3,00	-3,87000*	,55388	,000	-5,3617	-2,3783
	4,00	11,14400*	,55388	,000	9,6523	12,6357
3,00	1,00	9,76300*	,55388	,000	8,2713	11,2547
	2,00	3,87000*	,55388	,000	2,3783	5,3617
	4,00	15,01400*	,55388	,000	13,5223	16,5057
4,00	1,00	-5,25100*	,55388	,000	-6,7427	-3,7593
	2,00	-11,14400*	,55388	,000	-12,6357	-9,6523
	3,00	-15,01400*	,55388	,000	-16,5057	-13,5223

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

Dónde:

- 1 = Extracto al 10%
- 2 = Extracto al 30%
- 3 = Extracto al 50%
- 4 = Control Negativo (DMSO)

La prueba de TUKEY es una prueba estadística que nos permite realizar comparaciones múltiples y además determina que medias son

estadísticamente homogéneas. En el cuadro adjunto observamos que existen diferencias significativas entre todos los extractos y control negativo.

Tabla N°8: Subconjunto homogéneo Prueba de Tukey de las medias de los halos de inhibición obtenidos de los diferentes extractos

Concentración	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
4,00	10	6,0000			
1,00	10		11,2510		
2,00	10			17,1440	
3,00	10				21,0140
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000

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

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

La prueba de TUKEY permite también la homogeneidad de cada extracto y del control negativo. En el cuadro adjunto se observa que todos los extractos y el control negativo presenta medias heterogéneas, por ello se deduce que el extracto hidroalcohólico de manzanilla al 50% presente el mejor efecto antibacteriano frente a *Streptococcus pyogenes*.

Tabla N° 9: Medidas de los halos de inhibición, valor de la mediana, media, desviación estándar e intervalos de confianza

Extracto hidroalcohólico de las flores de Manzanilla					
Concentraciones					
Halos de inhibición (mm)					
N° PLACA	Control positivo	Control negativo	10%	30%	50%
1	37	6	9.67	15.98	21.43
2	38	6	11.53	14.78	20.32
3	39	6	12.32	16.34	19.45
4	35	6	10.09	17.92	21.5
5	38	6	11.54	14.93	22.54
6	34	6	12.00	16.09	21.67
7	35	6	10.43	19.76	20.68
8	37	6	9.98	19.65	23.00
9	37	6	12.02	18.56	20.54
10	37	6	12.93	17.43	19.01
Mediana	37	6	11.535	16.885	21.055
Media	36.7	6	11.2810	17.1440	21.014
Desviación estándar	1.56702	,00000	1.08243	1.80785	1.26458
I.C 95% inferior	35.5790	6,0000	10.5067	15.8507	20.1094
I.C 95% superior	37.8210	6,0000	12.0553	18.4373	21.9186

Fuente: Ficha de recolección de datos

Figura N° 2: Media de los halos de inhibición El Grafico 1 muestra la media de los halos de inhibición donde se puede apreciar un halo superior de la concentración de 50% seguido de las concentraciones 30% y 10%.

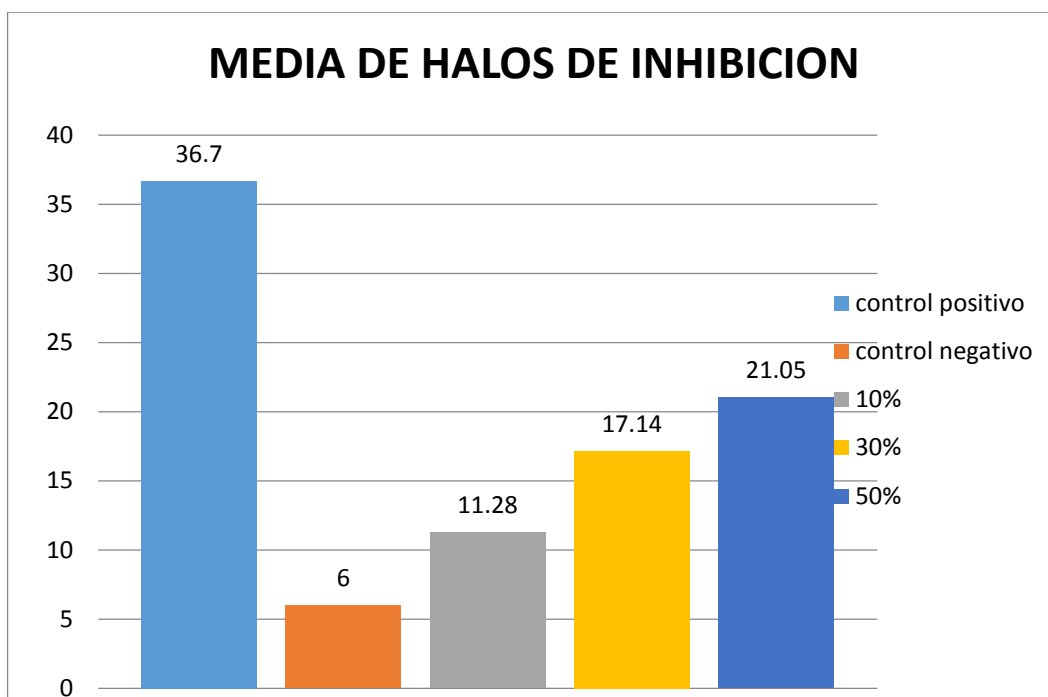


Tabla N° 10: Efecto inhibitorio in vitro del extracto hidroalcohólico de las flores de manzanilla sobre Streptococcus pyogenes ATCC 19615 según la escala de Duraffourd

