

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Camellia sinensis L.* (te verde) en cultivos de *Cutibacterium acnes* (Acné Vulgaris), in vitro

Tesis para optar el Título Profesional de Químico

Farmacéutico y Bioquímico

TESISTAS:

Bach. Marcia Fernanda Palacios Hoyos

Bach. Juana Elisa Pamucena Vargas

ASESORA:

Dra. Q.F Heddy Teresa Morales Quispe

2019

ÍNDICE

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
ÍNDICE DE TABLAS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE ANEXOS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	2
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	2
1.1. Descripción de la realidad problemática.....	2
1.2. Formulación del problema.....	3
1.3. Objetivos de la investigación.....	3
1.4. Justificación de la investigación.....	4
CAPÍTULO II	5
MARCO TEÓRICO.....	5
2.1. Antecedentes de la investigación.....	5
2.2. Bases teóricas.....	10
2.2.1. Te verde (<i>Camellia sinensis</i> L).....	11
2.2.1.1. Descripción General del Te verde (<i>Camellia sinensis</i> L).....	11
2.2.1.2. Clasificación taxonómica del Te verde (<i>Camellia sinensis</i> L)	12
2.2.1.3. Distribución geográfica del Te verde (<i>Camellia sinensis</i> L).....	12
2.2.1.4. Composición química del Te verde (<i>Camellia sinensis</i> L).....	14
2.2.1.5. Usos y Propiedades del Te verde (<i>Camellia sinensis</i> L).....	15
2.2.2. Metabolitos secundarios.....	16
2.2.2.1. Flavonoides.....	16
2.2.2.2. Taninos.....	21
2.2.2.3. Saponinas.....	22

2.2.2.4. Aminoácidos.....	22
2.2.3. La piel.....	22
2.2.3.1. Estructura de la piel.....	23
2.2.3.2. Microbiota de la piel humana.....	24
2.2.4. Acné Vulgaris.....	25
2.2.5. <i>Cutibacterium acnes</i>	26
2.2.5.1. Generalidades de <i>Cutibacterium acnes</i>	26
2.2.5.2. Clasificación científica.....	26
2.2.5.3. Papel en la enfermedad.....	26
2.2.5.4. Susceptibilidad antimicrobiana.....	26
2.2.6. Tratamiento Farmacológico.....	27
2.2.6.1. Origen de las Tetraciclinas.....	27
2.2.6.2. Estructura química de la Tetraciclina.....	28
2.2.6.3. Espectro antimicrobiano de la Tetraciclina.....	28
2.2.6.4. Resistencia de la Tetraciclina.....	29
2.2.6.5. Farmacología de la Tetraciclina.....	29
2.2.6.6. Toxicidad y Efectos de la Tetraciclina.....	29
2.2.6.7. Otros Efectos Adversos.....	30
2.3. Formulación de hipótesis.....	31
2.4. Variables.....	32
2.5. Marco Conceptual.....	33
CAPÍTULO III.....	34
MÉTODO.....	34
3.1 Tipo de Estudio.....	34
3.2 Diseño a utilizar.....	34
3.3 Población y muestra vegetal.....	34
3.4 Unidad de analisis.....	35
3.5 Técnicas e Instrumentos de recolección de datos.....	35
3.6 Procedimiento experimental.....	35
3.7. Procesamiento de Datos.....	46
CAPÍTULO IV.....	48
PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	48
4.1 Presentación de resultados.....	48

4.2. Contrastación de hipótesis	65
4.2.2. Contrastación de las hipótesis específicas.....	66
4.3 Discusión de los resultados	69
CAPÍTULO V.....	71
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	71
5.1 Conclusiones	71
5.2. Recomendaciones	72
BIBLIOGRAFÍA.....	73
ANEXOS.....	77

DEDICATORIA

A Dios por darme la fuerza para continuar en este proceso y no permitir que me rinda en el camino.

A mis padres por su apoyo incondicional, trabajo y sacrificio durante todos estos años, gracias a ellos he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.

Marcia Palacios

A Dios, por guiar siempre mi camino.

A mis padres, por ser el apoyo incondicional de mi vida

A mis hijos Aarom y Asiel por ser mi motivo de superación.

Elisa Pamucena

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi gratitud principalmente a Dios y a toda mi familia por estar siempre presentes en todos los momentos de mi vida.

De igual manera mis agradecimientos a la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, a toda la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, a la Dra. Heddy Teresa Morales Quispe por su principal colaboración durante este proceso.

Finalmente agradecer a todas las personas que nos han apoyado y han hecho que este trabajo de investigación se lleve a cabo con éxito en especial a aquellos que compartieron sus conocimientos.

Marcia Palacios.

Gracias a Dios por estar presente no solo en esta etapa de mi vida si no en todo momento ofreciéndome lo mejor y buscando lo mejor para mi persona.

Gracias a mi familia por apoyarme en cada decisión y proyecto, gracias por permitirme cumplir con excelencia el desarrollo de esta tesis, gracias madre por esas noches de cansancio por lo cual no faltaban tus palabras motivadoras de aliento, gracias padre por anhelar la prosperidad en mi persona, gracias hijos por comprender mi ausencia y ya que un abrazo de Uds. Me llenaba de fortaleza, gracias hermanos por el apoyo incondicional.

Gracias a mi universidad por permitirme formarme, gracias a cada maestro por las enseñanzas y consejos de no rendirme jamás.

Elisa Pamucena.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Solubilidad	48
Tabla N° 2. Lectura de la investigación del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de <i>Camellia sinensis</i> L.....	49
Tabla N° 3. Resultados cromatografía del extracto hidroalcohólico de <i>Camellia sinensis</i> L.....	51
Tabla N° 4. Lectura de porcentaje de efecto antibacteriana del extracto, sobre <i>Cutibacterium acnes</i> a las 24, 48 y 72 horas.....	52
Tabla N° 5. Lectura de formación de halos de inhibición según el porcentaje de efectividad de la concentración del extracto hidroalcohólico de <i>Camellia sinensis</i> L.....	54
Tabla N° 6. Porcentaje de inhibición del extracto hidroalcohólico de <i>Camellia sinensis</i> L. según concentración. (Expresados en %)	57
Tabla N° 7. Análisis de la varianza (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por extracto hidroalcohólico de <i>Camellia sinensis</i> L. en cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> a las 24h	58
Tabla N° 8. Análisis de la varianza (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por extracto hidroalcohólico de <i>Camellia sinensis</i> L. en cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> a las 48h	59
Tabla N° 9. Análisis de la varianza (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por extracto hidroalcohólico de <i>Camellia sinensis</i> L. en cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> a las 72h	60
Tabla N° 10. Contrastes post hoc y comparaciones múltiples (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por extracto hidroalcohólico de <i>Camellia sinensis</i> L en cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> a las 24h.....	62
Tabla N° 11. Contrastes post hoc y comparaciones múltiples (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por extracto hidroalcohólico de <i>Camellia sinensis</i> L. en cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> a las 48h.....	63
Tabla N° 12. Contrastes post hoc y comparaciones múltiples (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por extracto hidroalcohólico de <i>Camellia sinensis</i> L en cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> a las 72h.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Te verde (<i>camellia sinensis</i> L).....	16
Figura 2. Mapa Distribucion geografica del Te verde (<i>camellia sinensis</i> L) ...	16
Figura 3. Estructura de Hidroxiflavona	18
Figura 4. Estructura de Galangina.....	19
Figura 5. Estructura de Miricetina.....	20
Figura 6.Estructura de a Quercetina	21
Figura 7.Estructura de Kaempferol.....	21
Figura 8. Acné Leve	26
Figura 9. Acné Moderado.....	26
Figura 10. Acné Severo	26
Figura 11. Estructura química de la Tetraciclina.....	29
Figura 12. Cromatografía ascendente	41
Figura 13. Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar.	44

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1: MATRIZ DE CONSISTENCIA	78
ANEXO N° 2: FICHA DE VALIDACIÓN POR JUICIO DE EXPERTO ...	79
ANEXO N° 3: CERTIFICADO BOTANICO DEL TE VERDE (<i>Camellia sinensis L.</i>)	85
ANEXO N° 4: CERTIFICADO DE LAS CEPAS <i>Cutibacterium acnes</i> (ATCC® 6919).....	86
ANEXO N° 5: FICHA TECNICA DE LA TETRACICLINA 30 mcg.....	88
ANEXO N° 6: TESTIMONIOS FOTOGRÁFICOS	89

