

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**



**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUÍMICA**

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL EXTRACTO ETANÓLICO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LAS HOJAS DE *Luma chequen* (Molina) A. Gray “ARRAYÁN” EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa***

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

**AUTORES:**

**RICRA REYNAGA, HILLARY JAZMIN**

**ULLILEN BENAVIDES, JORGE LUIS**

**ASESOR:**

**Mg.INOCENTE CAMONES MIGUEL ANGEL**

**LIMA-PERÚ**

**2019**

## TÍTULO

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL EXTRACTO ETANÓLICO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LAS HOJAS DE *Luma chequen* (Molina) A. Gray “ARRAYÁN” EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa***

## **DEDICATORIA**

Este trabajo está dedicado a mi familia, pues durante mi trayecto en la carrera universitaria han sido de vital apoyo y fortaleza para seguir adelante.

Hillary Ricra

Esta investigación se la dedico a mis padres, debido a que siempre estuvieron apoyándome apreciadamente.

Jorge Ullilen

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Dios y a toda mi familia, la que siempre me motivó y apoyó, gracias por creer y confiar en mí. Por darme la oportunidad de estas experiencias inolvidables.

Hillary Ricra

Mis agradecimientos van para Dios, quien me guio y ha ofrecido la fortaleza necesaria para lograr mis metas. Gracias también a los docentes, de quienes he bebido sus conocimientos y valores.

Jorge Ullilen

# ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTO .....	iv
ÍNDICE DE TABLAS .....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT .....	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I:PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	3
1.1. Descripción de la realidad problemática .....	3
1.2 Formulación del Problema .....	4
1.2.1 Problema General.....	4
1.2.2 Problemas Específicos.....	4
1.3 Objetivos .....	5
1.3.1 Objetivo General .....	5
1.3.2 Objetivos Específicos.....	5
1.4 Justificación e importancia del estudio.....	5
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....	7
2.1 Antecedentes del Estudio .....	7
2.1.1. Nacionales .....	7

2.1.2 Internacional .....	10
2.2 Bases teóricas .....	13
2.2.1 Luma chequen (Molina) A. Gray “Arrayán” .....	13
2.2.1.1 Definición .....	13
2.2.1.2 Clasificación taxonómica .....	13
2.2.1.3 Descripción morfológica .....	14
2.2.1.4 Distribución geográfica .....	16
2.2.1.5 Aspectos fitoquímicos y bioquímicos.....	16
2.2.1.6 Usos terapéuticos.....	16
2.2.2 Staphylococcus aureus.....	17
2.2.2.1 Definición .....	17
2.2.2.2 Clasificación taxonómica .....	18
2.2.2.3 Características morfológicas.....	18
2.2.2.4 Epidemiología.....	19
2.2.2.5 Factores de riesgo.....	20
2.2.2.6 Importancia clínica.....	20
2.2.2.7 Mecanismos de resistencia.....	21
2.2.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	22
2.2.3.2 Clasificación taxonómica .....	23
2.2.3.3 Características morfológicas.....	23
2.2.3.4 Epidemiología.....	24
2.2.3.5 Factores de riesgo.....	25

2.2.3.6	Importancia clínica.....	26
2.2.3.7	Mecanismos de resistencia.....	27
2.3	Hipótesis.....	28
2.3.1	Hipótesis general .....	28
2.3.2	Hipótesis específicas.....	28
2.4	Variables .....	29
2.4.1	Tabla de Operacionalización de Variables .....	29
2.5	Marco conceptual .....	30
CAPÍTULO III:MÉTODO.....		32
3.1	Tipo de estudio .....	32
3.2	Diseño a utilizar .....	32
3.3	Población.....	33
3.4	Muestra .....	33
3.5	Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	34
3.5.1	Técnicas de Procesamientos y Análisis de Datos.....	34
3.5.2	Equipos, materiales y reactivos.....	34
3.6	Procedimiento de Datos .....	37
3.6.1	Procedimiento Experimental (Etapa I).....	37
3.6.2	Procedimiento Experimental (Etapa II).....	43
CAPÍTULO IV:PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....		50
4.1	Presentación de resultados .....	50
4.2	Contrastación de hipótesis.....	56
4.3	Discusión de resultados.....	61

CAPÍTULO V:CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	65
<b>5.1 Conclusiones</b> .....	65
5.2 Recomendaciones .....	66
REFERENCIAS .....	67
ANEXOS .....	71



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Prueba de solubilidad del extracto etanólico de Luma chequen (Molina) A. Gray “Arrayán”.....	50
Tabla 2. Prueba de solubilidad del extracto etanólico de Luma chequen (Molina) A. Gray “Arrayán”.....	51
Tabla 3. Prueba de Sensibilidad Antimicrobiano por el Método de Difusión en agar con discos.....	52
Tabla 4. <i>Susceptibilidad del microorganismo frente al antibiótico de referencia.</i> .....	52
Tabla 5. Actividad antibacteriana de hojas de Luma chequen (Molina) A. Gray “Arrayán” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	52
Tabla 6. Estadística descriptiva de los halos de inhibición encontrados de las hojas de Luma chequen (Molina) A. Gray “Arrayán” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	53
Tabla 7. Prueba de LEVENE de los halos de inhibición encontrados de hojas de Luma chequen (Molina) A. Gray “Arrayán” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ....	54
Tabla 8. Prueba de Kolmogorov-Smirnov (Normalidad) de los halos de inhibición encontrados de hojas de Luma chequen (Molina) A. Gray “Arrayán” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	55
Tabla 9. Prueba de Kruskal Wallis de los halos de inhibición encontrados de hojas de Luma chequen (Molina) A. Gray “Arrayán” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	56

Tabla 10. Comparaciones múltiples de la prueba de Mann Whitney de los halos de inhibición encontrados del extracto encontrados de hojas de Luma chequen (Molina) A. Gray “Arrayán” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	57
Tabla 11. Actividad antibacteriana de hojas de Luma chequen (Molina) A. Gray “Arrayán” frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> .....	58
Tabla 12. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de Luma chequen (Molina) A. Gray “Arrayán” frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	59
Tabla 13. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de Luma chequen (Molina) A. Gray “Arrayán” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	60

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flor de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray “Arrayán”.....	15
Figura 2. Hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray “Arrayán”.....	15
Figura 3. Media del diámetro de los halos de inhibición de hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray “Arrayán” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> expresados en mm. ....	54

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> MATRIZ DE CONSISTENCIA .....	72
<b>Anexo 2.</b> CERTIFICADO DE LA PLANTA <i>Luma Chequen</i> (Molina) A. Gray "Arrayán" .....	73
<b>Anexo 3.</b> CERTIFICADO DE LA BACTERIA <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	74
<b>Anexo 4.</b> CERTIFICADO DE LA BACTERIA <i>Staphylococcus aureus</i> .....	75
<b>Anexo 5.</b> CONSTANCIA DE HABER REALIZADO LA PARTE EXPERIMENTAL .....	76
<b>Anexo 6.</b> TESTIMONIO FOTOGRÁFICO .....	77

## RESUMEN

El presente estudio tiene el objetivo de determinar la función antibacteriana del extracto etanólico hecho a base de hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayán" frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* como de *Staphylococcus aureus*. Esto con el fin de establecer, por medio del empleo de la difusión en agar en pocillos y por consiguiente se uso el método de dilución en caldo para la determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI), los efectos antibacterianos de dicha especie vegetal.

Se procedió a la identificación de los metabolitos secundarios por medio del "screening fitoquímico". Se prepararon extractos etanólicos a partir de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayán" a las siguientes concentraciones : 50%,70%,96% y 100% ,las cuales fueron sometidas a los respectivos análisis microbiológicos para determinar su función antibacteriana y concentración mínima inhibitoria frente al inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* como de *Staphylococcus aureus*, teniendo como turbidez 0.5 en la escala de Mc Farland. Los extractos a las diferentes concentraciones anteriormente mencionadas mostraron actividad antibacteriana frente a las cepas *Staphylococcus aureus*; observando que el extracto al 100% presento la mejor actividad , dicho extracto también presentó capacidad moderada para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* que alcanza el 0.00781%. En cambio no se observaron actividad antibacteriana frente a las cepas *Pseudomonas aeruginosa* en ninguno de los análisis . En conclusión, el referido extracto etanólico derivado de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayán" no presentan una efectiva actividad

antibacteriana ante cepas de *Pseudomonas aeruginosa*; sin embargo, estos efectos sí se presentan frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*.

**Palabras claves:** Extracto etanólico, *Luma chequen*, actividad antibacteriana, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*.

## ABSTRACT

The objective of the research was to evaluate the antimicrobial activity of the ethanolic extract of *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayán" against the strain of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. This in order to establish, through the use of diffusion in agar in wells and therefore the method of dilution in broth was used for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC), the antibacterial effects of said plant species.

The identification of secondary metabolites was developed through phytochemical screening. Ethanolic extracts were prepared from the *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayán" leaves at the following concentrations: 50%, 70%, 96% and 100%, which were subjected to the respective microbiological analyzes to determine their antibacterial function and minimum inhibitory concentration against the inoculum of *Pseudomonas aeruginosa* as of *Staphylococcus aureus*, having as turbidity 0.5 on the Mc Farland scale. Extracts at the different concentrations mentioned above showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* strains; observing that the 100% extract presented the best activity, said extract also presented moderate capacity to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* that reaches 0.00781%. In contrast, no antibacterial activity was observed against the *Pseudomonas aeruginosa* strains in any of the analyzes. In conclusion, the aforementioned ethanolic extract derived from the leaves of *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayán" does not have an effective antibacterial activity against strains of *Pseudomonas aeruginosa*; However, these effects do occur against the strains of *Staphylococcus aureus*.

**Keywords:**

Ethanolic extract, *Luma chequen*, antibacterial activity, *Staphylococcus aureus*,  
*Pseudomonas aeruginosa*.



# INTRODUCCIÓN

Un gran conjunto de los recursos renovables son los vegetales, los cuales generalmente guardan propiedades beneficiosas. Estos vegetales son contenedores de principios activos, los mismos que en distintas épocas de la humanidad han servido de alivio para distintos síntomas o malestares, llegando incluso a curar diferentes enfermedades, a diferencia de los medicamentos industrializados, los cuáles tienen un costo superior en cuanto a fabricación y son difíciles de adquirir por parte de personas de escasos recursos económicos. Adicionalmente, muchos fármacos tienen efectos adversos para el organismo humano. (1)

Contextualizado con lo anterior, se trae a consideración la *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán”, un vegetal ubicado en la cordillera de los Andes, en Perú, y cuya simiente posee un amargo sabor y es utilizado por habitantes de la sierra tanto para alimentarse como para curarse. Esto debido a que dicha planta contiene una considerable cantidad de nutrientes, como las proteínas, además de vitaminas y minerales; debido a ello, es de importancia en la nutrición infantil, personas con afecciones en los riñones, páncreas y también embarazadas. (2)

Puesto que las plantas medicinales suelen asociarse a la tradición oral y prácticas ancestrales de curación, se hace necesario formalizar este tipo de investigaciones para poder averiguar y conocer con precisión las propiedades curativas de esta planta andina, y de esa forma acreditarlas dentro de la medicina natural y científica. (1)

Las investigaciones efectuadas acerca del género *Luma* son numerosas; no obstante, por motivo de su elevado grado de alcaloides su consumo directo no

está permitido, a menos que estos compuestos tóxicos se hayan eliminado con previsión.

Esta investigación, por tanto, pretende profundizar la indagación acerca de las propiedades medicinales que esta planta, *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán”, posee. Además, busca la evaluación de la función antibacteriana del extracto etanólico derivado del follaje de la *Luma chequen* ante cepas de los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (2).

# CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

## 1.1. Descripción de la realidad problemática

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), se consideran infecciones hospitalarias a un problema de salud pública. Diariamente, las infecciones que se asocian a la atención de salud (IAAS), producen grandes costos a los sistemas de salud a nivel global, donde prolongar la estancia en el nosocomio genera una resistencia considerable de los virus y bacterias que habitan allí, causando incluso muertes evitables. (3)

Con base en los datos ofrecidos por la OMS, estas IAAS terminan afectando a un 5% de pacientes internados; en otras palabras, 4.1 millones (aproximadamente) de pacientes resultan afectados, con un saldo de 37 000 muertes al año. En Latinoamérica, el factor de la IAAS se desconoce; sin embargo, un estudio revelan que el número es más elevado en comparación con los países de primer mundo. (4)

La población peruana se encuentra en riesgo, debido a que sus labores ocupacionales se practican sin sistemas de seguridad biológica o como mínimo de primeros auxilios. Por lo que la falta de un tratamiento inmediato ante un corte, o cualquier herida, puede llevar a infecciones a causa de una cantidad de “gérmenes oportunistas”. (5)

Este problema, referido claramente a salud pública, se afronta con antibióticos, medicamentos recetados que en la mayoría de casos suelen ser insuficientes, o sus efectos se disgregan al poco tiempo durante el tratamiento de infecciones.

Es así que el estudio y análisis las plantas en cuanto a determinar sus propiedades medicinales, dispone de una fuente más que sostenible en la elaboración de fármacos específicos para cada microorganismo productor de enfermedades. Asimismo, éste recurso puede usarse de manera tradicional.

Teniendo en cuenta el contexto que nos atañe, y al potencial de algunas plantas con propiedades antibacterianas, el actual trabajo investigativo busca comprobar qué tan eficiente es la *Luma chequen*, una especie vegetal que no está del todo estudiada y que podría tomarse como primera alternativa ante una eventual lesión o herida abierta.

## **1.2 Formulación del Problema**

### **1.2.1 Problema General**

¿El extracto etanólico derivado de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” en diferentes concentraciones poseerá actividad antibacteriana ante las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*?

### **1.2.2 Problemas Específicos**

- ¿Qué metabolitos secundarios estarán presentes en el extracto etanólico derivado de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” ?
- ¿Cuál será el porcentaje de concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico derivado de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” ante las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*?
- ¿Cuál será el porcentaje de concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico derivado de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” ante las cepas de *Staphylococcus aureus*?

## **1.3 Objetivos**

### **1.3.1 Objetivo General**

Determinar la actividad antibacteriana *in vitro* a diferentes concentraciones del extracto etanólico derivado de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

### **1.3.2 Objetivos Específicos**

- Identificar los metabolitos secundarios, presentes en el extracto etanólico derivado de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán”.
- Determinar el grado de concentración mínima inhibitoria (MIC) que presenta el extracto etanólico derivado de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” frente al crecimiento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Determinar el grado de concentración mínima inhibitoria (MIC) que presenta el extracto etanólico derivado de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” frente al crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus*.