Extracto hidroalcohólico de las flores de Manzanilla	Media Halo (mm)	Escala de Duraffourd
10%	11.28	Sensible limite
30%	17.14	Muy sensible
50%	21.01	Sumamente sensible

Fuente: Ficha de recolección de datos

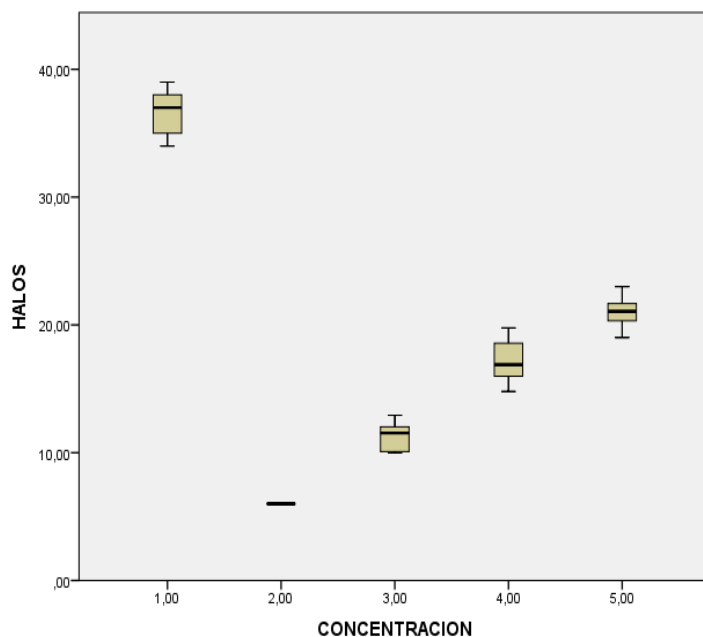


Figura N° 3: Efecto inhibitorio in vitro del extracto hidroalcohólico de las flores de manzanilla sobre Streptococcus pyogenes ATCC 19615

Leyenda:

- 1 = Control positivo
- 2 = Control negativo
- 3 = Extracto al 10%
- 4 = Extracto al 30%
- 5 = Extracto al 50%

Tabla N°11: Resumen 95% del Intervalo de Confianza con el post-test de Comparación múltiple de Dunnett. Intervalo de confianza 95%

Comparación	Diferencia de medias	Significancia	Intervalo
1 vs 2	-30.7000	SIGNIFICATIVO	-32.1755 a -29.2245
1 vs 3	-25.4190	SIGNIFICATIVO	-26.8945 a -23.9435
1 vs 4	-19.5560	SIGNIFICATIVO	-21.0315 a -18.0805
1 vs 5	-15.6860	SIGNIFICATIVO	-17.1615 a -14.2105

Fuente: Ficha de recolección de datos

4.2 CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

H: La concentración de las flores de manzanilla al 50% tiene efecto Antibacteriano frente a la cepa de la *Streptococcus pyogenes* ATTC 19615

4.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente estudio se demostró la presencia antibacteriana de las flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) proveniente del departamento Junín - Tarma, sobre una cepa de *Streptococcus pyogenes*. Investigación realizada in vitro, los resultados de la presente investigación corroboraron el efecto relativo antibacteriana de la manzanilla, Demostrando la presencia inhibitoria in vitro del extracto hidroalcohólico de las flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) tres diferentes concentraciones 10%, 30% y 50% frente a cepas de *Streptococcus pyogenes* presentando un halo de inhibición mínimo al 10% (11.28 mm) y una máxima en la concentración del 50% (21.01 mm).

Este estudio coincide con el de Zuta quien en el 2014 analizo la actividad bacteriana a de la manzanilla y matico a diferentes concentraciones sobre el *Estreptococos aereus* hallando en la concentración al 100% halos de inhibición de crecimiento bacteriano que van desde 10,12 y 15 mm resultados muy similares al nuestro.

En su estudio Cosco demostró la actividad inhibitorio de la *Matricaria*; nuestro estudio coincide en el efecto relativo, inhibitorio del *Streptococcus mutans* a diferentes concentraciones del aceite esencial de *Matricaria chamomilla* “manzanilla”, teniendo una media de 22mm de diámetro en sus halos de inhibición para la concentración de 100%.