RESUMEN

En este trabajo de investigación, se determinó la actividad del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.* y su efecto antibacteriano sobre cultivos de *Cutibacterium acnes*, estudios in vitro. Fue un estudio de tipo observacional, transversal y cuantitativo. La muestra de estudio estuvo conformada por el extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.* fueron analizadas, mediante marcha fitoquímica evidenciándose flavonoides, taninos, compuestos fenólicos, alcaloides, se hizo cromatografía para flavonoides y alcaloides. Se empleó el método por difusión y la Técnica antibiograma de Kirby Bauer con extractos a diferentes concentraciones 25, 50, 75 y 100 por ciento respectivamente, los discos fueron aplicados y comparados con un disco de tetraciclina como fármaco. La planta *Camellia sinensis L.* tiene como principales metabolitos activos a los flavonoides, y el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.* al 75 por ciento reportó 21.91% de efecto inhibitorio tomando como referencia a la tetraciclina que tiene 100 por ciento de efecto inhibitorio y en concentración al 100 por ciento reportó 47.96% de efecto inhibitorio tomando como referencia a la tetraciclina que tuvo el 100 por ciento de efecto inhibitorio.

Palabras Clave: *Camellia sinensis L.* “Te Verde”, efecto antibacteriano, Tetraciclina.

ABSTRACT

In the research work carried out, the activity of the hydroalcoholic extract of *Camellia sinensis L.* and its antibacterial effect on *Cutibacterium acnes* in vitro studies were determined. It was an observational, cross-sectional and quantitative study. The study sample consisted of the hydroalcoholic extract of *Camellia sinensis L.* were analyzed, by means of phytochemical screening and evidencing flavonoids, tannins, phenolic compounds, alkaloids chromatography for flavonoids and alkaloids. Method by diffusion and the antibiogram technique of Kirby Bauer with extracts at different concentrations 25, 50, 75 and 100 percent respectively, the discs were applied and compared with a tetracycline antibiogram disc. The plant *Camellia sinensis L.* has as main metabolic active flavonoids, and the in vitro study resulted in the antibacterial effect of the hydroalcoholic extract of *Camellia sinensis L.* 75 percent reported 21.91% inhibitory effect taking as reference the tetracyclines that have 100 percent inhibitory effect

And in a concentration of 100 percent, 47.96% have an inhibitory effect, taking as reference tetracycline, which will have a 100 percent inhibitory effect.

Keywords: *Camellia sinensis L.* "Green Tea"; Antibacterial effect; Tetracycline.

INTRODUCCIÓN

Son muchos los países que padecen de enfermedades dérmicas, siendo la más común el acné. El Perú no es ajeno a esta enfermedad que es muy frecuente entre adolescentes de 13 a 18 años con una prevalencia de 80 a 85 %, esta enfermedad puede afectar a nivel psicológico y social. Uno de los factores fisiopatológicos que desencadena el desarrollo del acné es la hipercolonización del folículo con *Propionibacterium acnes*.

Al ser una afección de la piel muy común en la actualidad en diversos países, incentiva a investigar una alternativa natural para poder tratar y curar esta enfermedad, y en el evidente desarrollo de la industria farmacéutica en donde se busca innovar con nuevos fármacos para ser empleados como tratamientos con bajos efectos adversos, así mejorar el nivel y la calidad de vida de las personas.

Como ya sabemos la flora ha sido usada de manera empírica desde tiempos remotos por nuestros ancestros para tratar y curar enfermedades. Las plantas medicinales siempre han sido una opción para indagar nuevos tratamientos alternativos, más aun que nuestro país es rico en plantas medicinales debido a su ubicación geográfica, es por ello que se estudia los metabolitos presentes en la planta de *Camellia sinensis L.* que tuvieran una función antimicrobiana con la que se pueda tratar el acné. Y así tener un fitofármaco con menor efecto secundario que los antibióticos convencionales.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la realidad problemática

La resistencia microbiana es causada por la evolución de las bacterias. Aquellas bacterias que tengan una mutación que les permita sobrevivir se reproducirán ¹. Esto indica que las bacterias pasan por un proceso de mutación que al momento de reproducirse pasaran ese carácter genético a su sucesión, que será una procreación totalmente resistente ².

El acné es causado por el patógeno *Cutibacterium acnes*, quien ejerce un papel importante en el desarrollo de esta enfermedad. Es una bacteria Gram positiva, tiene una progresión lenta, y forma parte de la microbiota de la piel por lo que es difícilmente detectable en la dermis de adolescentes sanos ³.

El acné es responsable de aquejar al 9,4 % de los habitantes a escala mundial, esta enfermedad suele manifestarse en la cara, cuello, espalda, pecho y hombros provocando un declive en la autoestima de los jóvenes hasta inclusive llevarlos a una depresión⁴. A causa del incremento de los casos de patógenos resistentes se busca obtener metabolitos que cumplan con una función antibacteriana para la producción de nuevos fármacos ⁴.

Gracias al proyecto titulado Salud y Medicina Tradicional propuesto por la Asamblea Mundial de la Salud y la Organización Mundial de la Salud se ha otorgado un gran valor a los fitomedicamentos, considerando que la población mundial usa plantas como su fuente primordial de agentes medicinales ⁵. Se sabe que en los bosques tropicales existe aproximadamente 250,000 plantas

medicinales, de los cuales 2,000 se localizan en el territorio amazónico de nuestro país.⁵ Durante años los pobladores nativos han tenido contacto con la naturaleza, proporcionándoles el conocimiento de las propiedades, usos y aplicaciones tradicionales que se daban en el pueblo ⁶.

Con la siguiente investigación se procura colaborar a la solución de este problema de salud pública, determinando el efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde) en cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris).

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

¿Cuál será el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde) en cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris), in vitro?

1.2.2. Problemas específicos

1. ¿Existirá metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde)?
2. ¿Cuál será la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde) con mayor efecto antibacteriano en cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris)?
3. ¿Cuál será la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde) comparado con tetraciclina frente a cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris)?

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1. Objetivo general

Determinar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde) en cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris), in vitro.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis L.* (té verde).
2. Determinar la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis L.* (té verde) con mayor efecto antibacteriano in vitro en cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris).
3. Comparar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Camellia sinensis L.* (té verde) con tetraciclina frente a cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris).

1.4. Justificación de la investigación

En la actualidad los medicamentos ya utilizados presentan casos de resistencia bacteriana y esto se debe al aumento de agentes patógenos resistentes, lo cual es una preocupación generalizada para la sociedad ⁷.

La finalidad de este trabajo de investigación es hacer de conocimiento que las plantas son muy importantes para la obtención de nuevos principios activos, lo cual hace que sea importante indagar sobre ellas y los efectos que puedan tener sobre las bacterias. El trabajo de investigación se fundamenta en la evaluación del efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Camellia sinensis L.* (té verde) en cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris), in vitro, donde se quiere demostrar que la especie *Camellia sinensis L.* es tan efectiva como el fármaco tetraciclina y que puede ser considerado como una opción alternativa para tratar la enfermedad del acné. Siendo su efecto antibacteriano una de las propiedades que se le atribuye al té verde, y esto se debe gracias a la presencia abundante de: flavonoides, alcaloides, esteroides ⁷.

Se busca evidenciar la importancia del estudio fitoquímico de plantas medicinales, determinando así los metabolitos que presentan y aprovechar los beneficios que la naturaleza nos brinda, teniendo en cuenta que beneficiará a la población ⁷, Es sustancial que este tipo de investigaciones se desarrollen utilizando modelos *in vitro*, para obtener mayor exactitud en los resultados.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

2.1.1. Nacionales

Rivera B. (2015) Efecto de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos a base del llantén (*Plantago mayor*) y té verde (*Camellia sinensis*), a la concentración del 25%, 50% y 100% en *Streptococcus mutans*, Universidad Católica de Santa María, Arequipa ⁸. Esta investigación tuvo como objetivo determinar y comparar la acción antibacteriana de extractos hidroalcohólicos hechos de *Plantago mayor* y *Camellia sinensis*, haciendo pruebas *in vitro* con diferentes concentraciones de 25 %, 50 % y 100 % en cepas de *Streptococcus mutans*, la Investigación fue de tipo experimental. En el procedimiento experimental se trabajó con cepas certificadas de *Streptococcus mutans*, donde se requirió caldo Brain Heart Infusion (BHI) para la activación de la cepa, y luego ser sembrado en placas petri e incubado a 37°C por 48 horas. Para posteriormente ser diluido en dos tubos de caldo BHI, el cual se dejó incubar 24 horas, donde se obtuvo una dilución de 0.5 en la escala de MacFarland. Se utilizó el método de difusión de Kirby - Bauer donde se buscó comparar la acción antibacteriana de los extractos con la amoxicilina como fármaco control positivo mediante la medición de los halos de inhibición a las 24 y 48 horas, obteniéndose como resultados que los extractos de *Plantago mayor* y de *Camellia sinensis* a la concentración del 100 % tienen mayor efecto antibacteriano que el fármaco control.