## **1.4 Justificación e importancia del estudio**

Una considerable cantidad de bioactivos se encuentran implicados en la medicina natural, donde cabe señalar el significativo número de bioactivos que se desconocen hasta ahora. De las propiedades que presentan la planta de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán”, la mayor porción se usa para enfrentar infecciones bacterianas. (6)

Precisamente, existen antibióticos sintetizados artificialmente que poseen un índice relativamente bajo de efectividad contra bacterias y hongos, lo cual indica problemas adyacentes. (7)

Debido a esto, la investigación acerca de lo poco estudiado de los principios activos de la *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” es necesaria y útil, ya que se busca afrontar las infecciones ocasionadas por microorganismos desde una nueva perspectiva. (6)

Los resultados antimicrobianos de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán”, obtenidos con base al extracto etanólico y acuoso, de las hojas de la planta, libera alcaloides al mismo tiempo que flavonoides, siendo los compuestos sobre los que se centra esta investigación, debido a su posible actividad antibacteriana. (6)

Asimismo, se buscan alternativas medicinales comprobadas que puedan tener esta función antibacteriana. Por lo que observar la flora de la serranía peruana es un paso tanto para reforzar nuevas líneas de investigación como para conocer cabalmente la composición bioquímica de plantas oriundas de los andes; en éste caso, la especie vegetal *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán”. (7)

Serán los principales resultados del estudio los que favorecerán el desarrollo progresivo de productos o alternativas medicinales novedosas (fórmulas farmacéuticas), adjudicándose las cualidades de natural y de absorción simplificada. Lo que promovería un impacto económico necesario para posicionar un artículo antibacteriano que combata las infecciones provocadas por *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

## CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1 Antecedentes del Estudio

#### 2.1.1. Nacionales

**Torres J. (2014)** desarrolló un estudio con base a extractos de "*Luma chequen* (Molina) a. Gray "arrayán", a fin de examinar su actividad contra los microbios, ante los hemocultivos de patógenos aislados, en el centro hospitalario Almenara, Lima. Para la investigación se necesitó usar diferentes solventes con la finalidad de conseguir los extractos requeridos. Para examinar su actividad, se tuvo que aplicar el denominado método de difusión de los "pocillos". Por otra parte, el extracto etanólico presenta 3,125 mg/mL como Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) frente a *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*, se evidenció un nivel de CMI de 1,56 mg/mL en contra de la *Candida tropicalis* y la *Candida parapsilosis*. Se estableció de ésta forma la existencia de estructuras compuestas, tales como flavonoides, taninos, alcaloides, esteroides y/o triterpenos, fenólicos y leucoantocianidinas, aplicando el método de tamizaje fitoquímico. El estudio concluyó señalando que la "*Luma chequen* - arrayán" manifestó respuestas antibacterianas de gran alcance. (8)

**Farfán Y., et al. (2016)**, realizaron estudios acerca de la actividad antibacteriana del aceite de "*Luma chequen*" (arrayán) ante la *salmonella spp*, las cuales estuvieron vistas en aislamiento sobre cuyes, en poblado de Quiquijana. En su estudio aisló la *Salmonella spp*, las cuales provenían de 30 muestras del hígado de cuyes del poblado en mención, en el 2016. Así, se logró obtener 4.5kg/7.5mL

de óleo esencial, por medio de la metódica destilativa. Luego se realizaron pruebas para comprobar su calidad. Según Digesa, las pruebas resultaron que no había ningún tipo de contaminante microbiológico. Por otra parte, a fin de examinar exhaustivamente el aceite de *Luma chequen*-arrayán, en cuanto su actividad antimicrobiana, se empleó el clásico método de Kirby Bauer modificado en pozos a diferentes concentraciones (10, 50 y 100%) a las cepas pertenecientes a la *Salmonella typhinurium*. Dentro de los resultados, pudo hallarse que: Mostró “halo de inhibición”, en promedio (9,92; 12:11 Y 15.32 mm) de manera respectiva entradas las 24 horas de completa lectura, siendo que, en 48 h de esta actividad, estas exteriorizaron una “halo de inhibición” en promedio (11.5, 13.63 y 18.27) de forma respectiva. Por lo que es posible señalar que las cepas estuvieron susceptibles al accionar de producto. (9)

**Llerena L.,et al. (2017)** , determinaron el efecto antimicrobiano y antifúngico del aceite esencial de *Luma chequen* (Molina) A. Gray en cuanto al crecimiento de las bacterias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* y *Staphylococcus epidermidis*. Las pruebas siguientes fueron aplicadas: solubilidad, cromatografía de gases, la misma que se conectó a espectrometría de masas. Asimismo, fue aplicado con base a microdiluciones para establecer el accionar antimicrobiano. Entre los resultados se indicó que la oleosidad del *Luma chequen* (Molina) A Gray , manifestó miscibilidad en solución de etanol en proporciones de 96% hasta 70%, siendo insoluble al agua. Por otra parte, se ha dejado en evidencia el efecto antimicrobiano de este aceite ante las bacterias *C. albicans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. epidermidis*, en bajas concentraciones (5%, 5%, 20%, 8%,



5%, respectivamente). Por eso, el microorganismo *P. aeruginosa* conserva un bajo efecto antibacterial, esto comparándolo al resto de microbios. En conclusión, el aceite derivado del *Luma chequen* (Molina) A. Gray manifestó efectos antibacterianos, bajo el método *in vitro*, ante las microorganismos mencionados. (10)

**Moina V. (2015)**, determinó la actividad antibacteriana *in vitro* con soluciones elaboradas con base a los aceites esenciales de "*Luma chequen* (Molina) A. Gray (Arrayán)" y otro con la esencia de *Mintostachys spicata* (Benth). El estudio utilizó el reconocido método del destilado por medio del "arrastre vaporizado", y así obtener el buscado aceite. También se realizaron algunas pruebas, como la de examen organoléptico, análisis fisicoquímico. Asimismo, partiendo de la examinación de propiedades como la solubilidad y control microbiano para los dos aceites. Lo observado fue que los diámetros referentes a los halos inhibitorios estuvieron midiendo 11.57 mm (Colutorio A), 11.76 mm (Colutorio B) y 10.96mm (Colutorio C). Estos colutorios fueron comparados con los del ámbito comercial, siendo 17,43mm (Colutorio D), 14.23 mm (Colutorio E) y ningún tipo de halo inhibitorio para Colutorio "F". Como conclusión, se fijó que el colutorio hecho con base a la esencia oleaginosa de la planta *Mintostachys spicata* (Benth) "Epling Yuraq muña" es el que posee la mayor actividad en contra de las bacterias, superando a *Luma chequen* A. Gray "Arrayan". (11)

**Neira J. (2018)**, evaluó el efecto antibacteriano antibacteriano de los extractos etanólicos de cuatro plantas, aquellas que se utilizan entre la población de la zona (Quequeña, Tuctumpaya y Chiguata) para sus distintas tareas, en especial

para hacer frente a bacterias de alto riesgo, a decir *Staphylococcus aureus* y el *Streptococcus pneumoniae*. Asimismo, se implementó un conocido método de difusión en agar (disco de K. Bauer), la misma establecía que el total de extractos sí tienen efecto contra las dos especies de bacterias. Seguidamente se les comparó con la amikacina (antibiótico) como un control positivo. De allí, se obtuvo el nivel porcentual de inhibición para cada extracto. Los CMI (Concentración mínima inhibitoria) sobre los extractos referidos de romero y orégano se dieron como sigue: Romero dado al *Staphylococcus aureus* con un total de 3.75 mg por mL mientras que para la *S. pneumoniae* fue de 1, 875 mg por mL. Por su parte, la CMI de orégano para *Staphylococcus aureus* estuvo rondando los 1,875 mg/mL, a su vez que para el para *S. pneumoniae* la relación numérica fue de 0,9375 mg/mL. (12)

### 2.1.2 Internacional

**Lizcano A., et al. (2008)**, evaluarón el nivel de actividad antimicrobiana en los extractos etanólicos y/o aceite esencial de la *Valeriana pilosa*, *Myrcianthes rhopaloides*, *Hesperomeles ferrugínea* y la *Passiflora manicata*. La técnica utilizada fue la hidrodestilación, para la *Myrcianthes rhopaloides*. Mientras que la difusión en agar se utilizó para examinar el accionar antimicrobiano. Como resultados, se ha obtenido que fue el extracto etanólico de la *Passiflora manicata* la presento mayor actividad antibacteriana frente a la *B. subtilis*, *Candida albicans* y *E. coli*. En definitiva, se concluyó lo siguiente: El extracto etanólico proveniente de la *Passiflora manicata* es la que actúa con mayor incidencia ante los diversos microbios señalados. (13)

**Gómez C. (2010)**, evaluó la actividad antimicótica y antibacteriana de los siguientes extractos: *Amaranthus asplundii* (“ataco”), *Myrcianthes hallii* (“arrayán”) y *Peperomia peltigera* (“pataku yuyo”). Se aplicaron sobre la *Candida albicans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus mutans*. Los métodos empleados para extraer sus respectivos extractos fueron los fitoquímicos. Para los microorganismos, se emplearon pruebas de microbiología in vitro, difusión en agar. El extracto con mejores resultados fue el arrayán (*Myrcianthes hallii*) etanólico, ya que inhibió al *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), al *Klebsiella pneumoniae* y al hongo *Candida Albicans*. Desarrollándose, así como una sustancia de amplio espectro, el cual puede usarse para tratar enfermedades propias de la faringe y boca. (14)

**Bodero M. (2010)**, realizó un estudio a los componentes propios del Arrayán (nombre científico: *Myrcianthes rhopaloides*) y del Pumín (nombre científico: *Salvia squalens*). Asimismo, se llevó a cabo un examen experimental acerca de la actividad antibacteriana *in vitro* utilizando cepas separadas y aisladas dentro de un recipiente conteniendo saliva; tamizaje fitoquímico además de una cromatografía sobre capa fina, con lo cual se pudo determinar la presencia de ciertos compuestos con el potencial de incidir en forma antimicrobiana. El respectivo screening (difusión en agar) puso de manifiesto su accionar ante *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Streptococcus pyogenes*. Fueron los extractos de tipo fluido combinados los que manifestaron de mejor manera su actividad ante los microorganismos ya mencionados, con excepción del hongo *Candida albicans*. Por tanto, su utilidad se resume en que su potencial aplicación es la higiene oral, también la terapia en odontología. (15)

**Ocares M. (2012)**, investigó la acción antimicrobiana de los extractos completamente crudos, relativos a diferentes especies vegetales (nativos) sobre la *E. coli* y la *Salmonella spp.* Las pruebas de microbiología de antagonismo *in vitro* realizadas por medio de técnicas como la inhibición en caldo o la difusión en agar, arrojaron resultados en los que se pudo identificar que estos extractos en metanol (que llevan hoja de Lingue, Luma, Ñirre, Picha y Meli) confirmaron la actividad antibacteriana ante todos los microorganismos señalados. Se estableció, asimismo, que las esencias de Ñirre, Lingue y Picha tuvieron una actividad contrapuesta incluso mayor que las otras dos plantas. Pero se debe reconocer también que las diferencias no fueron tan significativas si comparamos el extracto de Lingue con el de Picha. Ambas ante la bacteria “*E. coli* ATCC 25922”. (16)

**Guasgua J. (2017)**, determinó el efecto inhibitorio de extractos derivados del Aguacate (*Persea americana*) y Arrayán (*Myrcianthes Halli*) en concentraciones disímiles frente a la cepa de *Porphyromona gingivalis* a través del test difusión sobre disco. Sobre esta investigación se tuvo que aplicar la técnica de “percolación”, usando el aparato de Soxhlet, así como etanol alcanzando el 96%. Pasada una semana, se pasó a medir los halos, demostrando que hubo efecto inhibitorio para la esencia de arrayán junto a aguacate en un 100%, mientras que en el trabajo investigativo ambos se procesaron bajo la prueba Kruskal-Wallis y U Mann Whitney. La conclusión a la que arribó el autor señala que el extracto de arrayán a un cien por ciento, manifiesta valores inhibitorios; el otro extracto, derivado de aguacate, manifestó halo de inhibición; sin embargo, no fue de grado

considerable. No así la Clorhexidina, con altos valores de inhibición. (0,12%).  
(17)

## **2.2 Bases teóricas**

### **2.2.1 Luma chequen (Molina) A. Gray “Arrayán”**

#### **2.2.1.1 Definición**

La *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” es un vegetal que mide entre cinco y seis metros de alto; y de cobertura, cinco metros de diámetro. Crece particularmente en los Andes. Debido a la humedad, lo arenoso del suelo y la profundidad con que crecen, su desarrollo es favorecido. Es una planta medicinal, que produce reacciones antiinflamatorias, es antifúngica, previene la diarrea y es antiséptica. (18)

#### **2.2.1.2 Clasificación taxonómica**

De acuerdo al sistema clasificatorio de A. Cronquist (1981), determinados por Beltrán SH y Soria LR, esta planta se sitúa en la siguiente categoría taxonómica.

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Subclase: *Rosidae*

Orden: *Myrtales*

Familia: *Myrtaceae*

Género: *Luma*

Especie: *Luma chequen* (Molina) A. Gray

Sinónimos en el ámbito común: “Arrayán”, “Wallpuma”, “Rayán castilla” y “Luma”.

Sinónimos en el ámbito científico: *Eugenia bella* de *Luma chequen*, *Eugenia gayana* de *Luma chequen*, *Eugenia myrtomimeta* de *Luma chequen*, *Eugenia pulchra* de *Luma chequen*, *Eugenia chequen* de *Luma chequen*, *Myrceugenella gayana* de *Luma chequen*, *Myrtus gayana* de *Luma chequen*. (19)

### **2.2.1.3 Descripción morfológica**

Se trata de un arbusto cuya altura puede alcanzar hasta los 5 o 6 metros, cubriendo un diámetro de 5m. Tiene forma coposa, de denso follaje y de color verde todo el tiempo. Su copa tiene forma de globo. Las cortezas se describen de color marrón y lisa la externa, a su vez que la interna es de color blanco, de olor agradable y suave. Las hojas son opuestas, lisas, a la vez que simples y decusadas. De láminas elípticas de 0.5 a 2.5 cm de largo y 0.3 a 1.5 cm de ancho; de ápice agudo, de borde entero y base en forma obtusa. Peciolos muy cortos, con una longitud que va de los 1 a 2 mm. En cuanto a las flores, estas son blancas, solitarias, hermafroditas, axilares actinomorfas así como tetrámeras. Estas flores tienen tamaño medio, de 1 a 2 cm de largo, con estambres libres que llegan a medir 7 mm de largo; su pistilo es muy pequeño. Sus frutos adquieren forma de globo, tinte rojizo de escasas semillas y poca endosperma. (19)



Figura 1. Flor de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayán".

Lizcano, A. (13)



Figura 2. Hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayán".

Carhuapoma M. (18)

#### **2.2.1.4 Distribución geográfica**

Es posible encontrarlo en la cordillera de los Andes, del Centro de Sudamérica, entre Perú, Chile y Bolivia. Su crecimiento y desarrollo se da desde los 2500 m.s.n.m. hasta los 4000 m.s.n.m. Es distribuida en Perú en la sierra central y en el sur del país, específicamente en los departamentos de Ancash, Lima, Cerro de Pasco, Ayacucho, Junín, Cusco, con inclinación a las regiones del Sur. El terreno sobre el cual se desarrolla ha de poseer el subsuelo húmedo y cercano a las orillas de un río. (19)

#### **2.2.1.5 Aspectos fitoquímicos y bioquímicos**

En variedad de investigaciones se señala que hay presencia de determinados compuestos fenólicos, entre ellos están los derivados flavononas, derivados de flavonoles, a partir de flavonoides (tales como quercetina, hiperósido, miricetina, rutina, isorhamnetin), así como ácidos fenólicos (ácido clorogénico, ácidos feruloilquinico y ácido neoclorogénico). Además, la *Luma chequen* contiene compuestos de antocianinas (cianidina, ponidina, petudina, malvidina, delfidina), compuesto taninos, triterpenos y esteroides, así como aceites esenciales en sus más de 40 compuestos (monoterpenos y sesquiterpenos). (6)

#### **2.2.1.6 Usos terapéuticos**

Tratamiento de enfermedades como la gota, tos, diarrea, reumatismo, dolores molares, padecimientos gastrointestinales, infecciones postparto, elemento antiséptico, hemostático, astringente, vasoconstrictor, analgésico.