Así también Chilón S. En el 2015 evaluó el efecto inhibitorio in vitro de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) comparado con penicilina sobre cepas de *Streptococcus pyogenes*, mostrando resultados en las concentraciones 50% con un promedio de halos de inhibición de 20.7 mm muy similares a nuestro estudio, demostrando efecto inhibitorio in vitro sobre cepas de *Streptococcus pyogenes*.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

1. El extracto hidroalcohólico de las flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) al 10% presenta sensibilidad, es Sensible limite sobre el *Streptococcus pyogenes* con promedios de halos de inhibición de. 11.28 mm
2. El extracto hidroalcohólico de las flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) al 30 % es muy sensible sobre el *Streptococcus pyogenes* con un promedio de halo de inhibición de 17.14mm.
3. El extracto hidroalcohólico de las flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) que presentó mayor sensibilidad sobre el *Streptococcus pyogenes* fue la de 50 % con un promedio de halo de inhibición de 21.01mm

5.2 RECOMENDACIONES

1. Realizar más estudios con cepas hospitalarias ya que son tomadas de los propios pacientes, y han surgido principalmente en los centros de salud como consecuencia por el amplio uso de antibacterianos.
2. Elaborar estudios con cepas nativas para evaluar si existe alguna diferencia significativa con el estudio usando cepas estandarizadas.
3. Se recomienda trabajar con una muestra mayor para que los resultados sean de una mayor significancia estadística.
4. Se recomienda utilizar preparados galénico a base de *Matricaria Chamomilla* ya que tiene efecto antibacteriano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) Restrejo M, Munera M, Ramírez B, Acuña C, Infección y colonización faríngea asintomática de niños por *Streptococcus pyogenes*, (internet) julio 2012 (citado el 25 de setiembre del 2017) *Iatreia* Vol. 25 (3): 203-209, julio-septiembre 2012
Disponible desde:<http://www.scielo.org.co/pdf/iat/v25n3/v25n3a03.pdf>
- 2) Gavilanez M, variabilidad de la práctica clínica en el diagnóstico y tratamiento de la faringoamigdalitis bacteriana aguda en pacientes de 3 a 15 años de edad en unidad de atención de primer nivel, centro de salud “fray Bartolomé de las casas”. Sede Quito. Enero a junio del 2016. Disertación previa a la obtención del título de médico, Quito, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, 2017
- 3) Leon N, Muñoz M, Padron C, Uso adecuado de antibióticos en infección respiratoria aguda en niños de 2 meses a 5 años atendidos el centro de salud nº 1 cuenca 2009 – 2010, cuenca-ecuador, universidad de cuenca, 2010-2011.
- 4) Uso Medicinal de la Manzanilla, (internet), citado el 23 de setiembre del 2017, disponible desde: <http://www.misabueso.com/salud/Manzanilla>
- 5) Pérez L, glomerulonefritis aguda post-estreptococcica: revisión bibliográfica, (internet) *Revista de Posgrado de la VIa Cátedra de Medicina - N° 135 – Febrero 2004; 7:11*, (citado el 22 de agosto del 2017).
Disponible en:<http://med.unne.edu.ar/revista/revista135/gloagu.pdf>
- 6) Cosco Robles D. “Actividad inhibitoria del crecimiento de *Streptococcus mutans* y de flora mixta salival por acción del aceite esencial

de la *Matricaria chamomilla* "manzanilla", tesis para optar el título de cirujano dentista, Lima – Perú, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2010.

- 7) Rengifo Penadillos R. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de hoja de piperaduncum sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, tesis para optar el grado de maestro en Farmacia y Bioquímica, Trujillo-Peru, Universidad Nacional de Trujillo; 2009
- 8) Chilon S. Efecto inhibitorio in vitro de *Rosmarinus officinalis* L. (Romero) comparado con penicilina sobre cepas de *Streptococcus pyogenes*. Tesis para optar el grado de médico cirujano, Universidad Privada Antenor Orrego - UPAO. Trujillo; Agosto - Noviembre 2015.
- 9) Jáuregui Álvarez G. Efecto Antibacteriano In Vitro Del Colutorio A Base De Matricaria Chamomilla (Manzanilla) A Diferentes Concentraciones Sobre La Cepa Atcc 2652263 De *Streptococcus mutans*. Tesis para optar el grado de bachiller en estomatología, Trujillo-Peru, Universidad Nacional de Trujillo; 2013.
- 10) Zuta Arriola N. "actividad antibacteriana in vitro de extractos de piperangustifolium (matico) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en cepas de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple", informe final del proyecto de investigación, Callao-Perú, Universidad Nacional del Callao; 2014.
- 11) Rojas C, Villca V. determinación de la actividad antibacteriana in vitro del ajo (*Allium sativum*) contra *Streptococcus pyogenes* mediante el método por dilución (internet). 2016, MAY. (Citado el 22 de agosto del 2017) pp. 13-19. Disponible desde:
http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/ucs/n4/n4_a03.pdf

- 12) Llapa L, Luna J, Macao M, prevalencia de faringoamigdalitis aguda estreptocócica mediante el test de detección rápida del antígeno de estreptococo beta hemolítico y los factores asociados en pacientes entre 5 – 19 años en el centro de salud n° 1 julio – septiembre, tesis previa a la obtención del título de médica; ecuador 2013.
- 13) Astudillo M, Prevalencia del estreptococo beta hemolítico del grupo a en paciencias de 5 a 15 años diagnosticado con faringoamigdalitis bacteriana en el hospital de la policía nacional de la ciudad de Guayaquil en año 2013, tesis para optar el título de médico cirujano, universidad Católica Santiago de Guayaquil, Ecuador; 2014.
- 14) Collantes M, Infecciones respiratorias agudas en niños menores de 10 años que llegan a la emergencia del Hospital "Federico Bolaños Moreira" y sus factores de riesgo clínico epidemiológicos 2014-2015, , tesis para optar el título de médico cirujano, Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Médicas. Ecuador; 2015.
- 15) Cameroni G. Manzanilla (*Matricaria recutita*) Cadena hierbas aromáticas y especias, Ministerio de agricultura, ganadería y pesca Presidencia de la nación.
Disponible desde:
http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/aromaticas/productos/Manzanilla_2010_09Sep.pdf.
- 16) José Manuel Pedrozo, La manzanilla y sus usos.
Disponible desde <http://www.monografias.com/trabajos88/manzanilla-y-sus-usos/manzanilla-y-sus-usos.shtml>.
- 17) Naturdata.com 2009-2017, (internet), citado el 22 de agosto del 2017
Disponible desde: <http://naturdata.com/Matricaria-recutita 34748.htm>.