Donde se concluyó que ambas plantas tienen capacidad antimicrobiana en cepas de *Streptococcus mutans*.

Pauca Y. (2016), Efecto del extracto acuoso de *Camellia sinensis* (té verde) y la clorhexidina al 0.12% sobre *Streptococcus mutans* y *Candida sp.* de la microflora de conductos infectados en dientes deciduos U.C.S.M.- Arequipa .Universidad Católica de Santa María. Facultad de odontología⁹. Esta investigación tuvo como objetivo demostrar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de *Camellia sinensis* (té verde) y de la clorhexidina al 0.12% usando cepas como el *Streptococcus mutans* y *Candida sp.* donde se empleó concentraciones de 5, 10 y 20 por ciento. Se trabajó con muestras de pacientes de la edad de 3 a 12 años diagnosticados con necrosis pulpar, las cepas de *Streptococcus mutans* fue activada en caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón) y la cepas de *Candida sp* en suero fisiológico, para luego ser sembradas en placas petri con agar Mitis Salivarius para el desarrollo de *Streptococcus mutans* y agar Dextrosa Sabouraud para *Candida sp.*, el método usado fue el de Kirby Bauer mediante el cual se determinó el efecto antibacteriano con la presencia de los halos de inhibición. Se obtuvo como resultado que la concentración al 20 por ciento del extracto acuoso de *Camellia sinensis* presentó un halo de inhibición de 7.43 mm y 7.10 mm en relación al *Streptococcus mutans* y *Candida sp.* indicando así que posee efecto antibacteriano.

Purizaca M., Condori A. (2018) Actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos de las hojas, flores, tallo y raíz de *Schkuhria pinnata* (Lanm.) Kuntze ex Thell (canchalagua) frente a *Propionibacterium acnes*¹⁰. Este trabajo de investigación tuvo como objetivo demostrar que los extractos hidroalcohólicos de cada parte de la planta *Schkuhria pinnata* posee actividad antibacteriana, se identificaron la presencia de fitoconstituyentes como: flavonoides, azúcares reductores, compuestos fenólicos y carbohidratos. Se trabajó con el método de Difusión en Disco, usando el medio de cultivo Agar sangre y la cepa *Propionibacterium acnes* (ATCC® 11827), para lo cual se usó antibióticos estándar: Doxiciclina, Levofloxacino, Azitromicina y Penicilina. Se adicionó discos impregnados con 10 µL de los extractos hidroalcohólicos y fueron comparados con los

discos de antibióticos estándar en las placas, encontrándose que el extracto hidroalcohólico de las hojas presentó mayor diámetro del halo de inhibición, lo que indica que tiene actividad antibacteriana.

García K. (2015) Efecto antibacteriano de una infusión de *Camellia sinensis* (té verde) usada como colutorio, sobre placa bacteriana y saliva Trujillo –Perú ¹¹. El objetivo de esta investigación fue evidenciar el efecto antibacteriano que posee la infusión de *Camellia sinensis* (té verde) que fue usada sobre placa bacteriana y saliva como colutorio. La investigación fue de tipo experimental y aplicada, se ejecutó en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo, obteniendo como resultado que la infusión tiene efecto antibacteriano sobre la placa bacteriana y en la saliva; este efecto se extendió hasta 10 minutos después de la aplicación. Se Concluyó finalmente que la infusión si posee efecto antibacteriano sobre la placa bacteriana y saliva.

Ulloa T. (2009) Susceptibilidad in vitro del *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 frente a tres extractos etanólicos de *Camellia sinensis* té verde¹². El estudio es de tipo experimental y aplicativo, tuvo como objetivo determinar la susceptibilidad del *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 empleando diferentes concentraciones de extracto etanólico de *Camellia sinensis* (te verde), siendo estas netamente concentradas al 5%, 10% y 20% como también concentraciones diluidas obteniendo concentraciones al 75%, 50% y 25% de cada uno de los extractos. Se utilizó el método de difusión en discos de papel, donde se obtuvo como resultado la formación de halos de inhibición, se observó que los valores más altos corresponden a los extractos sin dilución, como era el caso del extracto al 20 %. Se concluyó que la medida del halo de inhibición estaba condicionado a la concentración del extracto, y se pudo afirmar que la susceptibilidad de la cepa *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 es mayor ante la presencia del extracto puro al cien por ciento de *Camellia sinensis* (te verde) sin diluir en una concentración de 20 %.

2.1.2. Internacionales

Jaramillo J., Barragan J. (2018) Efecto de inhibición del extracto de Té verde en concentraciones de 100%, 75%, 50%, 25% frente a *Streptococcus mutans* en 20 muestras in vitro ¹³. El objetivo fue determinar el efecto inhibitorio que tenía el extracto de Té verde en diferentes concentraciones de 100%, 75%, 50% y 25% en cultivos de *Streptococcus mutans* utilizando 20 muestras en intervalos de tiempo (24, 48 y 72 horas). La metodología es de carácter aplicada, longitudinal y comparativa, en la parte experimental se trabajó en 20 placas petri inoculadas con cepas de *Streptococcus mutans* y se realizó el método de Kirby – Bauer. Se obtuvo como resultado que el extracto de Te verde con mayor efecto antibacteriano fue la concentración de 100% frente a la cepa de *Streptococcus mutans* presentando un halo de 10,4 mm en segunda instancia se consideró la concentración del 75% al presentar un halo que oscilaba entre 6,3 - 7 mm. No sucede lo mismo con las concentraciones del 25%, 50%, ya que arrojó como resultado efecto antibacteriano nulo sobre el *Streptococcus mutans*.

Mora A., et al. (2013) Determinación de la capacidad antimicrobiana del Té verde (*Camellia sinensis*) contra los agentes potencialmente patógenos *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger* ¹⁴. El objetivo fue determinar la acción antibacteriana sobre la *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*, empleando cincuenta muestras comerciales diferentes de *Camellia sinensis* seco y en infusión al 10%, en Costa Rica, la cual se comparó con la actividad del té verde oriundo de china. Se analizaron diversos solventes para obtener extractos ricos en polifenoles a partir del té verde. Mediante el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu se determinó los fenoles totales y como material de referencia se utilizó el ácido gálico. De manera paralela se utilizó el método de microplastos descrito por Breukink (2006) para determinar la capacidad antimicrobiana del extracto y de las infusiones de Té verde, no

se demostró la acción antibacteriana de las diversas muestras contra los microorganismos patógenos estudiados, a diferencia de la *Listeria monocytogenes*, donde si mostro un efecto antimicrobiano en el 70% de las marcas estudiadas, en las cantidades de 10,5 y 1,05 mg/ml. Por otro lado, las infusiones comparadas, adjuntando la muestra del Té control no mostró efecto inhibitorio contra esta bacteria.

Gallardo C. (2013), Determinación del efecto inhibitor de tres variedades de Té sobre flora fúngica presente en una sala de maduración de quesos¹⁵. El estudio tuvo como objetivo evaluar tres tipos de Té hechos a base de la especie *Camellia sinensis* en hongos que se encuentran presentes en la maduración de los quesos siendo estos: *Rhodotorula mucilaginosa*, *Mucor spp*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium citrinum* y *Penicillium rugulosum*. El método que se utilizó para observar el grado de sensibilidad de las cepas fúngicas fue por difusión en agar, Se hizo el sembrado de cada bacteria en una placa petri con los discos impregnados con la infusión de Te verde, se incubó durante 5 días en una temperatura de 25°C, se presencié la formación de halos de inhibición. De manera paralela se usó el método Folin-Ciocalteu mediante el cual se determinó la concentración de polifenoles totales presentes en las infusiones de Té. Se concluyó que la infusión Darjeeling presenta un mayor efecto inhibitor frente a las cepas comparada con las otras variedades de Té.