Entre otros usos, está el de evitar la putrefacción de los tejidos de cadáveres. Asimismo, sus hojas son usadas a manera de condimento para elaborar embutidos, así como aromatizante. (6)



Por otra parte, se le utiliza para combatir el mal aliento, haciendo uso de gárgaras después de hervir las hojas. (20)

Su administración es diversa, incluye tomarlo en mate, infusión (problemas gastrointestinales), baños de agua hervida (para el reumatismo, migraña), hojas molidas (transpiración del cuerpo, alivio de resfrío y fiebre). En cuanto a un uso externo, se aplica a lavados vaginales. Hojas cocidas permiten quitar el mal olor de los pies y los desinfecta (antimicótica). Permite fortalecer los nervios, indicado especialmente para deportistas. (20)

Carhuapoma M. (2016) demostró que el aceite esencial extraído de las hojas de arrayán tiene una función antioxidante. Mientras que Torres (2014) ha podido averiguar que el extracto de etanol de ésta planta cumple una actividad antimicrobiana, que es lo que justamente indaga la presente tesis. Por último, se indica que el uso de ésta planta disminuye de manera significativa la glucosa, pues contiene un hepolipemiente, disminuyendo concentraciones de LDL y VDL. (20)

## **2.2.2 Staphylococcus aureus**

### **2.2.2.1 Definición**

Este microbio es miembro de la estirpe *Staphylococaceae*, y que según su simbolización es gram positivo. (21)

El *Staphylococcus aureus* se trata de un microbio que prolifera en el ambiente, puesto que domina características singulares de virulencia, así como de resistencia contra compuestos antimicrobianos. (22)

En la especie humana produce una basta cantidad de infecciones, cuyo impacto principal es causado por cepas de *Staphylococcus aureus*. Estas son altamente resistentes a los antibióticos, especialmente de la meticilina (MRSA), que se consideraba eficaz en el tratamiento de infecciones. (22)

#### **2.2.2.2 Clasificación taxonómica**

El *Staphylococcus aureus*, es perteneciente al dominio bacteria, del reino eubacteria. El Filo o phylum al que pertenece es el *firmicutes*. Entre las categorías de rango inferior se considera a ésta bacteria de la familia *Staphylococcaceae*, que junto con las familias *Bacillaceae*, *Listeriaceae* además de otras menos frecuentes, se incluyen en el orden de los *Bacillales*, la misma que forma parte de la clase denominada *Bacilli*. El género al cual pertenece es el *Staphylococcus* de especie *aureus*. (23)

Cabe mencionar que el *Staphylococcus* agrupaba recientemente a unas 51 especies diferentes. Por otro lado, es importante señalar que la especie *aureus* se divide en un par de subespecies: *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* y *Staphylococcus aureus* subsp. *Anaerobius*. (23)

#### **2.2.2.3 Características morfológicas**

Entre sus características más visibles se encuentra que el *Staphylococcus aureus* tiene forma de cocos o células esféricas con un diámetro de 0,5 – 1 µm. Son además estáticos; es decir, no tienen movimiento, y tampoco generan esporas. Parte de sus cepas portan una cápsula de polisacáridos, pero generalmente no la llevan. (24)

Tal como lo señala su nombre (*staphyle* = racimo de uvas), éstas bacterias se agrupan formando cúmulos en forma de racimos, apareciendo también algunas

células únicas, en parejas y en tétradas. Las colonias que crean tienen una textura cremosa, de color amarillo dorado debido a los carotenoides producidos en su crecimiento (de allí proviene su nombre de especie: *aureus*). Aunque existen cepas que no producen tal pigmentación, siendo únicamente blancos. (23)

El *Staphylococcus aureus* puede crecer en medios de alta concentración de cloruro de sodio (15%) además de un intervalo de temperatura de entre 15 a 45°C. Prácticamente, la totalidad de cepas de *Staphylococcus aureus* originan y desencadenan enzimas coagulasa, así como el factor de afinidad a causa del fibrinógeno, además de la nucleasa termoestable (denominada DNasa). Esta bacteria es fermentadora de manitol. Esto es clave para establecer diferencias con otras especies de estafilococos. (25)

#### **2.2.2.4 Epidemiología**

La bacteria del *Staphylococcus aureus* está determinado como patógeno oportunista, formando parte de la microbiota humana. El nivel de colonización dentro del organismo alcanza un mínimo de 30% y un máximo de 50%, teniendo predilección por colonizar el área nasal. El huésped ideal para ésta bacteria es el individuo enfermo. Por ésta razón, el *Staphylococcus aureus* se disemina con más facilidad en los ambientes hospitalarios, de manera particular en los pacientes de hemodiálisis, de diabetes (tipo uno), con lesiones en la piel (cortes, quemaduras, llagas), infectados con VIH y los drogadictos por vía intravenosa. (23)

En tal sentido, el portador asintomático nasofaríngeo conforma el origen, con mayor frecuencia de los casos de infección de *S. aureus*. Cabe mencionar que

ésta bacteria resiste la aplicación de meticilina (SARM). Los pacientes más sensibles, para ésta cepa SARM son los que posean heridas quirúrgicas, bacteriemia por catéter y neumonía. (23)

La patogenia en las infecciones producto de *S. aureus* son ocasionadas por dos factores en conjunto: virulencia bacteriana y nivel bajo de las defensas del individuo (huésped). (23)

#### **2.2.2.5 Factores de riesgo**

Las lesiones que favorecen cuadros de infección por *S. aureus* son las lesiones cutáneas, quirúrgicas o posteriores a un trauma. Es aquí donde puede producirse bacteriemia, además de metástasis. Se hace evidente ante la formación de abscesos y supuras. Estas se propagan a tejidos aledaños. Por ejemplo, el ántrax, que es la infección de forúnculos hacia la capa de más profundidad del tejido dérmico. Esto produce bacteriemia en un 33% de casos. (23)

Las infecciones por motivo de metástasis y endocarditis son las principales complicaciones de bacteriemia. La frecuencia va desde un 5% a un 21% de casos. Las más perjudiciales consisten en insuficiencia cardíaca, embolias, abscesos hematógenos (viscerales o cerebrales), abscesos miocárdicos. (23)

Entre otros cuadros clínicos predispuestos se encuentran las infecciones musculoesqueléticas, infecciones de vías respiratorias, del sistema nervioso (meningitis), de vías urinarias. (23)

#### **2.2.2.6 Importancia clínica**

La bacteria patógena del *Staphylococcus aureus* es de las más importantes en lo que se refiere a infecciones en humanos, adquiridos en ambientes

nosocomiales como de la vida diaria, entre las cuales se producen casos de mortalidad. (24)

Las infecciones por éste estafilococo se dividen en los siguientes tres grupos: lesiones de la superficie dérmica (forúnculos, abscesos), infecciones invasivas y padecimientos provocados por determinadas toxinas. Debido a su vulnerabilidad, el que un paciente esté sometido con el catéter, válvulas, prótesis u otros implementos, la cantidad de estafilococos necesarios para producir enfermedad son mínimas. Asimismo, los que padece trastornos inmunológicos son susceptibles de infecciones por *Staphylococcus aureus*. (24)

En cuanto a la bacteriemia nosocomial, las infecciones por *S. aureus* ocupan la segunda causa en bacteriemia comunitaria. Y tercer lugar en bacteriemia nosocomial, después del *Staphylococcus epidermidis* y *E. coli*. Por otra parte, atendiendo a las vías respiratorias, el *S. aureus*, es causante del 13 al 19% de las neumonías nosocomiales. (23)

#### **2.2.2.7 Mecanismos de resistencia**

De acuerdo a la historia microbiológica, el *S. aureus* fue el primer organismo microscópico en manifestar resistencia a los antibióticos, siendo capaz a su vez de desarrollar diversos mecanismos que le han conferido tal propiedad ante los medicamentos propios de los tratamientos de estafilococos. (23)

Entre los diversos mecanismos de resistencia están los siguientes (23):

La Resistencia mediada por  $\beta$ -lactamasas: Dada por la producción de penicilinas plasmídica, la cual desactiva la penicilina G, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas.

Fenómenos de tolerancia: Estimula a la totalidad de  $\beta$ -lactámicos. Para su aniquilación (lisis y posterior muerte), se necesita que las concentraciones del antimicrobiano sean muy elevadas; mucho más que para inhibir su crecimiento. Esto implica restarle actividad autolítica, en cuanto se aplique un exceso inhibitorio de las autolisinas, obteniendo un efecto antibiótico lento. Aún se estudian las bases genéticas de tal fenómeno.

Resistencia a la metilina: Conociendo que la betalactamasa es degradadora de la penicilina, se hace uso de la metilina, la cual es penicilina semisintética, con mejor resistencia. No obstante, debido a mecanismo diversos (en función del gen *mecA*), la metilina también está siendo resistida por el microorganismo, de lo cual se concluye que existe resistencia intrínseca a todo tipo de  $\beta$ -lactámicos, incluyendo carbapenemes y cefalosporinas.

### **2.2.3 *Pseudomonas aeruginosa***

#### **2.2.3.1 Definición**

La *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria del tipo bacilo gram negativo, el cual se moviliza gracias a un flagelo polar único, no produce esporas, es oxidasa positiva, asimismo catalasa positiva. Produce, además, pigmentos de color verde amarillento (fluorescente), indol negativo, rojo metilo negativo. (26)

Es aerobio, patógeno, incidiendo sobre los humanos que sobrelleven las defensas bajas. Producen disfunción de mecanismos como “neutropenia o inmunosupresión relativa” (cirrosis hepática, diabetes mellitus, hemodiálisis, neoplasia activa, entre otros). (27)

Se le suele encontrar sobre el polvo, agua, verduras, plantas, animales y zonas de mar. Es así que prefiere localizarse en ambientes húmedos, a pesar de su factibilidad de adaptación a diversidad de circunstancias físicas. (26)

Su temperatura óptima de crecimiento es de 35° C, pero puede hacerlo a 42° C.

### **2.2.3.2 Clasificación taxonómica**

La *Pseudomona aeruginosa* se clasifica dentro del género *pseudomonas*, que se circunscribe a la familia *pseudomonadaceae*, situándose esta a su vez en el orden *pseudomonadales*. La clase a la que pertenece es gamma proteobacteria, y el filo, proteobacteria. (28)

Las especies del género *pseudomonas*, por lo general, tienen un crecimiento rápido, presentando metabolización amplia de substratos, entre los que se incluyen compuestos orgánicos, hidrocarburos aromáticos y alifáticos. Estas cepas son con frecuencia resistentes a desinfectantes, metales pesados, solventes orgánicos, detergentes y antibióticos. (28)

### **2.2.3.3 Características morfológicas**

Es un bacilo gramnegativo, curvado de forma ligera. Muy cambiante en lo que concierne a nutrición. No es productora fermentativa de hidrocarburos, pero sí produce ácidos desde los azúcares sencillos, como la glucosa, lactosa, fructuosa y sacarosa. (29)

Sus colonias poseen un color azul verdoso. Producto de pigmentos fluorescentes (amarillo-verdoso) o piocianina (azul hidrosoluble). En su mayoría, éstas cepas contienen un olor semejante al de la fruta en estado de madurez o al de la uva.

Estas colonias también tienen un brillo metálico, de conformación viscosa, específicamente en las zonas con mayor población en crecimiento. (29)

Sobre la cubierta celular de la *Pseudomonas aeruginosa*, está demostrado que la permeabilidad existente en su membrana externa es baja (un 8% de la que posee la *E. coli*), debido a que contiene propiedades porinas.

La principal función que cumplen las porinas es la de servir de canal o poros que regulen el paso, por medio de la membrana externa, de sustancias, como iones y moléculas hidrofílicas. (28)

#### **2.2.3.4 Epidemiología**

Debido a que la principal manifestación de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* lo conforman las infecciones hospitalarias, queda claro que la condición primaria de su potencial patogénico, factor de virulencia, es la situación de salud del respectivo huésped humano. (29)

Las infecciones producidas por *Pseudomonas* poseen un carácter eminentemente oportunista, pudiendo representar del 10% al 20% de infecciones nosocomiales. (30)

En pacientes que no padecen fibrosis quística, la *P. aeruginosa* es transmitido por medio del contacto físico, siendo la vía aérea de poco advenimiento. El uso de antibióticos modifica la biota orofaríngea natural, permitiendo que la *P. aeruginosa* la colonice con más facilidad. Se ha observado que este puede ser el paso inmediatamente anterior a la colonización de los bronquios. Este microbio es poco frecuente de hallar en personas sanas. (30)



En cuanto a los pacientes con fibrosis quística su descenso, en los EE.UU., ha sido reducido: del 60% en 1995 al 56% en 2005. Un dato importante señala que los pacientes que superan los 35 años de edad, padecen de ésta infección en un 80%. Se ha hallado que existen receptores específicos para la *P. aeruginosa* en el epitelio de los bronquiolos (árbol respiratorio). (30)

#### **2.2.3.5 Factores de riesgo**

El empleo de carbapenems, ceftriaxona y ciprofloxacina se relaciona con el incremento de incidencias de infección por bacteria *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente. (27)

Por otro lado, este tipo de *Pseudomonas aeruginosa* se encuentra presente durante aquellos procedimientos invasivos que se llevan a cabo en la Unidad de cuidados intensivos. (27)

En ese sentido, considerando a los cuadros de neumonía como aquellos que prevalecen entre las infecciones hospitalarias (26%), estos se configuran como el principal factor de riesgo. Los patógenos colonizarían el estómago, luego las vías de respiración, bronquios, bronquiolos y pulmones. Los más sensibles a la infección por *Pseudomonas aeruginosa* son aquellos pacientes que muestran convulsiones, pérdidas de consciencia, o sean sometidos a ventilación mecánica. (31)

En segundo lugar, se encuentran las infecciones relacionadas a escenarios de cirugía (19%). En donde inciden tanto factores de tipo exógeno (instrumentos, materiales, aire) como de tipo endógeno (microbiota, estado del doliente, padecimientos afines). (31)

En tercer lugar, de factores de riesgo, se hallan a las infecciones urinarias (17%). Ocurridas por la propia microbiota del paciente o el ambiente; se relacionan mucho con el uso permanente de sondas vesicales. (31)

Bacteriemias, que es la menos común, es otro factor de riesgo para la infección por *Pseudomonas aeruginosa*. Ocurre a causa de la biota cutánea, en asociación del uso implantado de catéteres o dispositivos intravasculares. (31)

### **2.2.3.6 Importancia clínica**

La evidente muestra de resistencia a antibióticos es reconocida como un problema clínico. La *Pseudomonas aeruginosa*, de acuerdo a diversos estudios, tiene una predilección singular por desarrollar una importante resistencia. (27)

Esta bacteria infecciosa conforma uno de los principales patógenos nosocomiales con mayor prevalencia en los entornos hospitalarios. Es también un patógeno de corte oportunista. Tiene gran movilidad gracias a sus fibras, flagelo polar y pilis sexuales, además de gran versatilidad para adaptarse con rapidez tanto en su hábitat como metabólicamente. Formando parte incluso del microbiota intestinal. (31)

La gama de infecciones que puede provocar esta bacteria transcurre desde una simple foliculitis hasta la producción de una bacteriemia, que llega a ser mortal. Entre sus infecciones más comunes se encuentran las afectaciones a córnea, piel, uretra, bronquios, sin olvidar que éste peligroso patógeno puede infectar cualquier zona o punto del organismo. Se tiene que tener especial cuidado con los pacientes de quemaduras o fibrosis quística. (28)

Las infecciones a causa de *P. aeruginosa*, se clasifican en dos tipos: agudas y crónicas. Las primeras refieren a situaciones invasivas, asociadas a neumonía,

citotóxicas, que derivan con frecuencia en “infección sistémica, shock séptico y elevada mortalidad”. Por su parte, las infecciones crónicas, se asocian a fibrosis cística, pues debido a la mucosidad, la acción invasiva se reduce, no son citotóxicas y tienen muy poca probabilidad de ocasionar infección sistémica; sin embargo, causa un deterioro continuo del tejido pulmonar a lo largo de los años, produciendo muerte. (28)

En cuanto a su cultivo, éste no presenta complejidades, ya que sus requerimientos en lo nutricional son simples: aerobio y quimiorganotrofo (carbono orgánico, nitrógeno. Siendo cultivables en agar sangre y agar McConkey. La temperatura cultivable va desde los 4° hasta los 42°C. (31)

#### **2.2.3.7 Mecanismos de resistencia**

La bacteria *Pseudomonas aeruginosa* mantiene un grado de resistencia muy elevado. Por un lado, posee resistencia natural o intrínseca a antibióticos, y por otro una gran capacidad para adaptar mecanismos de eficiente resistencia, lográndose por medio de mutaciones. (31)

La denominada resistencia intrínseca hace referencia a la falta casi total de aislados de la especie bacteriana frente a un efecto antimicrobiano. Esta se da en mayor medida, en la capa externa, su membrana, donde el factor con más preponderancia para tal acto de defensa es la manifestación de bombas de expulsión (mexAB-OprM), cuya capacidad de eliminación abarca sustancias antibióticas como betalactámicos, cloranfenicol, tetraciclina, macrólidos, fluoroquinolona. (29)

Otro mecanismo que utiliza la célula bacteriana es la pérdida de porinas, lo que incide en la limitación drástica de los antibióticos para poder acceder a la *Pseudomona aeruginosa*. Siendo la porina más abundante la OprF. (29)

Otro mecanismo es la producción de enzimas de Betalactamasas AmpC cromosómica, en presencia del inductor en niveles adecuados, ya que promueven la sobreexpresión continua del gen AmpC, resultando suficiente y efectivo para neutralizar los efectos de una gran cantidad de penicilinas y “cefalosporinas antipseudomónicas”. Un mecanismo de menor frecuencia es la producción de betalactamasas plasmídicas. (29)

## **2.3 Hipótesis**

### **2.3.1 Hipótesis general**

El extracto etanólico a diferentes concentraciones de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” posee actividad antibacteriana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

### **2.3.2 Hipótesis específicas**

- El extracto etanólico a diferentes concentraciones de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” posee metabolitos secundarios responsables de su actividad antibacteriana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.
- El extracto etanólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” posee actividad antibacteriana en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.
- El extracto etanólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” presenta actividad antibacteriana en cepas de *Staphylococcus aureus*.

## 2.4 Variables

*Variable independiente:*

“Extracto etanólico a diferentes concentraciones de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán”.

*Variable dependiente:*

“Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*”.

### 2.4.1 Tabla de Operacionalización de Variables

<b>VARIABLE INDEPENDIENTE</b>	<b>DIMENSIONES</b>	<b>INDICADORES</b>
Extracto etanólico a diferentes concentraciones de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray “Arrayán”.	Las hojas fueron trituradas y luego se le añadió etanol a diferentes concentraciones	Identificación de metabolitos secundarios concentración: Extracto al 50% Extracto al 70% Extracto al 96% Extracto al 100%
<b>VARIABLE DEPENDIENTE</b>	<b>DIMENSIONES</b>	<b>INDICADORES</b>
Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC.	Número de halos de inhibición de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .

## **2.5 Marco conceptual**

### **In vitro**

Referido a fenómenos biológicos producidos en tejidos o células de un extracto o cultivo celular, también puede estar presente en mezclas sintéticas de composición celular. (32)

### **Simbiosis**

Es considerado como la asociación de 2 organismos de especies distintas que conviven unidos, usualmente son usados para una asociación en la que los individuos sean beneficiados, conocido como mutualismo. (32)

### **Bacterias**

Son microorganismos procariontes que no pertenecen a las arqueas. Difieren de éstas debido a su bioquímica como también a la filogenia molecular. Su composición es unicelular variada (metabólica y ecológica). Viven en tierra o agua, son de vida independiente, aunque también pueden existir como parásitos, sobre todo saprófitos de seres vivos. Las de tipo parasitario provocan múltiples infecciones en los individuos. (32)

### **Actividad antibacteriana**

Está referida a la capacidad de eliminar o inactivar los microorganismos. (33)

### **Concentración**

Se le denomina de ésta manera al antibiótico con la capacidad de inhibir el aumento de cepas bacterianas. (33)

### **Halos de inhibición**

Está referida a la región que encierra el disco producido por el antibiótico durante el antibiograma, mecanismo para medir la potencialidad de un antibiótico ante una bacteria. (34)

## CAPÍTULO III:MÉTODO

### 3.1 Tipo de estudio

La caracterización metodológica en la presente investigación atiende al carácter aplicativo, longitudinal y descriptivo. Es descriptivo porque detalla, cualifica y define la relación causa-efecto que existe entre las dos variables independiente (x) y dependiente (y). Es longitudinal porque la parte referida a la experimentación se trabajó en varios instantes de ejecución. Asimismo, es aplicada debido a que sus resultados muy posiblemente tengan utilidad práctica en un futuro próximo.

Esta investigación se tipifica dentro del nivel explicativo-descriptivo, puesto que describe la actividad antibacteriana relativa a la planta *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” sobre las cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* así como de *Staphylococcus aureus*. Además, se procuró hallar las causas de tal fenómeno.

### 3.2 Diseño a utilizar

El actual estudio tuvo un diseño calificado como “cuasi experimental”. Es decir, la investigación plantea y se desarrolla tomando conjuntos ya estabilizados sin influencia de la aleatoriedad. El diseño tal es aplicado en contextos y circunstancias reales donde el azar no interviene en la formación de grupos, pero sí que puede influenciarse a la variable experimental. Se considera el diseño siguiente:



E	O	X	0
	1		2
C	O	-	0
	1		2

**En donde:**

E:	Grupo experimental
C:	Grupo de control
O1:	Pretest
X:	Variable independiente
O2:	Postest

### **3.3 Población**

Especie denominada *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán”, procedentes de la localidad distrital de San Mateo de Huanchor, en la provincia limeña de Huarochirí, ubicada a una altura de 3149 m.s.n.m.

### **3.4 Muestra**

La requerida muestra fue recolectada de plantaciones procedentes del distrito de San Mateo de Huanchor (latitud 11° 45' 33" S, longitud 76° 18' 12" W), de la provincia de Huarochiri, departamento de Lima, ubicada a 3149 m.s.n.m..Se recolectó 2 kg de la muestra y empleada 1 día después de su recolección, para proceder con la elaboración del extracto etanólico.

## **3.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

### **3.5.1 Técnicas de Procesamientos y Análisis de Datos**

Se consideró pertinente para el estudio efectuar la conocida Prueba de LEVENE, con respecto a los halos inhibitorios que hallamos en el extracto de la *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayán" en presencia del *Staphylococcus aureus*. A continuación, la prueba de homogeneidad de varianzas, la misma que permitió definir si la varianza de cada método aplicado se mantiene igual o es diferente visto desde la estadística. De ello depende la determinación del tipo de prueba estadística inferencial que será aplicada. Se concluye que las varianzas de los métodos que fueron aplicados no corresponden homogéneamente. Para éste caso, se empleó la prueba "No paramétrica de Kruskal Wallis". Por otra parte, para establecer si las mediciones son variadas entre sí se aplicó la prueba de "Mann Whitney".

### **3.5.2 Equipos, materiales y reactivos**

#### **Equipos**

En el experimento se emplearon instrumentos y equipos de la lista siguiente:

1. Autoclave Vertical Digital EQ-CCA-054 Reles AL/D 50L S: 476-15
2. Balanza Analítica EQ-CCA-037 AND HR 250 AZ S: GA7702480
3. Baño María EQ-CCA-009 Memmert WNE-10 S: L307.0363
4. Estufa EQ-CCA-001 Memmert UN55 S: B215-2490
5. Incubadora 35°C EQ-CCA-026 Labor LP-11 S: 69-6315/4
6. Luz UV (ultravioleta) 254 - 366 nm Memmert ZRN12
7. Mechero Bunsen

8. Potenciómetro EQ-CCA-005 Inolab 730 S: 10380849
9. Vernier digital Caliper Model: DC-51

### **Materiales**

A continuación, se muestran los utensilios usados en el trabajo:

10. Asa bacteriológica
11. Asa de de Drigalsky de vidrio
12. Baguetas
13. Baguetas de vidrio
14. Escala de Mac Farland
15. Espátulas
16. Frascos de vidrio de 200mL de capacidad con tapa rosca
17. Frascos de vidrio de 500mL de capacidad con tapa rosca
18. Gradilla
19. Indicador multiparámetro de esterilización
20. Limaduras de magnesio
21. Micropipeta calibrada de 0.5-5mL
22. Micropipeta calibrada de 20-200 $\mu$ L
23. Papel craft
24. Pipeta Pasteur
25. Placa de toques
26. Placas Petri de vidrio 90 mm de diámetro x 15mm de altura
27. Puntas para micropipeta de 0.5-5mL
28. Puntas para micropipeta de 20-200  $\mu$ L
29. Sacabocado con diámetro interno de 6mm

30. Tubos de ensayo
31. Tubos estériles 150 mm con tapa rosca
32. Viales de vidrio de 5 mL de capacidad

Seguidamente, se presentan los insumos utilizados:

33. Caldo nutritivo Trypticasa Soya (TSB) (HIMEDIA)
34. Agar Trypticasa Soya (TSA) (HIMEDIA)
35. Agar Muller Hilton (HIMEDIA)
36. Solución Gentamicina 0.25mg/mL (Control positivo).
37. Agua destilada estéril

Asimismo, los inóculos son los siguientes:

38. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 Termo Scientific
39. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 Termo Scientific

### **Reactivos**

El experimento precisó de la utilización de los siguientes reactivos:

40. Ácido clorhídrico concentrado (37%)
41. Ácido sulfúrico concentrado ( $H_2SO_4$ ) 95-97%
42. Agua destilada
43. Alcohol 96°
44. Cloroformo Q.P.
45. DMSO (dimetil sulfóxido)
46. Etanol 70° diluido
47. Hidróxido de sodio al 10%

48. Metanol Q.P
49. Reactivo de Baljet
50. Reactivo de Wagner
51. Reactivo de Dragendorff
52. Reactivo de Kedde
53. Reactivo de Mayer
54. Reactivo de Cloruro férrico
55. Reactivo de Fehling A
56. Reactivo de Fehling B
57. Reactivo de Lieberman-Burchard
58. Reactivo de Ninhidrina
59. Reactivo de Shinoda
60. Suero fisiológico estéril o solución salina (NaCl 0.9%)

### **3.6 Procedimiento de Datos**

La experimentación comprende la realización de procesos que incluyan los ensayos previos, tanto como la indagación central de las funciones antibacteriana de la *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayán".

#### **3.6.1 Procedimiento Experimental (Etapa I)**

Elaboración de fichas con las que se recopilarán datos bosquejados por investigadores en el tema:

- a) marcha fitoquímica
- b) prueba de solubilidad
- c) actividad antibacteriana

Los instrumentos se validarán por medio del juicio de expertos. Posteriormente, serán aplicados adecuadamente.

### **Procedimiento experimental**

La clasificación en la ciencia de la taxonomía de la especie vegetal *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” fue establecido en las instalaciones primarias del “Herbario San Marcos” (anexo 2), del “Museo de Historia Natural” de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

### **Colecta e identificación de la población en estudio**

La requerida muestra fue recolectada en la zona distrital de San Mateo ubicado en Huarochirí, región Lima, Perú. La muestra fue empleada 1 día después de su recolección, se recolectó 2 kg de la especie *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán”, para luego ser seleccionadas solo las hojas teniendo en cuenta el color característico (verdes oscuros sin manchas).

### **Microorganismo**

Las cepas bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) y de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) se repicaron en un laboratorio que está ubicado dentro de las instalaciones de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. El periodo en el que se desarrollaron los análisis comprendió la totalidad del segundo mes de 2019.

### **Extracto etanólico de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán”**

Fue recolectó un estimado de 2 kg de ésta planta, luego de la selección de las hojas considerando el color característico (verdes oscuros sin manchas), se obtuvo aproximadamente 400g de hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” ; a dicha cantidad de muestra se aplicó un secado en la estufa a una temperatura de 40°C durante cinco días. Se requiere sin humedad para poder triturarlas con el mortero.

Se tomó un frasco de vidrio de boca ancha (color ámbar), y se añadieron 400 g triturados de la muestra, se agregó seguidamente 2000 mL de etanol, posteriormente se cubrió herméticamente dejándose en maceración durante un tiempo de cinco días con temperatura ambiental. Es necesario señalar que el frasco que contiene la muestra, fue agitado por lo menos dos veces al día. Pasado el tiempo, el extracto macerado se filtró por el método de bomba al vacío. Con ello se obtuvo el extracto etanólico separado de todo residuo. La sustancia filtrada se metió en la estufa a una temperatura de 40°C para ser concentrado durante 4 días. Una vez concluido este proceso, se raspa el plato y se coloca el desecado en un vial, donde se realizará la denominada “marcha fitoquímica”.

### **Ensayo de solubilidad**

Este procedimiento tiene el objetivo de reconocer el nivel de solubilidad relativo a aquellos metabolitos de orden secundario. Utilizando la placa de toques, agregándose una disminuida fracción del extracto seco de hojas sobre cinco pocillos distintos, a los cuales se les agregó una gota de solventes (cloroformo, metanol, etanol, dimetil sulfóxido (DMSO) y agua destilada).

### **Preparación de la concentración del extracto**

Este fue sometido considerando las cuatro soluciones: 100%, 96%, 70% y 50%.

Para elaborar diluciones teniendo como base el extracto etanólico, se usó alcohol de 96 °. Como recipiente se usaron frascos ambar de 50 mL como sigue:

- 100%: se añadió 25 mL del extracto.
- 96%: se agregó 24 mL de extracto y 1 mL de etanol.
- 70%: se añadió 17.5 mL del extracto y 7.5 mL de etanol.
- 50%: se agregó 12.5 mL del extracto y 12.5 mL de etanol.

### **Marcha fitoquímica**

Sirvió para evaluar la existencia de otros metabolitos. Por ello, se empleó el método del Tamizaje fitoquímico, cuya creadora fue Olga Lock Sing de Ugaz.

<b>SOLVENTE</b>	<b>PRUEBA O ENSAYO</b>
Agua	1 gota de la muestra + 1 gota de solvente
Etanol	1 gota de la muestra + 1 gota de solvente
Metanol	1 gota de la muestra + 1 gota de solvente
Cloroformo	1 gota de la muestra + 1 gota de solvente
DMSO	1 gota de la muestra + 1 gota de solvente

### Prueba para flavonoides

Para su determinación, se ha desarrollado el ensayo de Shinoda, para lo cual se empleó tan solo 1 mL de filtrado etanólico dentro de un tubo de ensayo, al que luego se agregaron limaduras de magnesio, dejándose caer por el tubo HCl



concentrado al 37%. Si se observa la coloración naranja, rosado o violeta, se señala la presencia de flavonoides.

#### Prueba para antocianinas

Dentro de un tubo de ensayo, se añadieron 2 mL de filtrado, agregándose seis gotas del mineral ácido. Normalmente, se observa un color naranja o rojizo. Las antocianinas divergen por mostrar un color diferente ante pH distintos.

#### Identificación de Lactonas

##### Ensayo de Baliet

Se agregó 2 mL del respectivo extracto y agregar de 3 a 4 gotas de reactivo de Baliet conteniendo ácido pícrico con hidróxido sódico. Se considera positivo en cuanto se manifieste el color rojo naranja u oscuro.

#### Identificación de Alcaloides

##### Ensayo de Dragendorff

Se añade 1 mL de HCl 10% a 1 mL del extracto y calentar por diez minutos. Agregar gotas del reactivo Dragendorff, exactamente 3 gotas. Es considerado positivo cuando se manifiesta precipitadamente de color anaranjado-marrón.

##### Ensayo de Mayer

Se tomó 1 mL del HCl 10% y añadir a 1 mL del extracto. Se calienta hasta alcanzar la temperatura de 60°C durante 10 minutos, agregando tres gotas del reactivo Mayer. Se contempla como positivo ante la presentación del precipitado color blanco.

##### Ensayo de Wagner

Se tomó 1 mL del HCl 10% y añadir a 1 mL del extracto. Calentarse a una temperatura de 60°C durante 10 minutos. Luego de ello, agregar tres gotas del reactivo Wagner. Se torna positivo si la coloración es marrón.

#### Cardenólidos

Se añadieron 2 mL de esencia (extracto) y 1 mL de reactivo Kedde. Estos cardenólidos junto a sus agliconas permiten observar un color violeta azulado, el mismo que se desvanece dentro de una hora o dos horas como máximo.

#### Saponinas

Se colocó dentro de un tubo de ensayo 2 mL de extracto; al mismo, se agregó agua caliente a una temperatura de 40°C. La sustancia formada se tendrá que dejar reposar de 15 a 30 minutos, una vez cumplido el tiempo se agitará uno o dos minutos. Tendría que aparecer espuma como símbolo de positividad de la prueba.

#### Identificación de Compuestos fenólicos y Taninos

Se depositó 1 mL del extracto y se agregaron 3 a 4 gotas de tricloruro de hierro. Se identifica como positivo si existe presencia de un color azul oscuro proyectándose a verde oscuro.

#### Prueba para aminoácidos

##### Ensayo de Ninhidrina

Se agregó 1 mL de extracto. A este, se le adicionó 2 mL de ninhidrina. Poner a calentar hasta el punto de ebullición y mantenerlo durante 1 min. Enfriar. De observarse coloraciones violetas o azul violeta, la prueba se determina como positiva.

### Identificación de Triterpenos y esteroides

#### Prueba de Liebermann-Burchard

Se agregó 2 mL del extracto, luego se añadió 1 mL de cloroformo y de anhídrido acético, dejándose reposar sobre frío. La manifestación de los colores verde, rosa, azul, púrpura o rojo, ante la reacción de una o dos gotas de ácido sulfúrico en concentración, confirma la aparición de triterpenos y esteroides.

### Azúcares Reductores

#### Prueba de Fehling

Se añadió 1 mL de extracto y vaciarlo sobre un tubo de ensayo. Adicionarle 1 mL de Fehling A y 1 mL de Fehling B (reactivos compuestos por sulfato de cobre, así como de tartrato de sodio más potasio). Dejar al fuego constante y directo. Es positivo cuando el precipitado se colorea de rojo ladrillo (óxido cuproso).

### **3.6.2 Procedimiento Experimental (Etapa II)**

#### **Determinación de la actividad antibacteriana**

La determinación de este experimento se obtuvo aplicando la metodología de difusión en agar por pocillo, pero considerando algunas modificaciones; ya que se debía examinar la eficacia de la muestra.

#### **A. Preparación y estandarización del inóculo**

Se han seleccionado cultivos de dieciocho a veinticuatro horas en "Agar tripticasa" de soya incubados a una temperatura de 37°C a los microorganismos *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 9027 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, donde se eligieron de entre una a dos colonias completamente aisladas. Estas

fueron disueltas en los tubos de ensayo, las que contenían 10 mL de suero fisiológico (0.9% de cloruro de sodio). Por lo tanto, la solución resultante presentó una turbidez relacionada con el tubo de ensayo N°1, usando la escala MacFarland, el cual está dentro de la concentración  $3 \times 10^8$  UFC/mL.

Es con base a esta solución última, que se realiza la dilución “de 1 en 3”. De lo anteriormente preparado, se tomó 3 mL, y se diluyeron en 9 mL de volumen conteniendo suero fisiológico en tubo de tapa rosca. La concentración de la solución que resulte de esa combinación alcanzará los  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Finalmente, se ha obtenido que uno de los tubos de ensayo contiene una solución que alcanza el número polinomial de  $1 \times 10^8$  UFC/mL de *Staphylococcus aureus*, mientras que otro tubo de ensayo guarda una solución de  $1 \times 10^8$  UFC/mL de la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

#### **B. Preparación de las placas**

Con la intención de determinar efectos antibacterianos, se llegó a preparar placas Petri con Agar Mueller Hinton. Se agregó una cantidad de agar según el fabricante en un frasco con agua destilada. El preparado se calentó hasta llegar al punto de ebullición. Además, para asegurar la disolución del agar, se agitó varias veces. Luego, se esterilizó en autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por quince minutos. Ya esterilizado, se divide en el rango de 20-30 mL en las placas Petri estériles y se tuvo que esperar entre 15 a 20 minutos hasta alcanzar el estado de solidificación.