- 18) Gonzalez A, Aceite de manzanilla (*Manzanilla chamomilla L.*) y su potencial de producción sustentable para uso medicinal. Tesis para obtener el título de ingeniero en agro ecología, México, Universidad Autónoma Agraria ``Antonio Narro``; 2012.
- 19) Morón F, Furones J, Pinedo Z, Actividad espasmolítico del extracto fluido de *Matricaria recutita* (manzanilla) en órganos aislados, (internet), abril de 1996, (citado el 25 de setiembre del 2017), Rev Cubana PlantMed v.1 n.1 Ciudad de la Habana ene.-abr. 1996.
Disponible desde:http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47961996000100005.
- 20) Rivera M, Estreptococo Beta Hemolítico grupo A (*Streptococcus pyogenes*), HONDURAS PEDIÁTRICA - VOL.XIX - No. 2, ABRIL, MAYO, JUNIO - AÑO 1998.
Disponible desde: <http://cidbimena.desastres.hn/RHP/pdf/1998/pdf/Vol19-2-1998-7.pdf>.
- 21) Almeida A, "Prevalencia de portación asintomática de streptococcus pyogenes y su relación con faringoamigdalitis en alumnos de la escuela Dr. Elías toro funes", requisito previo para optar por el título de licenciada en laboratorio clínico. Universidad técnica de Ambato, Ecuador 2014.
- 22) Cruz P. ""Elaboración y control de calidad del gel antimicótico de manzanilla (*Matricaria chamomilla*), Matico (*Aristiguetia glutinosa*) y Marco (*Ambrosia arborescens*) para Neo-Fármaco``, tesis para obtención del título del Bioquímico farmacéutico, Ecuador, Escuela superior politécnica de Chimborazo; 2009.
- 23) Manzanilla *Matricaria recutita* L, MHT (medicamentos herbario tradicionales) p. 107-108

Disponible

desde:<http://web.minsal.cl/portal/url/item/7d98ad06d34283d5e04001011f016dbb.pdf>

- 24) Farmacodivulgacion, clindamicina; Rev Cubana Farm vol.50 no.1 Ciudad de la Habana Jan.-Mar. 2016 (citado el 24 de noviembre del 2017).
Disponible desde:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475152016000100017&lng=en&nrm=iso.
- 25) Guillem Prats 2013. Microbiología y Parasitología Medica” Editorial Panamericana pág. 234 9na Edición.
- 26) Ayala F. Instituto Nacional Materno Perinatal, Revista peruana de investigación materno perinatal, vol 5, número 1, enero-junio 2011, ISSN 2305-3887 Lima Perú.
- 27) Dueñas R. Extractos hidroalcoholicos. SA de CV [internet] 2017 Enero [acceso 10 may 2017]:
Disponible en:
http://redsa.com.mx/descargas/herbolaria/catalogos_hidroalcoholicos.pdf
- 28) Guillem Prats 2013. Microbiología y Parasitología Medica” Editorial Panamericana pág. 234 9na Edición.
- 29) Bertran, G. 2013. Farmacología Básica y Clínica” Editorial Mc Graw Hill pág. 70 12va Edición.
- 30) Descriptores de la ciencia de la salud [internet] . Sao paulo: Biblioteca virtual de salud. [Online].; 2003 [cited 2017 01 01. Available from: <http://decs.bvs.br/cgi-bin/wxis1660.exe/decserver/>.

- 31) Guillem Prats 2013. Microbiología y Parasitología Medica” Editorial Panamericana pág. 234 9na Edición
- 32) Duraffourd C, Hervicourt L, Lapraz J. Cuadernos de Fitoterapia Clinica. 4th ed. Barcelona: Masson; 1987.
- 33) Sacsquispe R, Velásquez J, manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión, Instituto Nacional de Salud, 2002.