Solis M., Velasco N. (2015), Estudio sobre la susceptibilidad antimicrobiana del *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis* en pacientes con acné vulgaris, atendidos en el servicio de dermatología en el hospital general Enrique Garcés, en el periodo comprendido entre junio y agosto ¹⁶. El trabajo de investigación tuvo como objetivo evaluar la susceptibilidad antibacteriana de las cepas de *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis* en pacientes con Diagnóstico establecido de acné vulgar de gravedad leve a moderada y papulo-pustuloso. Morfología (AV.L-M.PP), atendidos en la Unidad de Dermatología del Hospital

Enrique Garcés, ubicado en la ciudad de Quito, Ecuador entre junio y agosto de 2015. El método utilizado fue Transversal analítico, se determinó la asociación que existe entre la resistencia bacteriana y el tipo de tratamiento recibido, número de esquemas y tiempo de tratamiento. Las muestras fueron recolectadas utilizando el transporte de Stuart y transportadas. Al laboratorio donde fueron plantados en cultivos aerobios y anaerobios. Todas las bacterias que crecieron se les dieron una prueba de sensibilidad, que se realizó para establecer los tipos de resistencia. Se estableció lo siguiente para todos los pacientes: la relación entre el tipo de antibiótico tratamiento recibido y el número de tratamientos, el tipo de monoterapia y el número de Tratamientos que recibieron la susceptibilidad antimicrobiana de *P. acnes* y *Staphylococcus epidermidis* el tipo de antibiótico recibido, la susceptibilidad antimicrobiana del tipo *P. acnes* y la Tipo de antibiótico recibido. Se utilizó SPSS como método estadístico. En el estudio observamos que el 77,5% de los pacientes habían recibido un tipo de medicamento de tetraciclina, con la prevalencia más alta es la tetraciclina (49.6%).

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Te verde (*Camellia sinensis* L.)

2.2.1.1. Descripción General del té verde (*Camellia sinensis* L.)

El té verde conocido con el nombre científico de *Camellia sinensis*, es un árbol perenne, perteneciente a la familia de las Theáceas ¹⁷.

Como planta cultivada, el árbol del Té alcanza máximo los 2 metros, pero en estado salvaje puede llegar alcanzar de 6 a más metros de altura. Se resalta el uso de *Camellia sinensis* gracias al contenido de sus hojas, que dependerá del proceso de obtención. El cual requiere que las hojas verdes se sequen con aire caliente y se vayan fermentando, este proceso de oxidación se detiene cuando los bordes de las hojas se vuelven de un color pardo. Se sabe que es de las 50 hierbas fundamentales usadas en la medicina tradicional China, agrupándose entre 100 y 250 especies ¹⁷.

La especie *Camellia sinensis* es conocida con el nombre común de té verde, pertenece a la familia de las Theáceas, es un árbol perenne caracterizado por tener una raíz principal muy fuerte. Este árbol en estado silvestre puede llegar a medir hasta 10 metros de altura, pero al ser cultivada la podan para que tenga la particularidad de un arbusto lo que conlleva a que no alcance más de los 2 metros de altura. Sus hojas son lanceoladas o elípticas de peciolo corto, de un peculiar tono verde oscuro lustroso, estas miden entre 5 a 6 cm por unos 2,5 cm ¹⁷.

La presencia de sus flores se da en la época primaveral estas son de color blanco amarillentas, llegando a medir 2,5 a 4 cm de diámetro, presenta numerosos estambres centrales de color amarillo, teniendo 5 a 7 pétalos. El árbol de té verde posee un fruto encapsulado con una sola semilla la cual madura en verano – otoño ¹⁷.



Figura 1. té verde (*Camellia sinensis* L.)

Fuente The natural history of the tea-tree. (1799) (J. Miller).

2.2.1.2. Clasificación taxonómica del té verde (*Camellia sinensis* L.)

La planta ha sido evaluada y clasificada como *Camellia sinensis* L y según el esquema de clasificación para plantas de Cronquist (1988) ¹⁸ tiene la siguiente posición taxonómica.

DIVISIÓN: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: ERICALES

FAMILIA: THEACEAE

GÉNERO: *Camellia*

ESPECIE: *Camellia. Sinensis* L.

Conocida con el nombre vulgar: “té verde” y de manera científica con la sinonimia de *Camellia sinensis* L, la cual fue determinada por el Biólogo. Mario Benavente Palacios. Según la constancia N° 249 - USM - 2019 emitida el 08 de Agosto del 2019, siguiendo el sistema de Cronquist (1988) ¹⁸.

2.2.1.3. Distribución Geográfica del té verde (*Camellia sinensis* L.)

El árbol de té verde tiene procedencia del Sur de China y Sudoeste de Asia, aunque actualmente también es cultivada alrededor de regiones tropicales como subtropicales ¹⁸.

Esta especie es oriunda de los bosques montañosos entre las fronteras de China, India y Birmania; aunque hasta la actualidad China es considerada como la cuna del té, pero su cultivo logro expandirse y esto se debe al crecimiento del comercio que hoy se cultive a nivel mundial. Se necesita que los bosques se encuentren a una altura de 2,200 msnm aproximadamente para cultivar con éxito, pero si se cultivan en áreas superiores a los 1,200 metros se obtendrá una mejor calidad de té verde¹⁸.

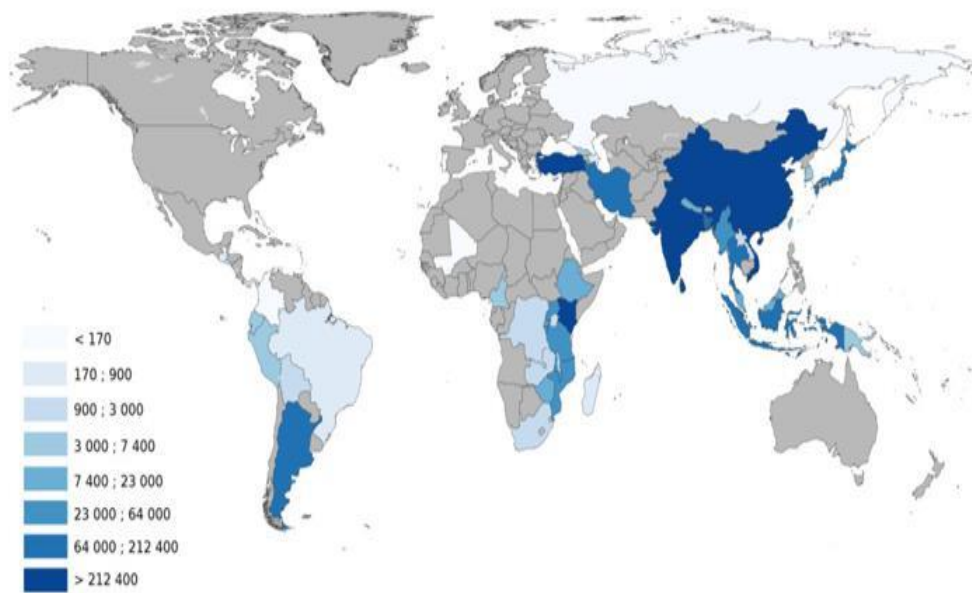


Figura 2. Mapa Distribución Geográfica del té verde

Fuente FAO (Food and Agriculture Organization)

En el Perú la industria del Té inició su crecimiento durante la primera mitad del siglo xx, las zonas de producción en el Perú están localizadas en Tingo María (Huánuco) y La Convención (Cuzco) ¹⁹.