#### **C. Inoculación de las placas**

Se procedió a recoger 100  $\mu\text{L}$  por inóculo bacteriano ( $1 \times 10^8$  UFC/mL de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*). Se agregó el inóculo en la superficie del agar y con la espátula de drigalsky se esparció por la superficie de la placa. El procedimiento es repetitivo y la placa es girada dos veces a  $60^\circ$ .

Asimismo, la siembra de placas es asegurada de borde a borde, de forma contraria las lecturas podrían presentar inconvenientes. Finalmente, se dejaron secar de tres a cinco minutos, esto con tiempo de anticipación, ya que luego se hicieron los pocillos.

#### **D. Preparación de los pocillos con las muestras**

Los pocillos se realizaron con sacabocado estéril. Los sacabocados se esterilizaron en un horno a una temperatura de 180°C durante un tiempo de 60 minutos. Se realizó tres pocillos por placa. Estos se deben ubicar a 15 mm o más del borde de cada placa; ésta distribución evita que los halos inhibitorios se superpongan.

#### **E. Sembrado de las muestras y controles**

Se establece trabajar usando 4 placas para las respectivas diluciones. Cada dilución se siembra por triplicado, agregando 40uL a cada pocillo perteneciente a *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayán". Como grupo de control negativo o muestra blanco se utilizó el agua destilada estéril y se sembró 40 uL en tres placas. Como control positivo se usó una solución de gentamicina que equivale a 0.25 mg/mL. Para ello, también se sembró por triplicado 40 uL.

#### **F. Incubación**

Las placas que posean inoculaciones se llevan a la incubadora. Después de ello, se colocan de forma invertida y se incuban a una temperatura de 37°C por un total de 24 horas.

#### **G. Interpretación de los resultados**

Al término de las 24 horas de incubación, se miden los respectivos diámetros de las zonas inhibidas, las cuales tienen que moldearse de manera circular en una

“capa homogénea” de crecimiento de las bacterias. Esta medición se hizo iluminando la parte posterior de la placa tipo petri, por encima de fondo negro. El cálculo se originó con el uso de vernier digital graduada en milímetros. Valores de estos cálculos se multiplican por tres en cada pocillo. El resultado se promedió y comparó justamente con medidas de halos de inhibición producido por antibióticos.

### **Determinación de la concentración mínima inhibitoria**

Siendo elaborado y estudiado mediante el método de Andrews MJ. *Determination of Minimum Inhibitory Concentration*. J Antimicrob Chemother (2001), y sus modificaciones.

#### **A. Preparación de los tubos con Caldo Tripticasa Soya**

Este “Caldo Tripticasa Soya (TSB)” fue preparado bajo indicaciones del propio fabricante, agregando el medio de cultivo deshidratado en agua destilada. El caldo en mención tuvo un pH de entre 7.1 – 7.5. Seguidamente, se agregó 10 mL de caldo elaborado a quince tubos de ensayo de tapa rosca, por cada bacteria. Estos tubos han sido correctamente esterilizados en autoclave, bajo las temperaturas de 121°C y también 15 psi por 15 minutos. Seguidamente, los tubos fueron temperados (temperatura ambiente) y estos fueron ubicados en una gradilla. Se seleccionaron quince muestras y dos de ellos fueron usado como control negativo y positivo, respectivamente.

#### **B. Preparación de los inóculos bacterianos**

En función a las colonias puras del microorganismo *Pseudomonas aeruginosa* se seleccionaron determinadas cantidades de colonias para luego ser diluidas en tubos de ensayo con 10 mL de suero fisiológico estéril, por ello, la solución

que se obtuvo asumió una turbidez parecida al tubo número uno en la escala Mac Farland  $3 \times 10^8$  UFC/mL. Después, se extrajo 3 mL para ser diluidos a un volumen de 9 mL conteniendo suero fisiológico. Todo esto dentro del tubo de ensayo de tapa rosca. Con ello se logra una concentración de  $1 \times 10^8$  UFC/mL. Similar procedimiento se sigue para el caso del *Staphylococcus aureus*.

### **C. Llenado de los tubos con Caldo Trypticasa soya**

Se agrega el caldo tripticasa soya en sus respectivos tubos, se toma en cuenta lo siguiente:

El tubo número 1 posee 19.8 mL, mientras que al tubo que van del 2 hasta el 15, se le agrega 10 mL. Asimismo, a un par tubos, se le añadió 10 mL de caldo tripticasa soya como objeto de los controles.

### **Preparación de los tubos con el extracto etanólico y Caldo Trypticasa Soya (TSB)**

#### **Para la prueba con *Staphylococcus aureus***

El extracto fue trabajado sobre 15 concentraciones; éstas fueron: 1%, 0.5%, 0.25%, 0.125%, 0.0625%, 0.03125%, 0.01562%, 0.00781%, 0.00390%, 0.00195%, 0.00097%, 0.00048%, 0.00024%, 0.00012% y 0.00006%.

Se ha determinado la cantidad numérica de extracto atendiendo la ecuación siguiente:

$$\begin{aligned} (\text{Volumen del extracto}) \times (\text{Concentración del extracto}) &= \text{Concentración deseada} \\ &\times \text{Volumen de mezcla} \end{aligned}$$

$$E \times 100\% = 1\% \times 20 \text{ mL}$$

$$E = 0.2 \text{ mL}$$

Al tubo de ensayo de numeración 1 de 19.8 mL, conteniendo Caldo Tripticasa Soya (TSB) se le aumenta 0.2 mL de extracto al 100% de concentración. El total de volumen es 20 mL. Se mezcla.

Del tubo número 1 se retiró 10 mL, los mismos que se agregaron al tubo 2, es así que la concentración disminuyó en su media.

El procedimiento se repite hasta reducir la concentración de éste extracto a su fracción media, partiendo del tubo 2 hacia el 15.

Al tubo número 15 se le apartaron 10 mL, desechándose luego, para establecer una horizontalidad con los demás tubos, los cuales poseen todos 10 mL.

Este mismo procedimiento se aplicó también para el caso de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

#### **D. Inoculación de los tubos**

Se agregaron 100 uL provenientes del inóculo bacteriano compuesto de *Staphylococcus aureus* a los primeros quince tubos, una por una, y también al tubo control positivo.

El mismo procedimiento se sigue para las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ( $1 \times 10^8$  UFC/mL).

#### **E. Incubación de los tubos**

17 tubos han sido incubados a 37°C durante 24 horas.

#### **F. Interpretación de resultados**

Se incubaron por 24 horas. Luego por medio de la observación se determinó si eran negativos o positivos, para ello se utilizaron los tubos control.



De los tubos analizados, solo aquellos que presentan turbidez se etiquetaron como positivos (+) para el crecimiento poblacional de bacterias, mientras que aquellos tubos que no presentaron ésta turbidez se clasificaron como negativos (-).

Finalmente, los resultados obtenidos se procesaron y plasmaron en una estricta tabla, donde el valor asignado a la concentración mínima inhibitoria se determinó haciendo foco en la turbidez del tubo concentrado.

# CAPÍTULO IV:PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

## 4.1 Presentación de resultados

Tabla 1. *Prueba de solubilidad del extracto etanólico de Luma chequen (Molina)*  
A. Gray "Arrayán".

SOLVENTE	RESULTADOS
Agua	-
Etanol	++++
Metanol	+
Cloroformo	++
DMSO	+++

Leyenda:

(++++) Muy soluble,

(+++) Soluble

(++) Poco Soluble

(+) Parcialmente soluble,

(-) Negativo

Tabla 2. Prueba de solubilidad del extracto etanólico de *Luma chequen* (Molina)

A. Gray "Arrayán".

Metabolitos	Reactivo	Demostración	Identificación	Resultados
Identificación De Antocianinas	NaOH10%	2ml de muestra+6 gotas NaOH 10%	Coloración rojiza	+
Identificación De Alcaloides	Dragendorff	1 mL de HCl 10% + 1mL de extracto. Evaporar el solvente + 3 gotas de reactivo Dragendorff.	Coloracion Rojo ladrillo	+
	Mayer	1 mL de HCl 10% + 1mL de extracto. Evaporar el solvente + 3 gotas de reactivo Mayer..	Precipitado color blanco	+++
	Wagner	.1 mL de HCl 10% + 1mL de extracto. Evaporar el solvente + 3 gotas d reactivo Wagner.	Precipitado color marron	+
Identificación De Lactonas	Baljet	2 mL de extracto +3-4 gotas de reactivo bajlet	Color rojo ladrillo	++
Identificación De Flavonoides	Shinoda	1 mL de muestra +1-3 limaduras de magnesio + x gotas de HCl 37%	Coloracion anaranjado	++
Identificación De Aminoacidos	Ninhidrina	1 mL de muestra+ 1 mL de ninhidrina +evaporar solvente 1 min	Coloración violeta	-
Identificación De Cardenolidos	Reactive Kedde	2 mL de muestra +1mL de reactivo Kedde	Coloracion azul-violeta	+
Identificación De Saponinas	Reacción de espuma	2mL de muestra + calendar a 40°C +reposar 15-30 min +agitar 1 a 2 min	Formación de espuma	-
Identificación De Triterpenos y Esteroides	Lieberman -Burchard	2 mL de la muestra + 1 mL de cloroformo resbalando por las paredes + 1 mL de anhídrido acético +reposar en frio +1 o 2 gotas de acido sulfurico	Coloración verde o azul verdoso	+
Identificación De Azucares Reductores	Fehling	1 mL de la muestra + 1 mL de fehling A + 1mL de Fehling B +calentar	Precipitado rojo ladrillo	-
Identificación De compuestos fenólicos y taninos	Cloruro ferrico	1 mL de extracto + 3- gotas de cloruro ferrico	Color verde oscuro	++

+++ (reacción muy evidente), ++ (reacción evidente), + (reacción poco evidente), -(no hubo reacción)

## Determinación antibacteriana

Para determinar si la actividad antibacteriana, en el extracto etanólico, tienen validez. Se usó como referencia datos de los halos de inhibición de los controles positivos empleados por el Manual de sensibilidad de INS(2002) (Tabla 5), cuyos valores se usan como referencia para el método de difusión en agar con discos .

Tabla 3. Prueba de Sensibilidad Antimicrobiano por el Método de Difusión en agar con discos.

Antibacteriano	Contenido del disco	Diámetros Críticos para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> (Diámetro en mm)		
		Resistente	Intermedio	Sensible
Gentamicina	10 ug	12	13-14	15

Tabla 4. Susceptibilidad del microorganismo frente al antibiótico de referencia.

Microorganismo	Antibiótico	Concentración del disco	Diámetro del halo (mm)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Gentamicina	10 ug	18,13
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Gentamicina	10 ug	31,52

Tabla 5. Actividad antibacteriana de hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayán" frente a *Staphylococcus aureus*.

Halo de inhibición (mm)						
Microorganismo	Controles		Muestra			
	Agua destilada estéril (Control negativo)	Gentamicina 0.25mg/mL (Control positivo)	50%	70%	96%	100%
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	21	27	29	29	42
	6	23	26	28	30	43
	6	23	26	28	31	43
<b>Media:</b>	<b>6</b>	<b>22.3</b>	<b>26.3</b>	<b>28.3</b>	<b>30</b>	<b>42.6</b>

\*La dimensión de los pocillos utilizados es de unos 6mm; por tanto, al reportar esta magnitud se señala que no se han formado halos de inhibición.

\*La magnitud del diámetro de inhibición corresponde al tamaño de estos pocillos.

Tabla 6. Estadística descriptiva de los halos de inhibición encontrados de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayán" frente a *Staphylococcus aureus*.

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Gentamicina 0.25mg/mL	3	22,33	1,15	0,67	19,46	25,20	21,00	23,00
Molina (50%)	3	26,33	0,58	0,33	24,90	27,77	26,00	27,00
Molina (70%)	3	28,33	0,58	0,33	26,90	29,77	28,00	29,00
Molina (96%)	3	30,00	1,00	0,58	27,52	32,48	29,00	31,00
Molina (100%)	3	42,67	0,58	0,33	41,23	44,10	42,00	43,00
Total	15	29,93	7,14	1,84	25,98	33,89	21,00	43,00

En esta tabla observamos los resultados; el total de medias resultantes se ubican dentro de los límites previstos con 95% de intervalo de confianza y un 5% de error relativo, debido a esto ningún dato se excluye, de modo que se hará uso de la estadística inferencial, a fin de establecer si entre las medias de cada uno de los extractos estudiados existe diferencias significativas.

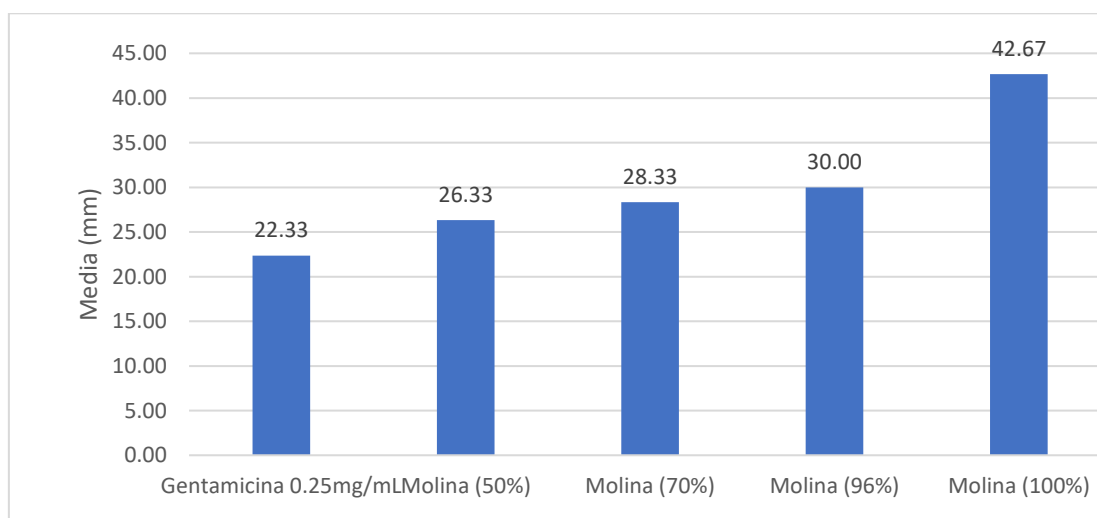


Figura 3. Media del diámetro de los halos de inhibición de hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” frente a *Staphylococcus aureus* expresados en mm.

### Pruebas paramétricas

Tabla 7. Prueba de LEVENE de los halos de inhibición encontrados de hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” frente a *Staphylococcus aureus*.

Halos de inhibición (mm)			
Estadístico de Levene	gl1	gl2	P
1,000	4	10	,452

Donde:

Ho = “Las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneos”

H1 = “Las varianzas de los tratamientos aplicados no son homogéneos”

“Si  $p < 0,05$  rechazar Ho”

Para establecer si dichas varianzas son iguales o poseen entre sí resultados diferentes se utiliza la “prueba de homogeneidad de varianzas”, de cuyo resultado depende la determinación del tipo de prueba estadística inferencial a utilizarse. Se observa que  $p = 0,452 > 0.05$ , de lo cual se infiere que “las varianzas de los tratamientos aplicados no son homogéneas”. Rechazando de esta manera la hipótesis alternativa. Este producto tiene importancia debido a que permite seleccionar la “prueba estadística inferencial” que corresponda, que para el caso de estudio es la “Prueba No Paramétrica de Kruskal Wallis”.

Tabla 8. Prueba de Kolmogorov-Smirnov (Normalidad) de los halos de inhibición encontrados de hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” frente a *Staphylococcus aureus*.

		Halos de inhibición (mm)
N		15
Parámetros normales <sup>a,b</sup>	Media	29,9333
	Desviación estándar	7,13609
Máximas diferencias extremas	Absoluta	,241
	Positivo	,241
	Negativo	-,155
Estadístico de prueba		,241
Sig. asintótica (bilateral)		,020 <sup>c</sup>

a. La distribución de prueba es normal.

b. Se calcula a partir de datos.

c. Corrección de significación de Lilliefors.