Anexo 1: Matriz de consistencia

TITULO: EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO HIDROALCOLICO DE LAS FLORES DE MANZANILLA (<i>Matricaria chamomilla</i>) FRENTE A CEPAS de STREPTOCOCCUS PYOGENES, ATCC 19615 IN VITRO						
Problema general	Objetivo general	Hipótesis general	Variable	Dimensiones	Indicadores	Metodología
¿Cuál es el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las flores de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) frente a cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615, in vitro?	Determinar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las flores de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) frente a cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615, in vitro	Si existe efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las flores de Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) frente a cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615, in vitro.	VI EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE Manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>)	VI: Extracción de Manzanilla.	VI: Concentración del extracto en estudio.	Diseño Experimental Tipo: estudio correlacional
Problema específico	Objetivo específico	Hipótesis específica	VD EFECTO ANTIBACTERIANO O IN VITRO VI CEPAS DE <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	VD: Halo de inhibición sobre los microorganismos Método de difusión por perforación en placa	VD: Inhibición de crecimiento (halos de inhibición) unidad de medida mm de diámetro.	Nivel: Correlacional transversal Población y muestra: -10 placas con microorganismos de <i>Streptococcus pyogenes</i> -
1. ¿De qué manera la concentración del extracto hidroalcohólico de las flores de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) al 10 % tiene efecto antibacteriano frente a cepa de <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615, in vitro?	1. Determinar el efecto antibacteriano de extracto hidroalcohólico de las flores de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) al 10% frente a cepa de <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615, in vitro.	1. La concentración del extracto hidroalcohólico de las flores de manzanilla (<i>matricaria chamomilla</i>) al 10% tiene efecto antibacteriano in vitro frente a cepa de <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615.				
2. ¿De qué manera la concentración del extracto hidroalcohólico de las flores de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) al 30 % tiene efecto antibacteriano frente a la cepa de <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615, in vitro?	2. Determinar el efecto antibacteriano de extracto hidroalcohólico de las flores de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) al 30% frente a cepa de <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615, in vitro.	2. La concentración del extracto hidroalcohólico de las flores de manzanilla (<i>matricaria chamomilla</i>) al 30% tiene efecto antibacteriano in vitro frente a cepa de <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615.				
	3. Determinar el efecto antibacteriano de extracto hidroalcohólico de las flores de manzanilla (<i>Matricaria chamomilla</i>) al 50% frente a cepa de <i>Streptococcus</i>					

<p>3. ¿De qué manera la concentración del extracto hidroalcohólico de las flores de manzanilla (Matricaria chamomilla) al 50 % tiene efecto antibacteriano frente a cepa de Streptococcus pyogenes ATTC 19615, invitro?</p>	<p>pyogenes ATTC 19615, in vitro.</p>	<p>3. La concentración del extracto hidroalcohólico de las flores de manzanilla (matricaria chamomilla) al 50% tiene efecto antibacteriano in vitro frente a cepa de Streptococcus pyogenes ATTC 19615.</p>				<p>Instrumentos de recolección de datos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Instrumento de medición de precisión vernier • Ficha de recolección de datos <p>Técnica: Prueba de sensibilidad método de difusión en pozo</p> <p>Procesamiento y análisis de datos: análisis de varianza (ANOVA)</p>
---	---------------------------------------	---	--	--	--	---


Anexo 2: Certificado obtención de cepas ATCC 19615



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Streptococcus pyogenes (group A) Catalog Number: 0385 Lot Number: 385-136 Reference Number: ATCC® 19615™** Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2018/10/31 Release Information: Quality Control Technologist: Carol J Stanoch Release Date: 2016/12/12
---	---

Performance	
Macroscopic Features: Two colony types, both are circular, convex, entire edge; one is medium & beta hemolytic, other is small and alpha hemolytic, turning to beta as culture ages.	Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram positive cocci	Method: Gram Stain (1)

ID System: MALDI-TOF See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase(3% Hydrogen Peroxide): negative Bacitracin differential: Sensitive  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
---	--

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vittek®: Although the Vittek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC Microbiology, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures

(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005



TESTING CERT #2655.01

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A – C)

Category	Description
A	Species Consistency: The best match was classified as 'green' (see above). Further 'green' matches are of the same species as the first one. Further 'yellow' matches are at least of the same genus as the first one.
B	Genus Consistency: The best match was classified as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or 'yellow' matches have at least the same genus as the first one. The conditions of species consistency are not fulfilled.
C	No Consistency: Neither species nor genus consistency (Please check for synonyms of names or microbial mixture).

Analyte Name: Streptococcus pyogenes (group A)
 Analyte Description: 0385
 Analyte ID: 385-136
 Analyte Creation Date/Time: 2016-11-29T14:03:32.107 cs
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, IVD, Listeria
 Applied Taxonomy Tree:

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value
F1 (+++)(A)	385-136	Streptococcus pyogenes	2.465

Comments:

Species canis / dysgalactiae / pyogenes of the genus Streptococcus have very similar patterns: Therefore distinguishing their species is difficult.

Anexo 3: Factura de la cepa *Streptococcus pyogenes* ATCC



RAZON SOCIAL: GEN LAB DEL PERU S.A.C.

Jr. Cápac Yupanqui N° 2434 Lince, Lima, Lima - PERU (Alt. Cdra. 8 Av. 2 de Mayo San Isidro)
 Av. Las Flores de Primavera N° 849 Urb. Las Flores San Juan de Luigancho, Lima, Lima
 Central Telf.: 203-7500 Telefax: (51-1) 203-7501
 e-mail: ventas@genlabperu.com web: www.genlabperu.com

R.U.C. 20501262260

FACTURA

0003- N° 0003826

Fecha	Vencimiento	Condiciones de Pago	A.C.
22/09/2017	23/09/2017	PAGO ADELANTADO	55

Sr(es): **UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**
 Dirección: **AV. AREQUIPA NRO. 1841 - LINCE LIMA LIMA**
 R.U.C. **20108383471** N° de Guía de Remisión N° **Ped N° 017536**
 N° de O.C.: **COTIZ GL-17/023135** Att.: N° Pedido