2.2.1.4. Composición química del té verde (*Camellia sinensis L.*)

La composición química del té verde es amplia y diversa, dentro de los componentes se encuentran flavonoides como: kaempferol, quercetina y miricetina, así como también se encuentra un derivado del ácido amino como la teanina, u otros metabolitos como lo es la cafeína, teofilina, teobromina, saponinas, taninos, Sin embargo, son cuatro catequinas polifenólicas a quienes se les otorga efectos medicinales como también efectos adversos, siendo estas las más abundantes en el té verde: galato de epigalocatequina (EGCG), galato de epicatequina (ECG), catequina epigalato (EGC), epicatequina (CE). El beneficio más importante que le adjudican a las catequinas, específicamente al galato de epigalocatequina (EGCG) es el atributo de mantener y disminuir el peso corporal gracias a la capacidad de termogénesis y la oxidación de

las grasas ²⁰. La composición química se divide en dos grupos, siendo estos:

a. Compuestos químicos orgánicos del té verde (*Camellia sinensis* L.)

Estos compuestos se encuentran en un 93 a 96,5 por ciento en el té verde seco, siendo un aproximado de más de 500 compuestos orgánicos presentes en la hoja de esta especie. Dentro los cuales tenemos a los aminoácidos como: teanina, valina, arginina, aspargina, glicina, leucina, lisina e histidina, se encuentran también ácidos como: el ascórbico, nicótico, caféico, clorogénico, gálico, linoleico málico, también se pueden encontrar compuestos alcaloides como la cafeína y la teobromina, entre otros componentes ²⁰.

Las sustancias orgánicas citadas con su nivel de porcentaje presente en las hojas del té verde.

- Proteínas (de 20 a 30 %)
- Aminoácidos (de 1 a 5 %)
- Alcaloides (de 3 a 5 %)
- Fenoles (de 20 a 35 %)
- Glúcidos (de 20 a 25 %)
- Ácidos orgánicos (de 3 a 5 %)
- Lípidos (de 4 a 5 %)
- Pigmentos (de 0,6 a 1 %)
- Sustancias aromáticas (de 0,005 a 0,03 %)
- Vitaminas (de 0,6 a 1 %)
- Saponarias (de 0,07 a 0,1 %)
- Esteroles (de 0,04 a 0,1 %)

b. Compuestos químicos inorgánicos del té verde (*Camellia sinensis* L.)

Ha sido demostrado en diversos análisis científicos que el té verde presenta 27 compuestos minerales como: el fósforo, potasio, magnesio, manganeso, flúor, aluminio, calcio, Zinc, yodo, cromo, etc ²⁰.

2.2.1.5. Usos y propiedades del té verde (*Camellia sinensis* L.)

a) Adelgazante

La especie *Camellia sinensis* L. es considerada como adelgazante debido a la presencia de catequinas en sus hojas, este componente actúa como termógeno, ya que eleva la temperatura corporal, y hace que el metabolismo se acelere, lo que contribuye a la pérdida de peso ²¹.

La cafeína es otro componente presente en el té verde que se encuentra asociado con su efecto adelgazante, ya que funciona como un regulador del peso corporal y la estimulación de oxidación de grasas ²⁰.

b) Antioxidante

El té verde es característico por poseer propiedades antioxidantes que evita la aparición de cáncer, y esta propiedad se debe gracias a la presencia de vitamina C, cafeína, aminoácidos y polifenoles o también conocidos como catequinas que se encuentran presentes en el té verde, una de las catequinas es la epigallocatequina galata, que es la que posee mayor efecto antioxidante ya que interviene como supresor de los radicales libres ²¹.

c) Antiinflamatorias

Uno de los principios activos del té verde son los flavonoides, estos compuestos le otorgan su capacidad antiinflamatoria, los polifenoles al igual que los flavonoides se les confiere el poder de proveer la inflamación ²².

d) Antibacteriana

Las catequinas presentes en la especie *Camellia sinensis* L. además de conferirles una acción adelgazante, antioxidante también tiene una potente función antibacteriana ²².

2.2.2. Metabolitos Secundarios

2.2.2.1. Flavonoides

Los flavonoides son pigmentos que se encuentran de manera universal en los vegetales, se caracterizan por dar la coloración a las flores, frutos e inclusive a las hojas, se conoce un aproximado de 200 flavonoides naturales que están distribuidos en las plantas de forma libre o como glucósidos, por norma general son insolubles en éter de petróleo y sintetizados por un gran número de plantas ²³.

2.2.2.1.1 Flavonoles

Son pigmentos vegetales incluidos dentro de la familia de los flavonoides. Podemos encontrar diferentes tipos de compuestos químicos naturales y según su estructura química, su esqueleto o columna vertebral serán designados como un tipo u otro.

Los Flavonoles poseen una columna vertebral de 3-hidroxi-2-fenilcromen-4-one (3-hydroxy-2-phenyl chromen-4-one), existiendo cientos de ellos según la posición de los grupos fenólicos -OH ²³.

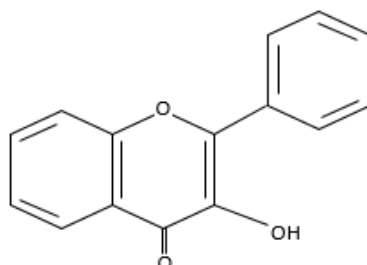


Figura 3. Estructura Base de Flavonoles

Fuente Farmacognosia - C. Kuklinski (2000)

Aunque su nombre (flavonol) es muy parecido al de otros flavonoides no son iguales que los flavanoles. También tienen diferencias en la composición de sus anillos y grupo fenólico con las flavonas, consiguiendo de este modo aportar otras propiedades y beneficios para los seres humanos cuando son ingeridos mediante los alimentos.

En las plantas los flavonoles funcionan como agentes protectores contra los rayos UV, considerándose que podrían tener aplicaciones como antioxidante en los humanos. Aunque esta propiedad todavía es incomprendida sí que hay muchos indicios de que podría ser así debido a que los otros metabolitos vegetales considerados flavonoides actúan, en su mayoría, como poderosos antioxidantes y protectores del sistema cardiovascular y como sustancias preventivas de enfermedades inflamatorias y neurodegenerativas²³.

Al igual que los otros compuestos polifenólicos, el flavonol da color a las flores de las plantas²³.

- Antibacterianas.
- Antivirales.
- Antioxidantes.
- Inhibidoras del crecimiento tumoral (cáncer de mama in vitro).

Tipos de flavonoles:

- ✓ 3-Hidroxiflavona.
- ✓ Azaleatina (2-(3,4-dihydroxyphenyl) -3,7- dihydroxy - 5 -methoxy - 4H - 1- benzopyran - 4 - one).
- ✓ Fisetina (3, 7, 3', 4'-tetrahydroxyflavona).
- ✓ Galangina (Norisalpinin o 3, 5,7-trihydroxyflavone o 3, 5,7- triOH - Flavone).
- ✓ Miricetina (3,5,7-trihydroxy-2-(3,4,5-trihydroxyphenyl) - 4 chromenone o Cannabiscetin o Myriceto).
- ✓ Quercetina (2-(3,4-dihydroxyphenyl) - 3,5,7 - trihydroxy - 4H - chromen-4-one).

- ✓ Isoquercetina (2-(3,4-dihydroxyphenyl) - 5,7 - dihydroxy - 3 - [(2S,3R,4S,5S,6R)-3,4,5-trihydroxy - 6 - (hydroxymethyl)oxan - 2 - yl]oxychromen-4-one).
- ✓ Gosipetina (gossypetin 3,5,7,8,3', 4'-dihydroxyflavone).
- ✓ Kaempferol (Naringenina-chalcona sintasa).
- ✓ Rutina (quercetin-3-rutinósido o rutósido o soforina).

a. 3-Hidroxiflavona

Como ya hemos mencionado la 3-Hidroxiflavona es la base de todos los flavonoles. Es la columna vertebral de todos ellos así que está presente en cada tipo de flavonol.

Posee la capacidad de realizar la transferencia en estado excitado de protones intramoleculares (ESIPT). Esta característica de 3-Hidroxiflavona hace que pueda ser utilizada como guía fluorescente para el estudio de membranas celulares. También como base para proteínas intermembrana²³.

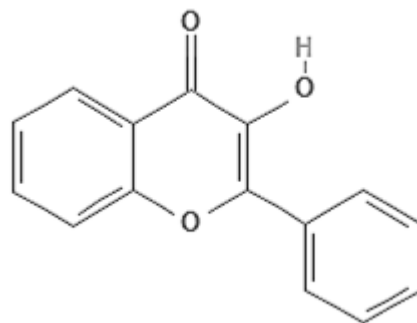


Figura 4. Estructura química 3-Hidroxiflavona

Fuente PubChem - base de datos de Institutos Nacionales de Salud (NIH)

b. Galangina

La Galangina tiene propiedades antibacterianas y antivirales. Es un flavonol que actúa inhibiendo el crecimiento de las células que producen cáncer de mama. Hay algunos estudios que relacionan galangina con hidroquinona tópica para reducir los síntomas del vitíligo,

enfermedad que afecta a la piel y el pelo (produce manchas blancas por falta de melanina).