Donde:

Ho = “Los datos no presentan distribución normal”

H1 = “Los datos presentan distribución normal”

“Si  $p < 0,05$  rechazar Ho”

La “prueba de normalidad” de Korgomorov-Smirnov promete la determinación de si aquellos datos que fueron obtenidos por cada tratamiento, se establecen como una distribución normal. A partir de estos se establece la clase de prueba estadística de corte inferencial para ser aplicado. Se observa que  $p=0.02 < 0.05$ . Así, este resultado cobra importancia, en razón de que permite seleccionar la prueba estadística de corte inferencial que corresponda, que para el presente estudio es la “Prueba No Paramétrica de Kruskal Wallis”.

## 4.2 Contrastación de hipótesis

Tabla 9. Prueba de Kruskal Wallis de los halos de inhibición encontrados de hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayán" frente a *Staphylococcus aureus*.

Estadísticos de prueba <sup>a,b</sup>	
Halos de inhibición (mm)	
Chi-cuadrado	13,479
Gl	4
Sig. asintótica	,009

a. Prueba de Kruskal Wallis

b. Variable de agrupación: Grupo

Donde:

Ho = "No existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados"

H1 = "Existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados"

"Si  $p < 0,05$  rechazar Ho"

Según la prueba Kruskal Wallis se podrá mirar si es que la comparación de las medias de cada tratamiento aplicado representa diferentes resultados. Por ello, mediante el resultado encontrado ( $P < 0.05$ ) se puede afirmar por medio de la hipótesis alternativa que se evidencian diferencias trascendentales entre los grupos de estudio. Además, la rigurosidad de afirmar que son distintas se corrobora por la aplicación de pruebas POST HOC.



Tabla 10. Comparaciones múltiples de la prueba de Mann Whitney de los halos de inhibición encontrados del extracto encontrados de hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayán" frente a *Staphylococcus aureus*.

Grupo	media	Prueba de Mann Whitney				
		Gentamicin a 0.25mg/mL	Molina (50%)	Molina (70%)	Molina (96%)	Molina (100%)
Gentamicina 0.25mg/mL	22,33		p=0.043 *	p=0.043 *	p=0.04 *	p=0.043 *
Molina (50%)	26,33			p=0.043 *	p=0.04	p=0.043 *
Molina (70%)	28,33				p=0.07 *	p=0.043 *
Molina (96%)	30,00					p=0.04*
Molina (100%)	42,67					

En la siguiente Tabla 10 se evidencia que la media de Gentamicina 0.25mg/mL es menor a  $p < 0,05$  con relación a la media de los siguientes compuestos: Molina (50%)  $p < 0,05$ ; Molina (70%)  $p < 0,05$ ; Molina (96%)  $p < 0,05$ ; Molina (100%)  $p < 0,05$ .

Además, se observa que la media de Molina (50%) es menor a  $p < 0,05$  en relación con la media de los siguientes compuestos: Molina (70%)  $p < 0,05$ ; Molina (96%)  $p < 0,05$ ; Molina (100%)  $p < 0,05$ .

De la misma forma se evidencia que la media de Molina (96%) es menor a  $p < 0,05$  respecto de la otra media de Molina (100%)  $p < 0,05$ .

Tabla 11. *Actividad antibacteriana de hojas de Luma chequen (Molina) A. Gray "Arrayán" frente a Pseudomonas aeruginosa.*

Halo de inhibición (mm)						
Microorganismo	Controles		Muestra			
	Agua destilada estéril (Control negativo)	Gentamicina 0.25mg/mL (Control positivo)	50%	70%	96%	100%
<b><i>Pseudomonas aeruginosa</i></b>	6	20	6	6	6	6
	6	21	6	6	6	6
	6	24	6	6	6	6
<b>Media:</b>	<b>6</b>	<b>22.6</b>	6	6	6	6

\*El tamaño de los pocillos es de 6mm, por lo tanto, cuando se reporta esta medida indica que no hay formación de halos de inhibición.

\*El tamaño de los diámetros de inhibición poseen el mismo grosor de los pocillos.

Tabla 12. *Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de Luma chequen (Molina) A. Gray “Arrayán” frente a Pseudomonas aeruginosa.*

Tubo	Concentración del extracto en porcentaje	Resultado
1	1	-
2	0.5	-
3	0.25	-
4	0.125	-
5	0.0625	-
6	0.03125	-
7	0.01562	-
8	0.00781	-
9	0.00390	-
10	0.00195	-
11	0.00097	-
12	0.00048	-
13	0.00024	-
14	0.00012	-
15	0.00006	-
16	Control negativo (TSB solo)	-
17	Control positivo (TSB con cepa)	+

Conclusión:

La muestra de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” no presenta una concentración mínima inhibitoria de contra *Pseudomonas aeruginosa*.

Leyenda:

(-): Inexistencia del desarrollo bacteriano

(+): Hubo crecimiento bacteriano

Tabla 13. *Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de Luma chequen (Molina) A. Gray “Arrayán” frente a Staphylococcus aureus.*

Tubo	Concentración del extracto en porcentaje	Resultado
1	1	-
2	0.5	-
3	0.25	-
4	0.125	-
5	0.0625	-
6	0.03125	-
7	0.01562	-
8	0.00781	-
9	0.00390	+
10	0.00195	+
11	0.00097	+
12	0.00048	+
13	0.00024	+
14	0.00012	+
15	0.00006	+
16	Control negativo (TSB solo)	-
17	Control positivo (TSB con cepa)	+

**Conclusión:**

La muestra de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” presenta una concentración mínima inhibitoria de 0.00781% contra *Staphylococcus aureus*.

**Leyenda:**

(-): Inexistencia del desarrollo bacteriano

(+): Hubo crecimiento bacteriano

### 4.3 Discusión de resultados

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, se indica que el extracto etanólico a diferentes concentraciones de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” posee actividad antibacteriana solo ante las cepas de *Staphylococcus aureus*, siendo nula frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. Analizando esto, se observó que no existe concordancia completa con las conclusiones a las que arribaron **Llerena L & Yucra J. (2017)**, quienes concluyeron que se ha dejado en evidencia el efecto antimicrobiano de este aceite ante las bacterias *C. albicans*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. epidermidis*, cuyas concentraciones mínimas inhibitorias fueron 5%, 5%, 20%, 8%, 5%, respectivamente; indicando que el aceite de la *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” manifestó un efecto contra las bacterias, in vitro, incluso ante las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. No obstante, señala que sobre ésta misma bacteria, la *Pseudomonas aeruginosa*, el efecto antimicrobiano es muy bajo, a comparación de otros microorganismos. (10)

La investigación propuesta por **Torres J. (2014)** evaluó la actividad antimicrobiana del extracto de *Luma chequen* (Molina) a .Gray “arrayán” frente a patógenos aislados de hemocultivos del hospital nacional Guillermo Almenara Irigoyen, dicha evaluación se realizó por el método modificado de difusión en “pocillos”, dando como resultados que el extracto etanólico posee efectiva actividad antimicrobiana frente a los mencionados patógenos. Como resultado del análisis de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico frente a *Staphylococcus aureus* , *Staphylococcus Epidermis* Y *Klebsiella*

*Pneumoniae* se obtuvo un CMI de 3.125 mg/mL. El screen fitoquímico realizado de *Luma chequen* mostro la presencia de compuestos fenólicos , taninos , flavonoides , triterpenos y/o esteroides , alcaloides y leucoantocianinas. Por lo que se puede constatar que la *Luma chequen* (Molina) A.Gray “arrayán” , presento una actividad antimicrobiana de amplio espectro . El extracto etanólico a diferentes concentraciones de hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán”, en la presente investigación, posee metabolitos secundarios responsables de su actividad antibacteriana . Entre ellos los mas notables son los alcaloides , lactonas , flavonoides y compuestos fenólicos y taninos, así como presenta una concentración mínima inhibitoria de 0.00781% contra las cepas *Staphylococcus aureus* . Resultados que concuerdan con la investigación como primera instancia mencionada.(8)

De acuerdo a los resultados, se ha obtenido que el extracto etanólico de las hojas de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” presenta actividad antibacteriana en cepas de *Staphylococcus aureus*. Evidenciando un porcentaje de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 0.00781%. Analizando los antecedentes, se ha encontrado que **Neira J. (2018)** concluye que los CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) sobre los extractos de romero y orégano se dieron tal como se indica a continuación: Romero dado al *Staphylococcus aureus* con un total de 3.75 mg/mL (0.00375%), mientras que la CMI de orégano para esta misma bacteria tuvo un aproximado a los 1,875 mg/mL (0.001875%). Lo cual permite deducir que las CMI del romero y el orégano son menores a comparación de la mostrada por la *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán”. Demostrando ello que con una menor concentración de los extractos

respectivos, romero y orégano, se pueden tener funciones antibacterianas similares a los de la *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayán".(12)

Asimismo, **Gómez C. (2010)** evaluó esta actividad antimicrobiana y antimicótica de los aceites de *Myrcianthes hallii* (arrayán), *Peperomia peltigera* (pataku yuyo) *Amaranthus asplundii* (ataco), sobre las bacterias de *Streptococcus mutans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans*. Por lo que se usaron métodos fitoquímicos para sustraer los extractos. También se aplicaron exámenes microbiológicos in vitro, por medio de la técnica de agar (difusión) para las bacterias mencionadas. Yendo a resultados, el extracto que tuvo mejor comportamiento fue el del *Myrcianthes Hallii* (arrayán) disuelto en etanol, el cual inhibió al *Streptococcus mutans* "ATCC 25175", asimismo a la *Candida albicans* y la bacteria *Klebsiella pneumoniae*, al punto que se le declara como de gran espectro. Por último, se hallaron metabolitos secundarios, tales como flavonoides, taninos, alcaloides y saponinas en cantidades menores. Por lo que se pudo concluir que usar *Myrcianthes Hallii* (arrayán) para tratar enfermedades de la boca-faringe, tuvo resultados óptimos. (14)

Finalmente, **Dona M y Guasgua J. (2017)** en su trabajo de investigación propuso determinar el nivel de efecto inhibitorio del extracto de arrayán (*Myrcianthes Hallii*) y del extracto de Aguacate (*Persea americana*). Ambos en distintas concentraciones sobre la cepa de *Porphyromona gingivalis*, haciendo uso del test de difusión sobre agar. Se observaron halos de inhibición al 100% tanto para el extracto de Aguacate como el de Arrayán. La medición se dio luego de una semana. Por tanto, dados los resultados, se concluyó que el extracto que manifiesta valores más altos de inhibición fue el arrayán, con un 100%, mientras

que el de aguacate sí demostró inhibición; no obstante, no fueron tan votables como el del arrayán. Se agrega, entonces, que los valores de mayor magnitud de inhibición le pertenecen a la Clorhexidina, alcanzando el 0.12%. Corroborando así los resultados obtenidos de esta investigación, que la concentración al 100% del extracto etanólico de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” alcanzó los 42 mm de halos de inhibición, demostrando así su indudable actividad antibacteriana.(17)



# CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## 5.1 Conclusiones

1. Se ha determinado que el extracto etanólico, producido con base a *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán”, no posee efectividad antibacteriana frente a las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, pero sobre el *Staphylococcus aureus* sí existe tal efecto antibacteriano.

2. Se han identificado metabolitos de orden secundario manifestando propiedades en el extracto etanólico derivado de la *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán”, los cuales son responsables de los efectos antibacterianos. Entre ellos los más notables son los alcaloides, lactonas, flavonoides, fenoles y taninos.

3. Se determinó que el referido extracto etanólico de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” presentó una inexistente actividad antibacteriana ante las cepas de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* en todas sus concentraciones.

4. Se determinó que el extracto etanólico derivado de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán”, disponiendo del frasco a 100% de concentración, muestra una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 0.00781% contra las cepas de *Staphylococcus aureus*, por lo que se corrobora su notable actividad antibacteriana.

## 5.2 Recomendaciones

1. Es de suma necesidad la ejecución de estudios de mayor precisión y especificidad, cuya profundidad consolide la información hallada acerca de las propiedades relativas a la especie *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán”, especialmente en lo referido a su potencial actividad antibacteriana.
2. Se recomienda dar mayor amplitud a los fundamentos científicos, de acuerdo a nuevas investigaciones que faculten establecer el nivel de actividad de la especie *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” ante más tipos de microorganismos, incluidas bacterias.
3. Se sugiere dar propuestas acerca del empleo del *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” como un componente primordial en la fabricación de productos químico-farmacéuticos de corte alternativo, y que permitan tratar infecciones bacterianas a modo de tratamiento casero o incluso bajo receta médica.

## REFERENCIAS

1. Rodríguez A. Evaluación "in vitro" de la actividad antimicrobiana de los alcaloides del agua de cocción del proceso de desamargado del chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet). Tesis de licenciatura. Chimborazo: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
2. Carhuapoma M, Bonilla P, Suarez S, Villa R, Lopez S. Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de Luma chequen (Moliná) A. Gray "arrayán". *Ciencia e Investigación*. 2005; 8(2): p. 73-79.
3. Organización Mundial de la Salud. Carga mundial de infecciones asociadas a la atención sanitaria: OMS; 2018.
4. Organización Panamericana de la Salud. Vigilancia epidemiológica de las infecciones asociadas a la atención de la salud OMS , editor. Washington; 2012.
5. Guzmán O. Ergonomía y Terapia Ocupacional. *TOG*. 2008; 5(1): p. 23.
6. Torres Véliz ER. Efecto hipoglicemiante, hipolipemiante y antiaterogénico del extracto etanólico de las hojas de Luma Chequen (Molina) A. Gray "rayan castilla" en ratas dislipidémicas. Tesis doctoral. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
7. Quispe Surco LJ. Control de calidad microbiológica de las formas líquidas orales con drogas vegetales expendidas en casas naturistas del Cercado de Arequipa. Tesis de licenciatura. Arequipa: Universidad Católica de Santa María.
8. Torres Chati J. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de Luma chequen (molina) a. Gray "arrayán" frente a patógenos aislados de hemocultivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen. Tesis de licenciatura. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
9. Farfán Salas Y, Santos Valer R. Actividad antibacteriana del aceite de luma chequen (arrayan) frente a salmonella spp aisladas de cuyes del distrito de Quiquijana. Tesis de licenciatura. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
10. Llerena L,YJ. Evaluación in vitro del efecto antimicrobiano del aceite esencial de Luma chequen (Molina) A. Gray (arrayán) sobre *Staphylococcus*

aureus, Staphylococcus epidermidis, Escherichia coli, Pseudomona aeruginosa y Candida albicans..