COD.	DESCRIPCION	CANT.	P. UNIT.	IMPORTE
H05683-A	KWIK-STIK™ <i>Streptococcus pyogenes</i> derived from ATCC® 19615™*	1	237.45760	237.46

PEPEGRAF S.A. R.U.C. 20372514290 SERIE 0003 DEL 3001 al 4000 SUMAT N° 12064897023 F.L.: 30-12-2015

SON: DOSCIENTOS OCHENTA CON 20/100. SOLES	S.E.U.O.
O/P:	SUB TOTAL S/. 237.46
NOTA : DESPUÉS DE VENCIDO EL PLAZO DE CANCELACIÓN, SE RECARGARA EL INTERES LEGAL POR EL TIEMPO QUE TRASCURRA PARA LA CANCELACIÓN DE ESTA FACTURA, LOS CHEQUES DEBERÁN SER GIRADOS ÚNICA Y EXCLUSIVAMENTE GEN LAB DEL PERU S.A.C.	I.G.V. (18%) S/. 42.74
Lima, 2 de ... de ...	TOTAL S/. 280.20
Por:	
DNI: _____	
p. GEN LAB DEL PERU S.A.C.	

CANCELADO / CANJEADO
 Lima, 2 de ... de ...
CANCELADO
 Por:
 DNI: _____
 p. GEN LAB DEL PERU S.A.C.

ADQUIRENTE O USUARIO

Anexo 4: Constancia por haber realizado la parte experimental



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS.
(Universidad del Perú, Decana de América)
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA

CONSTANCIA

EL RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA DE
LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS - UNIVERSIDAD NACIONAL
MAYOR DE SAN MARCOS; quien suscribe:

Deja constancia:

Que, la Srta. Bachiller **GUISELLA YESENIA NUÑEZ GABRIEL**, alumna egresada de la **Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega**, Lima – Perú, ha realizado una PASANTÍA en el laboratorio a mi cargo en el periodo comprendido desde 07 de noviembre hasta 30 de noviembre del 2017.


La Srta. Nuñez ha participado en las siguientes actividades:

- Preparación de medios de cultivo para estudios microbiológicos en el desarrollo experimental de su tema de tesis de grado.
- Aplicación de técnicas microbiológicas para determinar la actividad antimicrobiana de extractos vegetales frente a patógenos que afectan al ser humano.
- Preparación de material de laboratorio, soluciones stock de insumos químicos y reactivos, complementos para el desarrollo de su tema de tesis.

Durante su permanencia la Srta. Nuñez ha demostrado eficiencia y gran sentido de responsabilidad, así como seriedad en las labores encomendadas.

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

Lima, 04 de enero del 2018.


M.Sc. JORGE LEÓN QUISPE
Docente- Investigador, Responsable
del Laboratorio de Ecología Microbiana





UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS.
(Universidad del Perú, Decana de América)
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MICROBIOLOGÍA Y
PARASITOLOGÍA

CONSTANCIA

EL RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE ECOLOGÍA MICROBIANA DE
LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS - UNIVERSIDAD NACIONAL
MAYOR DE SAN MARCOS; quien suscribe:

Deja constancia:

Que, la Srta. Bachiller **MARIBEL ROXANA MORENO OLARTE**, alumna egresada de la **Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega**, Lima – Perú, ha realizado una PASANTÍA en el laboratorio a mi cargo en el periodo comprendido desde 07 de noviembre hasta 30 de noviembre del 2017.


La Srta. Moreno ha participado en las siguientes actividades:

- Preparación de medios de cultivo para estudios microbiológicos en el desarrollo experimental de su tema de tesis de grado.
- Aplicación de técnicas microbiológicas para determinar la actividad antimicrobiana de extractos vegetales frente a patógenos que afectan al ser humano.
- Preparación de material de laboratorio, soluciones stock de insumos químicos y reactivos, complementos para el desarrollo de su tema de tesis.

Durante su permanencia la Srta. Moreno ha demostrado eficiencia y gran sentido de responsabilidad, así como seriedad en las labores encomendadas.

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

Lima, 04 de enero del 2018.


M.Sc. JORGE LEÓN QUISPE
Docente- Investigador, Responsable
del Laboratorio de Ecología Microbiana.