El uso de galangina para el vitiligo fue indicado en un estudio desarrollado en Mayo del año 2014 por Hugo SX y su equipo en donde, después de administrar rizoma de galanga durante 30 días por vía oral se produjo un aumento de la presencia de melanina en los folículos pilosos²³.

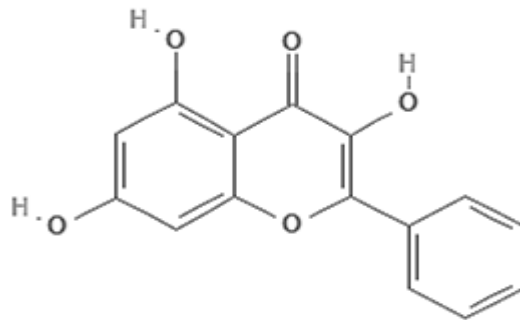


Figura 5. Estructura química de Galangina

Fuente *PubChem - base de datos de Institutos Nacionales de Salud (NIH)*

c. Miricetina

La miricetina es un flavonol cuya fórmula molecular es $C_{15}H_{10}O_8$. Es un tipo de flavonoide o compuesto polifenólico al cuál se le atribuyen propiedades antioxidantes. Actúa bloqueando el daño en los tejidos biológicos que pueden causar los radicales libres.

Los alimentos con miricetina son las bayas, nueces, el vino tino y la mayoría de las frutas.

Las similitudes con los otros tipos de flavonoles son muchas, teniendo una estructura muy parecida a los otros más conocidos como quercetina, fisetina y la flavona luteolina. Sus funciones son muy parecidas, pudiéndose encontrar en su forma natural como myricitrina, un glucósido²³.

Las propiedades de miricetina son antioxidantes y anticolesterolémicas, esta última propiedad vinculada con la reducción del colesterol LDL al igual que otro de los flavonoles, gossipetina.

También hay algunos estudios in vitro que indican que podría poseer beneficios para prevenir el cáncer de próstata y páncreas ²³.

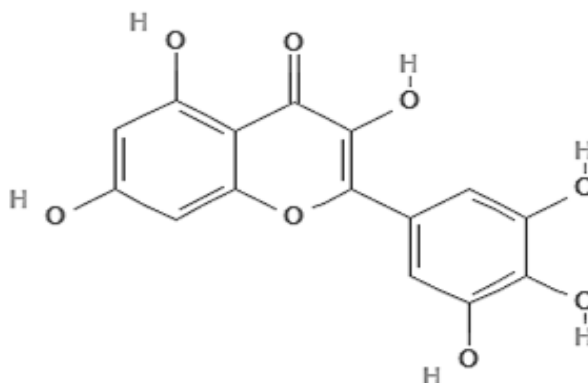


Figura 6. Estructura química de Miricetina

Fuente *PubChem - base de datos de Institutos Nacionales de Salud (NIH)*

d. Quercetina

La Quercetina es un flavonol presente en frutas y verduras en forma de O –glicósido. Este tipo de flavonoide es muy común, siendo uno de los más ingeridos por los humanos mediante la dieta alimenticia.

Su presencia en los alimentos puede encontrarse junto con rutina y naringenina, presente también en cítricos como las naranjas, en la lima y en los tomates. Generalmente cuanto más color rojo tiene el alimento más rico es en quercetina ²³.

Los estudios realizados muestran que los beneficios de quercetina cuando se administra junto con resveratrol, un antioxidante muy poderoso puede reducir la formación de tejido adiposo, quedando pendiente profundizar más en sus aplicaciones terapéuticas. Hoy en día, hay muchos suplementos enriquecidos con el flavonol quercetina, pero no está demostrado que tenga efectos beneficios sobre la salud humana. Se desconoce su valor nutricional y sus posibles propiedades medicinales ²³.

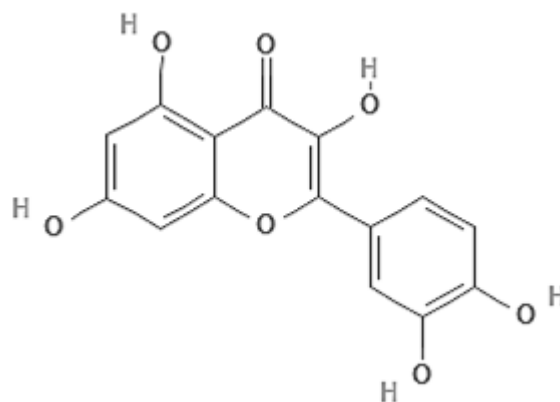


Figura 7. Estructura de a Quercetina

Fuente Baldomero Esquivel Rodríguez, Mizraín Solares Briones (2017)

e. Kaempferol

Se puede obtener de muchos alimentos como avellanas, Te verde, brócoli y coles de Bruselas. El Kaempferol es un flavonol soluble en agua, en etanol caliente y éter etílico.

A partir del kaempferol han sido extraídos glucósidos que están teniendo aplicaciones medicinales como la astragalina y la kaempferitrina. Este flavonol está muy bien considerado por tener propiedades antidepresivas.

También es posible detectar su acción anticancerosa cuando se aplica una mezcla junto con otros flavonoides (quercetina + miricetina y kaempferol) ²³.

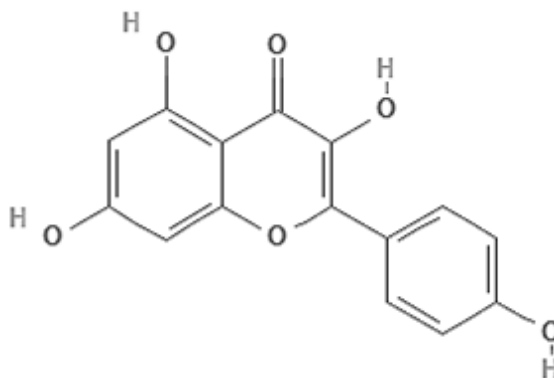


Figura 8. Estructura química de Kaempferol

Fuente Farmacognosia - C. Kuklinski (2000)

2.2.2.2. Taninos

Los taninos están establecidos por un conjunto muy amplio de compuestos polifenólicos ²⁴, tienen la capacidad de precipitar macromoléculas como proteínas, alcaloides, celulosa y gelatina. ²⁰ siendo esta la base de su propiedad para transformar la piel fresca en cuero ²⁴.

2.2.2.3. Saponinas

Las saponinas son heterósidos que surgen de la combinación de azúcar y aglicón, son caracterizadas por producir espuma al momento de ser agitado en una solución acuosa, esto se debe a que las saponinas disminuyen la tensión superficial del agua. Considerándolas por lo tanto tensoactivos naturales ²⁵.

2.2.2.4. Aminoácidos

la Tianina y la L Tianina son aminoácidos que se hallan en el té verde en niveles elevados de concentraciones, tiene efecto relajante que puede contribuir a disminuir los niveles de stress, Esta contribuye de igual forma, a la estimulación de funciones cognitivas mejorando la concentración, la memoria y el proceso de aprendizaje ,considerando también la presencia de muchos aminoácidos más como: Arginina, Cisteína ,Fenilalanina, Glicenia, Histidina, Isoleucina, Lisina metionina, Prolina, Tirosina, Treonina , Valina (planta) ²⁶.

2.2.3. La piel

La piel es la cubierta externa del cuerpo humano y uno de los órganos más importantes, ya sea por su tamaño y por las funciones que realiza²⁵, teniendo un rol vital en la homeostasis debido a que es el encargado de la interrelación e intercambio entre el medio interno y externo,

interviniendo como un órgano de barrera, inmunológico, termorregulador, fotoprotector, entre otras funciones ²⁷.

La piel sana sirve como barrera de protección contra agresiones mecánicas, químicas, tóxicos, radiaciones ultravioleta y microorganismos patógenos ²⁷.