11. Moína Gallegos V. Actividad antibacteriana in vitro de colutorios elaborados con aceites esenciales de Luma chequen (Feuilleé ex Molina) A. Gray "Arrayán" y Minthostachys spicata (Benth). Epling "Yurac muña" frente a la Cepa de Streptococcus mutans. Tesis de licenciatura. Cusco: Universidad Nacional de San Antonio Abad de Cusco.
12. Neira Llerena JE. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de las plantas medicinales utilizadas por los pobladores de tuctumpaya, quequeña y chiguata, frente a bacterias gram positivas: Staphylococcus aureus – streptococcus pneumoniae causante. Tesis de licenciatura. Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.
13. Lizcano A, Vergara J. valuación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales valeriana pilosa, hesperomeles ferruginea, myrcianthes rhopaloides y passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatógeno. Tesis de licenciatura. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
14. Gómez Cruz CD. Evaluación de la actividad antibacteriana y antimicótica de los extractos de Myrciantes hallii (arrayán), Amaranthus asplundii (ataco), Peperomia peltigera (pataku yuyo), especies reportadas en PEGUCHE – IMBABURA, sobre Streptococcus mutans, Klebsiella pn. Tesis de licenciatura. Sangolquí: Escuela Politécnica del Ejército.
15. Boderó Poveda MV. Estudio farmacognóstico y actividad antimicrobiana (in vitro) de los extractos fluidos de Arrayán y Pumín y su aplicación en una pasta dentífrica. Tesis de licenciatura. Chimborazo: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
16. Ocares Cerón MA. Acción antimicrobiana de extractos crudos de especies de plantas nativas sobre Escherichia coli y Salmonella spp. Tesis de licenciatura. Valdivia: Universidad Austral de Chile.
17. Dona Vidale MA, Guasgua Andrango JM. Efecto inhibitorio de los extractos de arrayán (myrcianthes halli) y aguacate (persea americana) sobre la cepa porphyromona gingivalis. estudio in vitro. Tesis de licenciatura. Quito: Universidad Central del Educador.
18. Carhuapoma Yance M. Estudio de la composición química y actividad antioxidante del aceite esencial de Luma chequen (Molina) A. Gray

"arrayan". Tesis de maestria. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

19. Flores Romero J. Determinación de la actividad antibacteriana "in vitro" del aceite esencial de Luma chequen (Molina) A. Gray "arrayán" frente a *Streptococcus mutans*. Tesis de Licenciatura. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
20. Torres Fernández RA. Efecto Molusquicida del extracto hidroalcohólico de las hojas de Luma Chequen (Molina) A. Gray (Arrayán) y extracto acuoso de la cáscara del fruto *Punica granatum* L. (Granada) en *Achatina* (*Lissachatina*) *fulica* Bodwich, 1822 (Caracol africano). Tesis de Licenciatura. Universidad Inca Garcilaso de la Vega.
21. Cervantes E, García R, Salazar P. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*. 2014; 61(1): p. 28-40.
22. Zendeja-Manzo GS, Ávalos-Flores H, Soto-Padilla MY. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*. 2014; 25(3): p. 129-143.
23. Borraz Ordás C. Epidemiología de la resistencia a meticilina en cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas en hospitales españoles. Tesis doctoral. Barcelona: Universidad de Barcelona, Patología I Terapéutica experimental.
24. Cisterna Cáncer R, Madariaga Torres L. Patogenia de la infección por *Staphylococcus aureus*. Artículo científico. Bilbao: Universidad del País Vasco, Microbiología e Inmunología.
25. Ruiz de Gopegui Bordes E. Epidemiología molecular y resistencia a los antimicrobianos en *Staphylococcus* spp. en centros sanitarios de Mallorca durante los últimos 15 años (1999-2013). Tesis doctoral. Mallorca: Universitat de les Illes Balears.
26. Felipe Galindo EM. Determinación de Metaloenzimas en aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* provenientes del hospital general San Juan de Dios. Tesis. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
27. López de Lama A. Factores de riesgo asociados a la presentación de *pseudomonas* multirresistente en pacientes hospitalizados, hospital Edgardo Rebagliati Martins, febrero 2000-marzo 2002. Tesis de licenciatura. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

28. Ruíz Martínez L. *Pseudomonas aeruginosa*: Aportación al conocimiento de su estructura y de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Tesis doctoral. Barcelona: Universitat de Barcelona, Patología y terapéutica experimental.
29. Montero MM. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: aspectos epidemiológicos, clínicos y terapéuticos. Tesis doctoral. Barcelona: Universidad Autónoma de Barcelona, Departamento de Medicina.
30. Fernández Olmos A. Primocolonización por "*Pseudomonas aeruginosa*" en la colonización patogénica broncopulmonar en fibrosis quística: diagnóstico por técnicas de microbiología molecular, estudio de clonalidad y crecimiento en biofilm. Tesis doctoral. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Microbiología II.
31. Alonso Martínez JM. Infecciones nosocomiales: *Pseudomonas aeruginosa* y su importancia, sus características y su resistencia a antimicrobianos. Trabajo fin de grado. Madrid: Universidad Complutense de Madrid.
32. Pollack M. *Pseudomonas aeruginosa*. En Mandell G, Bennett J, Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. Filadelfia: Churchill Livingstone; 1992. p. 2000-2310.
33. Doring G, Horz M, Ortelt J, Grupp H, Wolz C. Molecular epidemiology *Pseudomonas aeruginosa* in an intensive care unit. *Epidemiol Infect.* 1993;(110): p. 427-436.
34. Widmer A, Wenzel R, Trilla A, Bale M, Jones R, Doebbeling B. Outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a surgical intensive care unit: probable transmisión via hands of a health care worker. *Clin Infect Dis.* 1993;(16): p. 372-376.

# ANEXOS

## Anexo 1. MATRIZ DE CONSISTENCIA

### ANEXO 1: Matriz de consistencia



EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Luma chequen</i> "Arrayán" EN CEPAS DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .						
PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES		METODOLOGÍA	INTRUMENTOS
¿El extracto etanólico derivado de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray "Arrayán" en diferentes concentraciones poseerá actividad antibacteriana ante las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ?	Determinar la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> a diferentes concentraciones del extracto etanólico derivado de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray "Arrayán" frente a cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	El extracto etanólico a diferentes concentraciones de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray "Arrayán" posee actividad antibacteriana en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	VARIABLE INDEPENDIENTE	INDICADORES	TIPO	Ficha de observación participante  Fotografías
			Extracto etanólico a diferentes concentraciones de las hojas de <i>Luma chequen</i> "Arrayán"	Concentración del extracto etanólico de la hoja de <i>Luma chequen</i> "Arrayán" en porcentaje.	Transversal	
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPOTESIS ESPECÍFICAS	VARIABLE DEPENDIENTE	INDICADORES	NIVEL	Placas Petri  Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> .  Cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
1. ¿Qué metabolitos secundarios estarán presentes en el extracto etanólico derivado de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray "Arrayán"? 2. ¿Cuál será el porcentaje de concentración mínimo inhibitoria del extracto etanólico derivado de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray "Arrayán" ante las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ? 3. ¿Cuál será el porcentaje de concentración mínimo inhibitoria del extracto etanólico derivado de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray "Arrayán" ante las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ?	1. Identificar los metabolitos secundarios, presentes en el extracto etanólico derivado de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray "Arrayán". 2. Determinar el porcentaje de concentración mínima inhibitoria (MIC) que presenta el extracto etanólico derivado de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray "Arrayán" frente al crecimiento de cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . 3. Determinar el porcentaje de concentración mínima inhibitoria (MIC) que presenta el extracto etanólico derivado de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray "Arrayán" frente al crecimiento de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .	1. El extracto etanólico a diferentes concentraciones de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray "Arrayán" posee metabolitos secundarios responsables de su actividad antibacteriana en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> . 2. El extracto etanólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray "Arrayán" posee actividad antibacteriana en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . 3. El extracto etanólico de las hojas de <i>Luma chequen</i> (Molina) A. Gray "Arrayán" presenta actividad antibacteriana en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .	Actividad antibacteriana en cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .	1. Diámetro en mm del halo de inhibición. 2. Grado de Turbidez	Cuantitativo (Aplicado)	
					DISEÑO	
					Experimental	



**Anexo 2. CERTIFICADO DE LA PLANTA *Luma Chequen* (Molina) A. Gray "Arrayán"**

  **UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
**MUSEO DE HISTORIA NATURAL** 

*"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"*

**CONSTANCIA N° 015-USM-2018**

LA JEFA (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta estéril), recibida de **Hillary Ricra Reynaga y Jorge Ullilen Benavides**; estudiantes de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, ha sido estudiada y clasificada como: ***Luma chequen*** (Molina) A. Gray; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**  
**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**  
**SUBCLASE: ROSIDAE**  
**ORDEN: MYRTALES**  
**FAMILIA: MYRTACEAE**  
**GENERO: *Luma***  
**ESPECIE: *Luma chequen*** (Molina) A. Gray

Nombre vulgar: "Arrayán"  
Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán Santiago

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.

Lima, 21 enero de 2019

  
**Dra. JOAQUINA ALBAN CASTILLO**  
JEFA (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

JAC/ddb



### Anexo 3. CERTIFICADO DE LA BACTERIA *Pseudomonas aeruginosa*

**Thermo**  
SCIENTIFIC

#### Certificate of Quality

**Product Name:** P. aeruginosa ATCC 9027 PK/5  
**Lot Number:** 650614

**Product Number:** R4605210  
**Expiration Date:** 2019-09-30  
(YYYY-MM-DD)

This product has been manufactured, processed and packaged in accordance with Quality Systems Regulation, 21 CFR Part 820. Representative samples were tested per Remel Quality Control specifications and were found to meet performance criteria for this product.

**Purity:**

Standardized aliquots of the rehydrated product are inoculated onto nonselective media and examined for pure growth following the appropriate incubation. Selective and Differential media are also tested where applicable.

**Viability And Quantification:**

Each organism is recovered from the preserved state within the required time frame and at an acceptable level. Passage number is stated as the current preserved state.

**Macroscopic And Microscopic Morphology:**

Colony morphology is consistent with documented referenced description.  
Traditional staining is performed.

**Biochemical Analysis:**

Organism exhibits characteristic biochemical and/or enzymatic reactions. Automated and/or conventional testing was performed and results were within established limits. Antimicrobial testing performed where applicable. Results within expected ranges.

CFU/loop: >10(4)

Passage: 3

Gram Reaction: Gram Negative Rod

Biochemical Profile: Vitek 2C GN

Appearance: Preserved Gel Matrix suspended in inoculating loop

pH: N/A

Signed



Product Performance Technologist

## Anexo 4. CERTIFICADO DE LA BACTERIA *Staphylococcus aureus*

**Thermo**  
SCIENTIFIC

### Certificate of Quality

**Product Name:** *S. aureus* ssp *aureus* ATCC 6538 PK/5  
**Lot Number:** 633937

**Product Number:** R4607016  
**Expiration Date:** 2019-09-30  
(YYYY-MM-DD)

This product has been manufactured, processed and packaged in accordance with Quality Systems Regulation, 21 CFR Part 820. Representative samples were tested per Remel Quality Control specifications and were found to meet performance criteria for this product.

**Purity:**

Standardized aliquots of the rehydrated product are inoculated onto nonselective media and examined for pure growth following the appropriate incubation. Selective and Differential media are also tested where applicable.

**Viability And Quantification:**

Each organism is recovered from the preserved state within the required time frame and at an acceptable level. Passage number is stated as the current preserved state.

**Macroscopic And Microscopic Morphology:**

Colony morphology is consistent with documented referenced description. Traditional staining is performed.

**Biochemical Analysis:**

Organism exhibits characteristic biochemical and/or enzymatic reactions. Automated and/or conventional testing was performed and results were within established limits. Antimicrobial testing performed where applicable. Results within expected ranges.

CFU/loop: >10(4)

Gram Reaction: Gram Positive Cocci

Passage: 3

Biochemical Profile: Vitek 2C GP

Appearance: Preserved Gel Matrix suspended in inoculating loop

pH: N/A

Signed

*Sherry Mason*

Product Performance Technologist



## Anexo 5. CONSTANCIA DE HABER REALIZADO LA PARTE EXPERIMENTAL



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA  
CENPROFARMA

CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO - CCA



**EL DIRECTOR DEL CENTRO DE CONTROL ANALÍTICO DE LA FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA:**

### CONSTANCIA DE PARTICIPACIÓN EN PROCESO DE ANÁLISIS

A los Jóvenes **RICRA REYNAGA HILLARY JAZMÍN Y ULLILEN BENAVIDES JORGE LUIS**, que fueron participantes de la realización de sus análisis de Marcha Fitoquímica, Eficacia Antimicrobiana contra las cepas *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y Concentración Mínima Inhibitoria en la muestra "**Luma Chequen**", para la implementación de su tesis "**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LAS HOJAS DE Luma chequen (Molina) A. Gray (Arrayán) EN CEPAS DE Staphylococcus aureus y Pseudomonas aeruginosa**", en nuestro Laboratorio del Centro de Control Analítico – CENPROFARMA

*Se expide el presente documento a solicitud de los interesados, para los fines que estimen por conveniente.*

Lima, 28 de Mayo del 2019

**Q.F. Gustavo Guerra Brizuela**  
Director del Centro de Control Analítico



**"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"**

Jr. Puno N° 1002 Jardín Botánico Lima 1 - Perú  
☎ (51) 619-7000 anexo 4824 ✉ Ap. Postal 4559 - Lima 1  
E-mail: cca.farmacia@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>

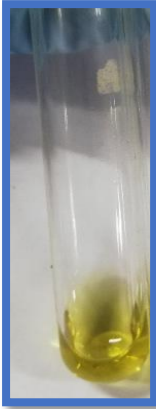


## Anexo 6. TESTIMONIO FOTOGRÁFICO

### PRUEBA PARA FLAVONOIDES

#### Ensayo shinoda

RESULTADO



1 mL de muestra +1-3 limaduras de magnesio.

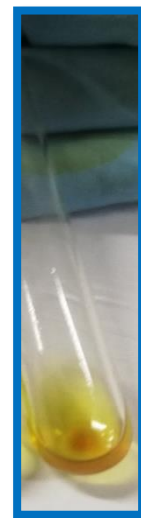
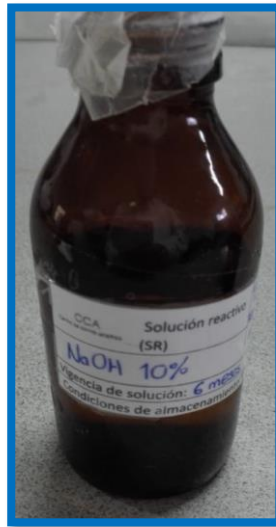
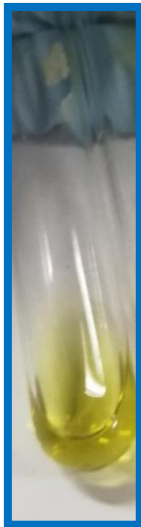
+

x gotas de HCl 37%

Coloración anaranjada indicara presencia de flavonoides.

### PRUEBA DE ANTOCIANINAS

RESULTADO



2 mL de muestra

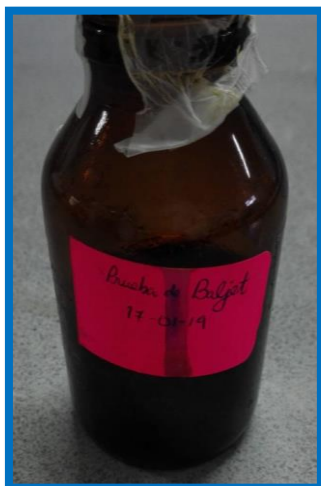
+

6 gotas NaOH 10%

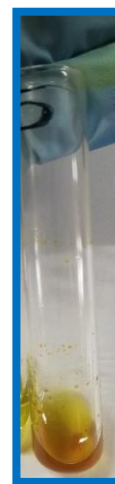
La formación de un color rojizo indicara presencia de antocianinas.

## IDENTIFICACIÓN DE LACTONAS

### Ensayo de bajlet



### RESULTADO



2 mL de muestra

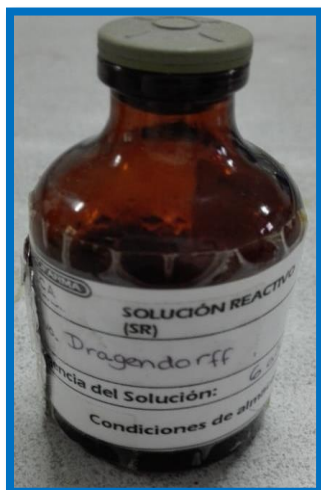
+

3-4 gotas de reactivo bajlet

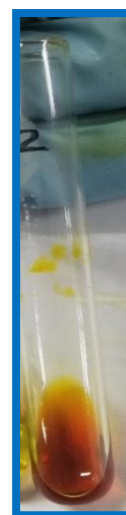
Presencia de coloración rojo oscuro.

## IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES

### Ensayo de dragendorff



### RESULTADO



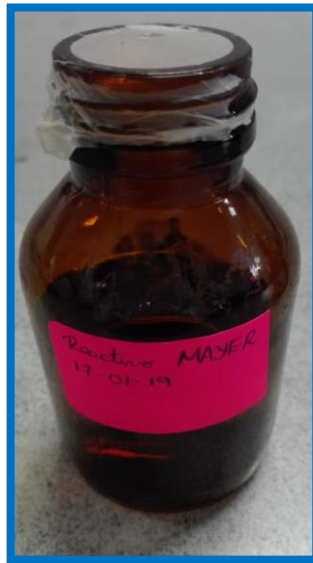
1 mL de HCl 10% + 1 mL de extracto. Evaporar el solvente

+

3 gotas de reactivo de Dragendorff.

Presencia de precipitado anaranjado-marrón se considera positivo

## Ensayo Mayer



**RESULTADO**

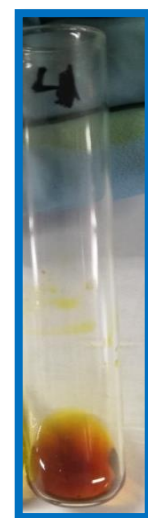
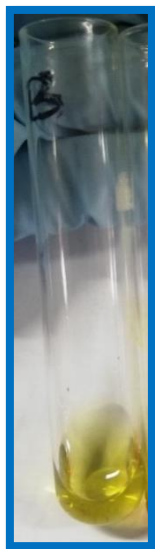
1 mL de HCl 10% +  
1 mL de extracto.  
Evaporar el solvente.

+

3 gotas de reactivo  
Mayer

Presencia de  
precipitado blanco se  
considera positivo

## Ensayo Wagner



**RESULTADO**

1 mL de HCl 10% +  
1 mL de extracto.  
Evaporar el solvente.