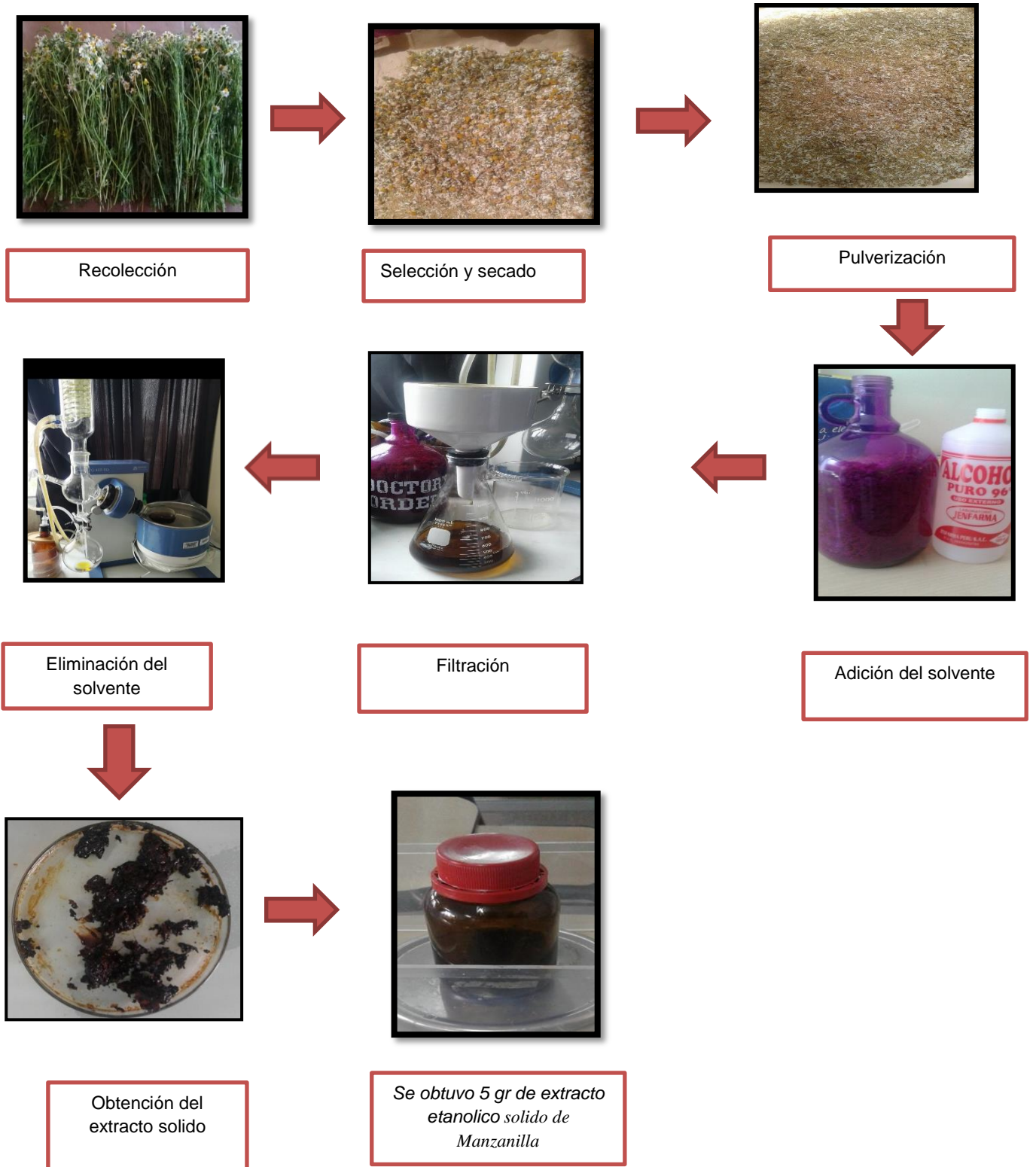
Anexo 5. Ficha de recolección de datos

TESIS:

“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS FLORES DE MANZANILLA (*Matricaria chamomilla*) FRENTE A CEPAS DE *Streptococcus pyogenes* ATTC 19615, IN VITRO”

Extracto hidroalcoholico de las flores de manzanilla					
Concentraciones					
Halos de inhibición					
N°Placa	Control positivo	Control negativo	10%	30%	50%
	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)	(mm)
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

**Anexo 6: Preparación del extracto hidroalcoholico de las flores manzanilla
(*matricaria chamomilla*)**



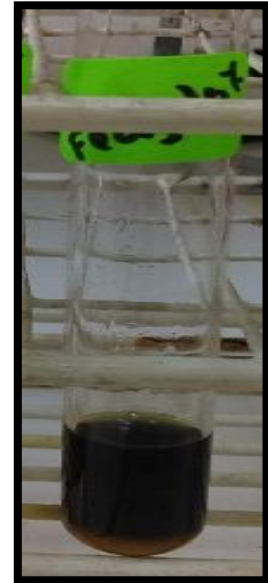
**Tamizaje fitoquímico extracto hidroalcoholico de las flores de
manzanilla(*Matricaria chamomilla*)**