Se desempeña también como órgano sensitivo detectando el frío y el calor (manteniendo así el equilibrio Térmico); la forma de los objetos mediante la transmisión de información externa que recibe el organismo por el tacto, la presión, temperatura y receptores del dolor ²⁷.

2.2.3.1. Estructura de la piel

La piel está constituida principalmente por tres capas:

a. Epidermis: Es la capa exterior de la piel, está conformada por tejido epitelial, es de consistencia dura; las células de este tejido (queratinocitos) irán madurando desde la base hacia la periferia convirtiéndose en células del estrato corneo de la piel. La epidermis consta de varias capas que van desde la profundidad hasta la superficie²⁷, siendo estas las siguientes:

- Capa basal: conformada por una sola hilera de células, en esta capa se producirán los queratinocitos.
- Capa espinosa: formada por varias hileras de células que se van aplanando.
- Capa granulosa: está compuesta por dos o tres hileras de células que fabrican queratina (principal proteína que conforma la estructura de la epidermis).
- Capa córnea: la capa más externa, compuesta por células muertas, aplanadas y apiladas. Estas células irán desprendiendo (proceso llamado descamación).
- Estrato lucido: está formado por una sola capa de células homogéneas y transparentes ²⁷.

b. Dermis: esta capa se encuentra debajo de la epidermis, compuesto por tejido conectivo, está provisto de numerosas fibras elásticas además de vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas, también se hallan en la dermis parte de las glándulas sudoríparas, sebáceas y folículos pilosos²⁷.

c. Hipodermis: se encuentra por debajo de la dermis el tejido celular subcutáneo rico en tejido adiposo o de grasa, siendo separado por tabiques fibrosos ²⁷.

2.2.3.2. Microbiota de la piel humana

Un hombre adulto tiene en promedio aproximadamente 2 m² de superficie de la piel que puede variar enormemente en cuanto a composición química y humedad ²⁸.

La mayoría de los microorganismos de la piel se asocian directamente o indirectamente con las glándulas sudoríparas. Todos los folículos pilosos se asocian con la glándula sebácea que segrega un fluido lubricante. Los folículos pilosos proporcionan un hábitat atractivo para los microorganismos ²⁸.

Las secreciones de las glándulas de la piel son ricas en nutrientes microbianos. Urea, Aminoácidos, Sales, ácido láctico y lípidos se hallan en considerables cantidades.

Los microorganismos de la biota normal (microbiota) de la piel son transeúntes o residentes. La piel como órgano externo está siendo constantemente inoculada con transeúntes, virtualmente todo los que son capaces de multiplicarse y generalmente morir ²⁸.

La piel humana se encuentra poblada por varios microorganismos que viven en la superficie, se utiliza el Término de microbiota cutánea normal para hacer referencia de los microorganismos que se encuentran de manera usual en la piel de las personas sanas ²⁸. La microbiota cutánea está conformada por bacterias, hongos y parásitos, los cuales se alimentan y obtienen energía de la materia orgánica muerta, que se

encuentran en las fisuras de las escamas del estrato corneo y dentro de los folículos pilosos, siendo en algunas ocasiones perjudicial para el individuo ya que pueden volverse patógenos ²⁸.

Las especies que se encuentren en la microbiota de la piel dependerán exclusivamente de los factores ambientales como: Temperatura, la humedad o la exposición a la luz solar y de factores propios del huésped (estado de del sistema inmune, edad, sexo, higiene, uso de jabones, etc.) ²⁸.

2.2.4. Acné vulgaris

El acné vulgar es un trastorno que suele curarse de manera espontánea, en la mayoría de casos se presenta en adolescentes y adultos jóvenes, aunque también existen casos que la enfermedad se presenta en una edad adulta en un 10 a 20 %. Esta enfermedad se desarrolla por el aumento en la producción de grasa por las glándulas sebáceas permitiendo la expresión de la enfermedad en la adolescencia. La enfermedad se desarrolla en el folículo piloso donde se da la formación de pequeños quistes llamados comedones, condición debida a la obstrucción en el orificio folicular quien retiene el sebo. En el interior de los comedones se produce una liberación de ácidos grasos libres del sebo, esta actividad se da por la presencia de la levadura *lipófila Pytirosporium orbiculare* y de la bacteria *Propionibacterium acnés* que forma parte de la microbiota de la piel. Estos microorganismos Producen una inflamación en el interior del quiste rompiendo su pared, lo que provoca la salida de restos oleosos y queratósicos del quiste dándose así la reacción inflamatoria ²⁹.

Una de las principales características clínicas del acné vulgaris es la aparición del comedón, el cual puede ser cerrado o abierto teniendo una tonalidad blanca y negra en el centro respectivamente. En la mayoría de casos los comedones cerrados son los que dan inicio a lesiones inflamatorias ya que resulta difícil de exprimir el contenido oleoso, a diferencia de los comedones abiertos que en raras ocasiones provocan lesiones inflamatorias, debido a la dilatación que presenta el orificio folicular lo que hace más fácil exprimir los restos oleosos oscuros y oxidados. Las lesiones inflamatorias se pueden presentar como pápulas, pústulas o nódulos, suelen desarrollarse frecuentemente en la cara o en zonas como la frente, mejillas, nariz y mentón ³⁰.



Figura 9. Acné leve

Figura 10. Acné moderado

Figura 11. Acné severo

Fuente Atlas de dermatología Clínica – Tomas B. Filz Patrick, Richard Allen Jhonson, Klaus Wolff

2.2.5. *Cutibacterium acnes*

2.2.5.1. Generalidades del *Cutibacterium acnes*

Es una bacteria anaerobia gram positiva, no móvil, con forma de bastón, que fermenta azúcares. *P. acnes* forma parte de la microbiota habitual de la piel. A pesar de ser una bacteria no móvil, permanece en las zonas centrales y profundas del conducto folicular ³¹.

2.2.5.2. Clasificación Científica

Reino: Las bacterias

Filo: Actinobacterias

Orden: Actinomicetos

Familia: Propionibacteriaceae

Género: *Cutibacterium*

Especie: *C. acnes*

Sinonimia: *Propionibacterium acnés*

2.2.5.3. Papel en la enfermedad

Las bacterias de *Cutibacterium acnes* viven predominantemente en lo profundo de los folículos y poros, aunque también se encuentran en el exterior de la piel saludable. La bacteria emplea sebo, residuos celulares y subproductos metabólicos de la piel que se encuentran en los folículos, como fuentes primordiales de energía y nutrientes. La hiperplasia sebácea que es la condición de una elevada producción de sebo por las glándulas sebáceas hiperactivas o la obstrucción del folículo puede desencadenar el aumento de las bacterias de *Cutibacterium acnés*. Esta proliferación abundante de *C. acnés* conllevaran a lesiones inflamatorias desarrollando foliculitis y acné vulgar³¹.

2.2.5.4. Susceptibilidad antimicrobiana

La susceptibilidad de la cepa de *Cutibacterium acnes* a moléculas antibacterianas es amplia, tanto de fuentes farmacéuticas como naturales³². El acné vulgaris es la enfermedad que habitualmente es asociada por la infección causada por la bacteria de *C. acnés*. Al ser una bacteria susceptible a una amplia variedad de antibacterianos se suele contrarrestar usualmente su proliferación con antibióticos como eritromicina, clindamicina, doxiciclina y minociclina, así como también otras familias de antibióticos poco comunes como quinolonas, cefalosporinas, pleuromutilinas, penicilinas y sulfonamidas como tratamiento para el acné sabiendo que también tienen efecto sobre el *C. acnés*³².

2.2.6. Tratamiento Farmacológico

Como tratamiento farmacológico se usa principalmente las tetraciclinas, debido a que es considerado un antibiótico de primera línea en el tratamiento del acné, ya que actúa directamente sobre el *C. acnes*, Las tetraciclinas bloquean la síntesis proteica bacteriana para producir un efecto bacteriostático.

2.2.6.1. Origen de las Tetraciclinas

El origen de las tetraciclinas se dio a fines del periodo de los años cuarenta, debido a la necesidad de buscar fármacos más potentes y nuevos. Estos nuevos fármacos fueron elaboradas a partir de cepas de *Streptomyces* que se encuentran presentes en suelos.¹ la aparición del primer compuesto se dio en el año 1948 con el nombre de clortetraciclina, posteriormente se da a conocer en el año 1950 un nuevo antibiótico llamado oxitetraciclina. Desde ese momento y de manera continua se logra progresos en el terreno de la bioquímica, con las síntesis de nuevas tetraciclinas, en el orden siguiente: tetraciclina (1952); democlociclina (1957); metaciclina (1961); doxiciclina (1966); minociclina (1972) y limeciclina (1976)³³.