+

3 gotas de reactivo  
Wagner

Presencia de  
precipitado color  
marrón

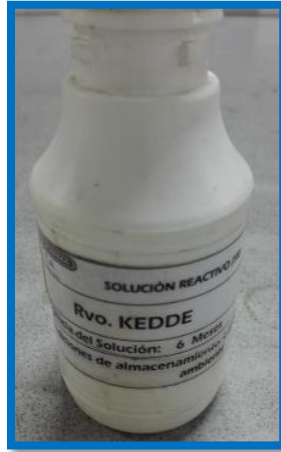


## CARDENOLIDOS

### Prueba de Kedde



2 mL de muestra



1 mL de reactivo  
Kedde



**RESULTADO**

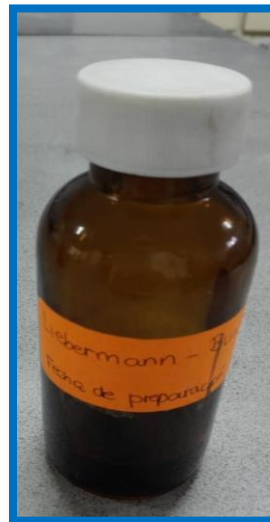
+

Presencia de color  
ligeramente azul-  
violáceo

## ESTEROIDES



1 mL de  
muestra



1 mL de anhido  
acético + 1 mL de  
cloroformo .se enfria a  
0° + 1 gota de ácido  
sulfúrico



**RESULTADO**

+

Presencia de  
color ligeramente  
azul



## SAPONINAS



2 mL de muestra +  
calentar a 40°C  
+reposar 15-30  
min +agitar 1 a 2

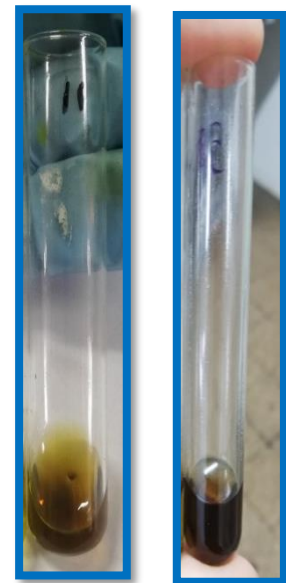
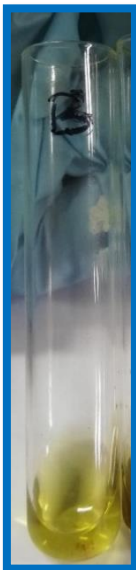


**RESULTADO**

-

No presenta  
formación de  
espuma

## FENOLES



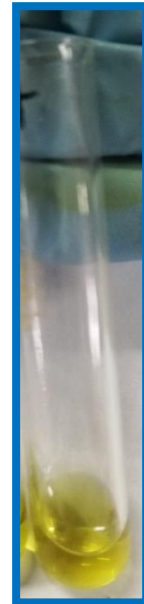
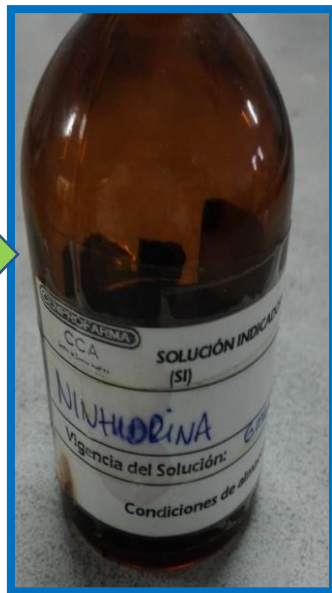
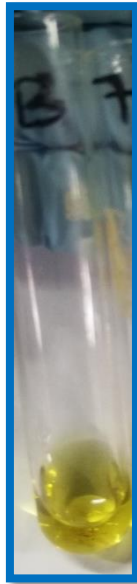
1 mL de muestra

3-4 gotas de  
cloruro férrico

Coloración verde  
oscuro

## PRUEBA DE AMINOÁCIDOS

### Ensayo De Ninhidrina



1 mL de muestra

1 mL de ninhidrina  
+evaporar solvente  
1 min

**RESULTADO**

-

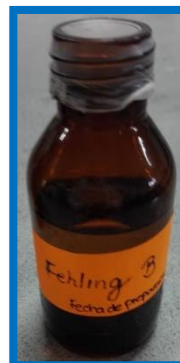
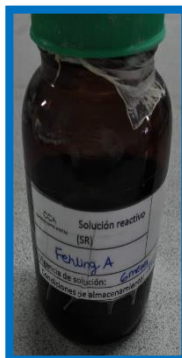
No existe  
presencia violeta  
o azul violeta.

## AZUCARES REDUCTORES

### Prueba De Fehling



1 mL de muestra



+ 1 mL de fehling A  
+ 1mL de Fehling B



**RESULTADO**

No existe  
presencia de  
precipitado rojo  
ladrillo.

## Preparación del extracto etanólico de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán”



1°. Seleccionamos las hojas optimas de la muestra.



2°. Limpieza de las hojas seleccionadas de nuestra muestra.



3°. Se llevaron las hojas a estufa a temperatura de 40°C por 5 días.



Se procedió a triturar la muestra en un mortero



Se pesó 400g de la planta



Se agregó 2000 mL de etanol a un frasco color ámbar, el cual se maceró por 5 días

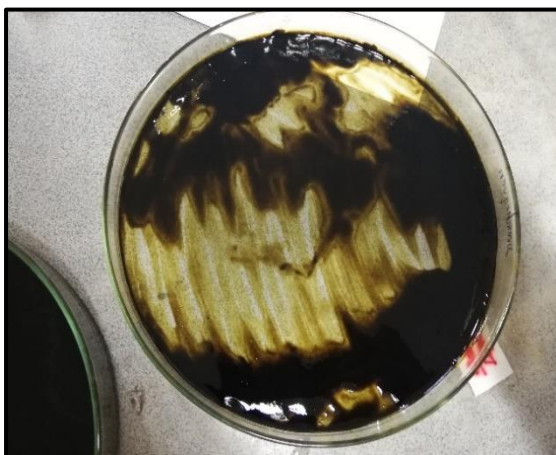




Se procedió a filtrar el extracto por bomba al vacío



Se vertió en un plato de secado y se lleva a estufa a 40°C para el concentrado por 4 días



Se raspo el plato colocándolo en un vial para la realización de la marcha fitoquímica.

**Preparación de las concentraciones del extracto etanólico de *Luma chequen* (Molina) A. Gray "Arrayán"**



**Determinación de la actividad antibacteriana de las hojas de de *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” frente a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* mediante el método de difusión en agar.**



Repique de la cepa de trabajo.



De las diluciones de la cepa retirar con la micropipeta 1 mL.



Agregar 100  $\mu$ L de cada inóculo bacteriano a cada una de las placas Petri con Agar Mueller Hinton.



Realizar la siembra con la espátula de Drigalsky en la superficie del agar.



Esterilizo el sacabocado a emplear.



Se hizo los pocillos, se hizo 3 en cada placa.



En cada pocillo se añadió 40 uL de extracto.





Se llevaron a una incubadora a 37°C durante 24 horas.



Después de 18 a 24 horas de incubación, cada placa fue examinada.

## RESULTADOS

### A) Con *Pseudomonas aeruginosa*



Control negativo: Agua destilada *Pseudomonas aeruginosa*:  
No presentó



Control positivo de *Pseudomonas aeruginosa* (gentamicina  
0.25mg/mL): Promedio: 22.6 mm



Efecto antibacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* al 100%:  
Promedio: 6 mm NO PRESENTO INHIBICION



Efecto antibacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* al 96%:  
Promedio: 6 mm NO PRESENTO INHIBICION



Efecto antibacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* al 70%:  
Promedio: 6 mm NO PRESENTO INHIBICION



Efecto antibacteriano de *Pseudomonas aeruginosa* al 50%:  
Promedio: 6 mm NO PRESENTO INHIBICION

**B) Con *Staphylococcus aureus***



Control negativo: Agua destilada  
*Staphylococcus aureus*: No presentó



Control positivo de *Staphylococcus aureus*  
(gentamicina 0.25mg/mL): Promedio: 22.3 mm

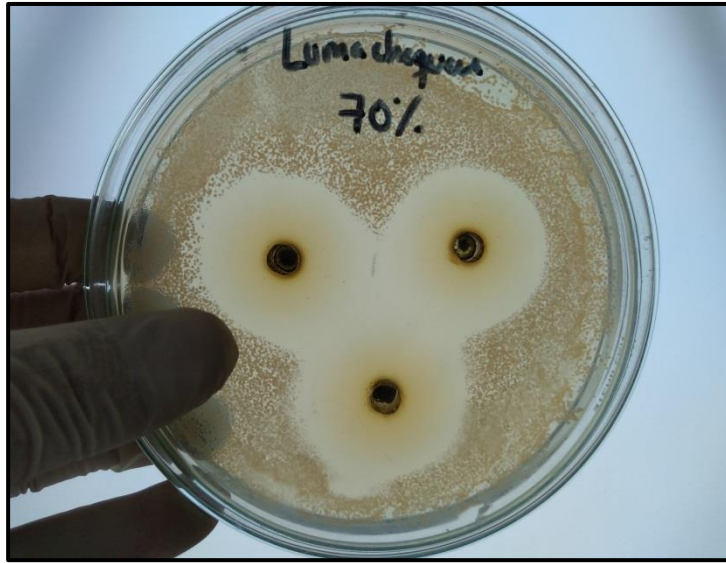




Efecto antibacteriano de *Staphylococcus aureus* al 100%: Promedio: 42.6 mm



Efecto antibacteriano de *Staphylococcus aureus* al 96%: Promedio: 30.6 mm



Efecto antibacteriano de *Staphylococcus aureus* al  
70%: Promedio: 28.3 mm



Efecto antibacteriano de *Staphylococcus aureus* al  
50%: Promedio: 27.6 mm

**DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA DE LAS HOJAS DE *Luma chequen* (Molina) A. Gray “Arrayán” FRENTE A *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* MEDIANTE EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN.**

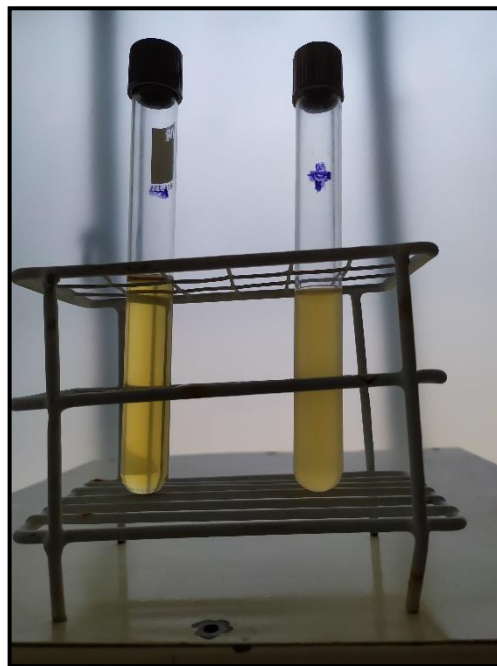
**A) Preparación del caldo tripticasa soya**



En un ambiente estéril se llenó los tubos previamente esterilizados con caldo TSB.



Al primer tubo se le agregó 19.8 mL (la razón se explica en el siguiente paso) y a los tubos del 2 al 15 se le añadió 10 mL.



Se hicieron dos tubos controles, a ambos se le añadió 10 mL de caldo TSB.



## B) Preparación de los inóculos



Se tomó 3-5 colonias, Se hizo la preparación y estandarización del inóculo.



Para la *Pseudomona aeruginosa*  $1 \times 10^8$  UFC/mL.



Para el *Staphylococcus aureus*  $1 \times 10^8$  UFC/mL.

### C) Preparación de los tubos con el extracto etanólico y Caldo Tripticasa Soya (TSB)



Se retiró una cantidad de caldo TSB correspondiente a la cantidad de extracto que se debía agregar.



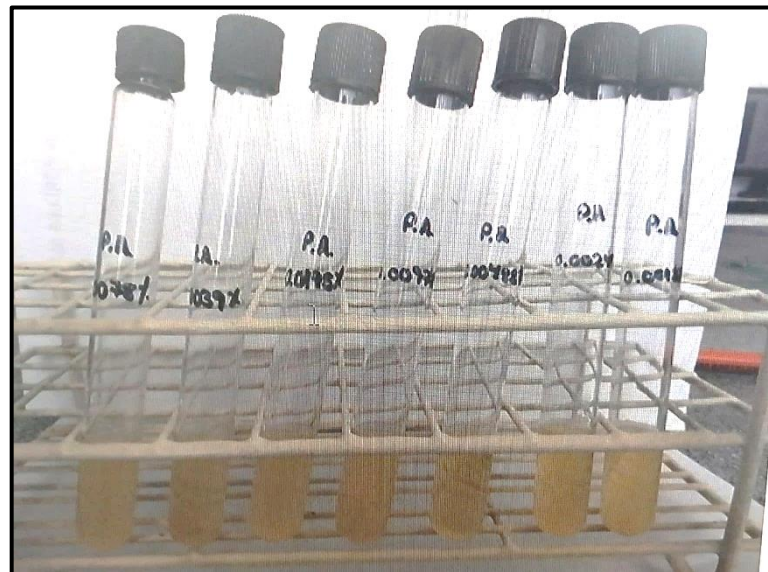
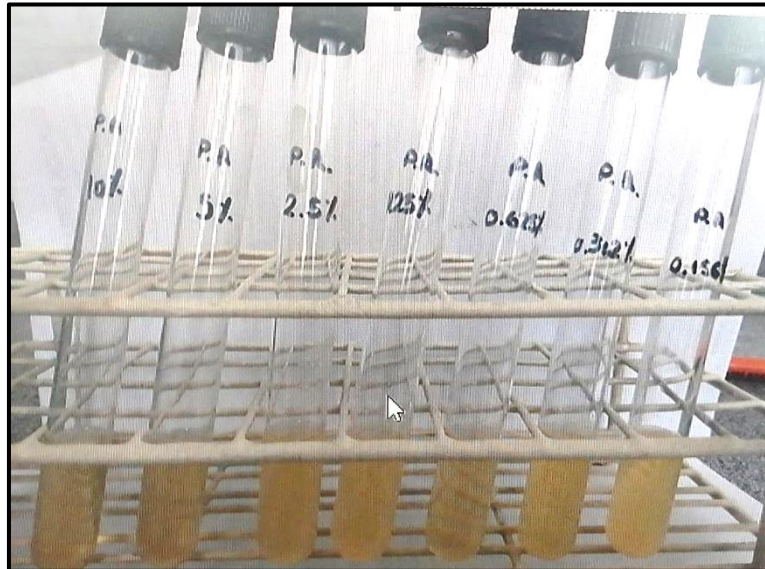
Se agregó el extracto correspondiente a la cantidad de caldo que se retiró.

### D) Inoculación e incubación de los tubos



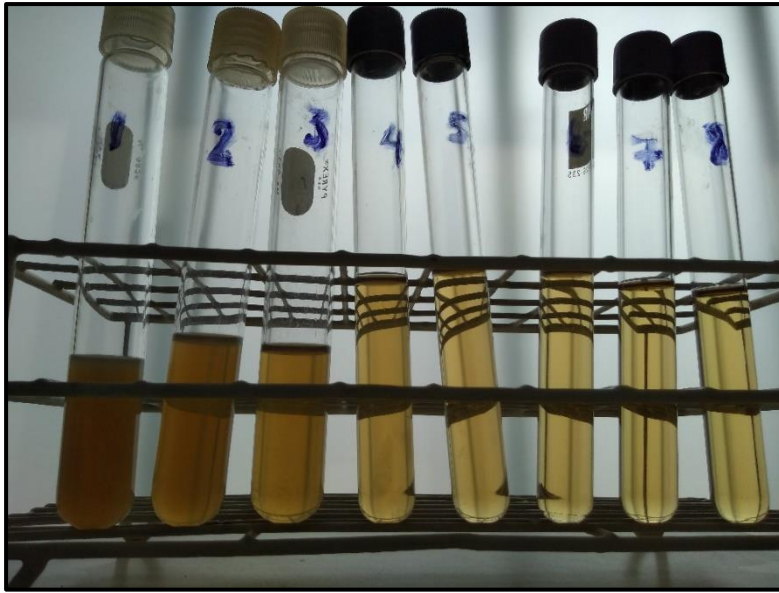
Luego agregamos 100 uL del inóculo en cada batería de tubos y lo llevamos a la incubadora a 37°C durante 24 horas.

## E) Resultados de la CMI del *Pseudomona aeruginosa*



En estas fotos se observa que no hubo crecimiento bacteriano en ninguno de los tubos de diferentes concentraciones.

## F) Resultados de la CMI del *Staphylococcus aureus*



En esta foto se observa el cambio en los tubos, hasta el tubo 8 no hubo crecimiento bacteriano



La turbidez generada por el crecimiento bacteriano comienza a partir del tubo 9.

La CMI para la *Staphylococcus aureus* es de 0.00781%