1. Determinación de taninos

Gelatina-cloruro de sodio



Cloruro férrico



2. Determinación de flavonoides

R, Shinoda



3. Determinación de camarinas

NaOH 10%

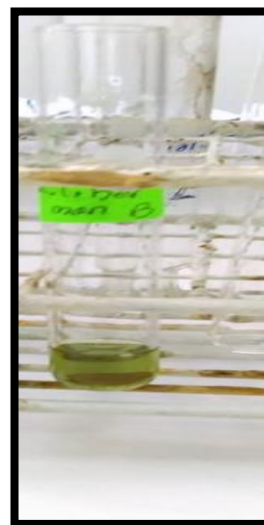


4. Determinación de quinonas

NaOH 5%

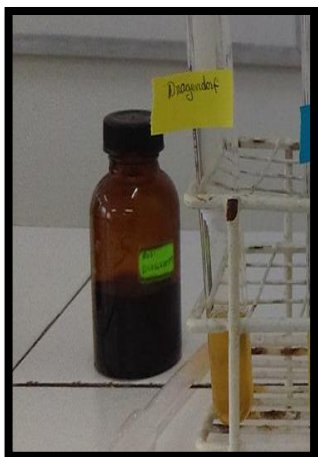


Rx Borntrager



5. Determinación de alcaloides

Dragendorff



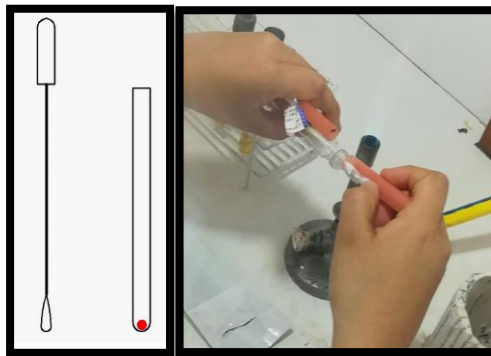
Mayer



Anexo 7: Reconstitución de la cepa *Streptococcus pyogenes* ATCC®19615



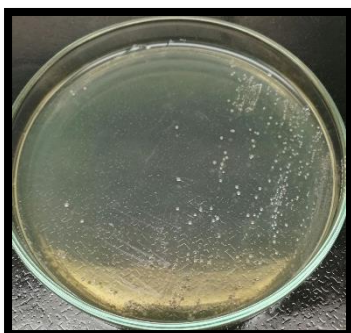
Streptococcus pyogenes
ATCC®19615



Emulsión del hisopo del contenedor en
TSB
Incubar a 37°C por 24 a 48 horas en



Siembra por el método de estriado



Agar Tripticasa de Soya
(TSA)



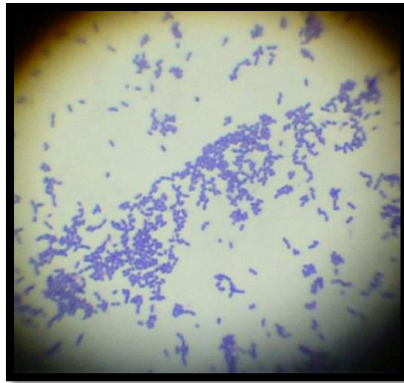
Incubar a 37°C por 24 a
48 horas en
anaerobiosis



Agar Sangre (5% de
sangre de carnero)



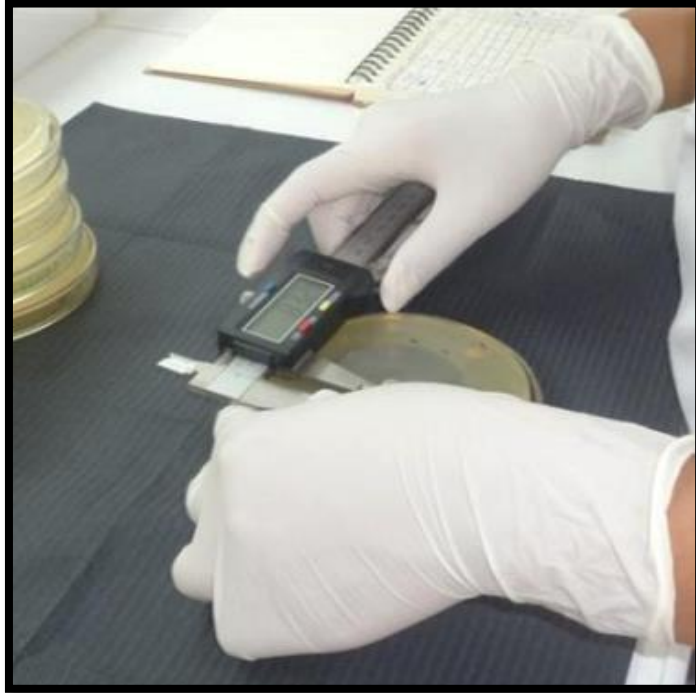
Coloración Gram +



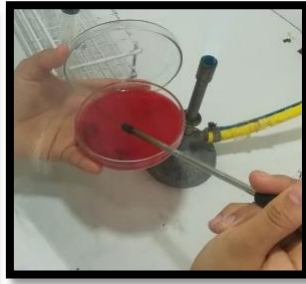
Estandarización de la cepa de *streptococcus pyogenes* ATCC 19615 según la escala mc farland 0.5



Medición de halos de inhibición



Anexo 8: Determinación de la actividad antibacteriano de las flores de Manzanilla (*Matricaria chamomilla*) frente a *Streptococcus pyogenes* mediante la técnica difusión en agar



Reactivación de la cepa patógena

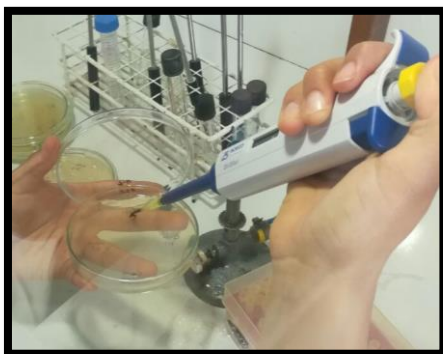
Preparación y estandarización del inculo



Se hizo los pozos con un sacabocado (tapón horador)



Del inculo del microorganismo se sembró por el método del hisopado en una placa de MullerHinton.



Se agregó 50 ul del extracto preparado



Reposar por 30 min. A temperatura ambiente y luego se incubo a 37°C por 24 horas en anaerobiosis

Lectura a las 24 horas de los Halos de inhibición