Las tetraciclinas es un grupo farmacológico con una estructura química básica. La mayoría de microorganismos presentan una resistencia cruzada amplia a este grupo farmacológico. A pesar de que existen diferencias tanto a nivel estructural como en la síntesis de ellas, es gracias a su mecanismo de acción, espectro antimicrobiano y otras características generales, que se les considera como un solo grupo farmacológico³³.

2.2.6.2. Estructura Química de la Tetraciclina

La estructura química de este grupo farmacológico esta sobre una base de 4 anillos en el núcleo hidronaftaceno (que son derivados análogos de la naftacenocarboxaneda policíclica) ³³, considerando por ello una estructura tetracíclica, proviniendo de ahí su nombre. Los diversos representantes del grupo se diferencian uno de otro por sus radicales que tiene el grupo químico básico ³³.

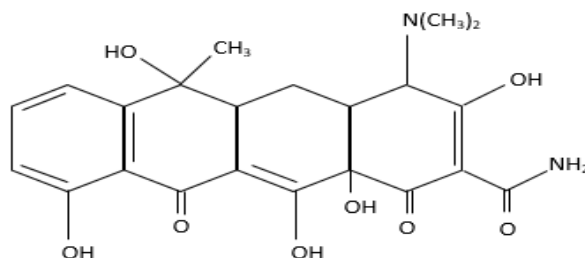


Figura 12. Estructura química de la Tetraciclina

Fuente Farmacognosia - C. Kuklinski (2000)

2.2.6.3 Espectro Antimicrobiano de la Tetraciclina

Considerado como un grupo de antibióticos con un amplio espectro antibacteriano, ya que tiene efecto sobre bacilos y cocos Gram positivos y bacilos Gram negativos como *Brucella*, *Legionella pneumophyla*, *Borrelia recurrentis*, *Haemophilus ducrey*, *Pseudomona pseudomallei*, entre otras así como sobre *Rickettsias*, *Mycoplasmas* y *Chlamydia spp.* Es ciertamente evidente que con el transcurrir de los años, ha ido incrementando la resistencia bacteriana debido al uso indiscriminado de estos fármacos, lo que ha tenido como consecuencia una disminución de su espectro, tratándose principalmente de las tetraciclinas de primera generación. Es por ello que han perdido parte de su utilidad, como en bacterias coliformes, Bacteroides, *Pneumococos*, *Stafilococos*, *Streptococos*, *Shigella spp* ³³.

2.2.6.4. Resistencia de la Tetraciclina

La resistencia a la tetraciclina se ha dado como resultado de una secuencia de factores ya sea por el uso habitual como tratamiento o por

el mal uso en la medicina, debido a eso las bacterias generan una resistencia después de exponerse a la droga y muestran la capacidad de poder transmitir esta resistencia a otras bacterias mediante la transferencia plasmídica. Y la resistencia que se da por mutación y selección durante terapia es uno de los más grandes problemas ante este fármaco ³³.

2.2.6.5. Farmacología de la Tetraciclina

La mayoría de las tetraciclinas se absorben en el tracto gastrointestinal, esencialmente a nivel del estómago e intestino delgado superior, la absorción es menos completa a nivel del tracto intestinal inferior. La absorción aumenta en ayunas y se deteriora si se administra con leche u otros productos lácteos, geles de hidróxido del aluminio y magnesio, tiene una distribución amplia en los tejidos, se metabolizan en el hígado y se concentran en la bilis. Son excretadas principalmente a través de esta última y por la orina ³⁴.

2.2.6.6. Toxicidad y Efectos Secundarios de la Tetraciclina

Debemos señalar que no existe base científica alguna que sustente que la administración concomitante de vitaminas incremente la tolerancia a las tetraciclinas. Alergia: raramente hay reacciones de hipersensibilidad con fiebres o exantemas. Gastrointestinales: son frecuentes y pueden estar dadas por diarreas, náuseas y anorexia. Éstas pueden disminuir al reducir la dosis, pero en ocasiones es necesario suspender el fármaco. Luego de unos días de tratamiento oral la flora intestinal se altera con formas resistentes, esto puede traer aparejado trastornos funcionales, prurito anal e incluso enterocolitis con shock y muerte. Toxicidad sobre tejidos calcificados: en niños, hasta la edad de 8 años se recomienda no usarlas, ya que en un elevado tanto por ciento se ha observado hipoplasia del esmalte de los dientes, así como coloración amarillo grisácea de los mismos, sobre todo de la dentición no permanente, estos efectos tienen relación directa con las dosis del antibiótico empleadas. A nivel óseo, se produce un trastorno del crecimiento esquelético. No se recomienda el uso de las tetraciclinas durante el embarazo, ya que durante los primeros segundo y tercer trimestre es cuando puede ocurrir

el mayor daño a dientes y huesos del feto. Toxicidad hepática: infiltración lipídica difusa del hígado; es más común en las embarazadas, en presencia de daño hepático previo, está en relación directa con dosis mayores de 3 g EV. Toxicidad renal: casi siempre ocurre en relación con una disfunción renal previa o con medicamentos pasados de su fecha de vencimiento. Las más comunes son: hiperazoemia, acidosis tubular renal, agravamiento de una insuficiencia renal establecida (disminuye la función renal, se reduce la excreción de la droga y alcanza niveles tóxicos), hiperfosfatemia, etc. Las tetraciclinas pueden aumentar el nitrógeno ureico sanguíneo cuando se administran diuréticos ³⁴.

2.2.6.7. Otros Efectos Adversos

La candidiasis vaginal es una complicación común del tratamiento de las tetraciclinas. Estos antibióticos, específicamente la democlociclina, pueden causar fotosensibilización, en especial en personas de tez clara. La administración endovenosa de estos productos pueden originar tromboflebitis y su administración por vía intramuscular, inflamaciones vestibulares (vértigos, mareos, náuseas, vómitos). La democlociclina inhibe la hormona antidiurética ³⁴.

2.3. Formulación de hipótesis

2.3.1. Hipótesis general

Existe efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde) en cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris), in vitro.

2.3.2. Hipótesis específicas

1. Existe presencia de metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde).

2. Existe concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis L.* (té verde) con mayor efecto antibacteriano en cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris).

3. Existe actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis L.* (té verde) comparado con tetraciclina frente a cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris).

2.4. Variables

Variable independiente:

Extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis L.* (té verde).

Variable dependiente:

Efecto antibacteriano sobre cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris).

2.4.1. Tabla de Operacionalización de variables

Variable independiente	Indicadores	Dimensiones
Extracto Hidroalcohólico de hojas secas de <i>Camellia sinensis L.</i>	Concentración al 25 , 50, 75 y 100 %	Tamizaje fitoquímico
Variable dependiente	Indicadores	Dimensiones
Efecto antibacteriano en <i>Cutibacterium acnes</i> ATCC 6919	Diámetro del halo Mm	Microbiológico

2.5. Marco Conceptual

- **ATCC:** American Type Culture Collection.
- **Cepa:** Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento⁴¹.
- **Colonia:** Crecimiento visible bacteriano, generalmente en medios a agrupación de un conjunto de microorganismos de un mismo tipo⁴¹.
- ***Cutibacterium acnés*:** Es un bacilo Gram-positivo, de crecimiento relativamente lento, no esporulado y anaerobio estricto, aunque se cree que posee aerotolerancia. Está vinculado al acné ⁴⁰.
- **Disco de sensibilidad:** Discos impregnados con algún antimicrobiano usados para determinar la susceptibilidad antimicrobiana por disco difusión ⁴¹.
- **Efecto Antibacteriano:** Se clasifican en dos grupos: bacteriostático, son aquellas sustancias que bloquean el desarrollo y la multiplicación de las bacterias, pero no las destruyen y, bactericidas: que provocan la muerte bacteriana ⁴⁰.
- **Inóculo:** Alícuota de un cultivo bacteriano transferido a un medio de cultivo ⁴¹.
- **Metabolitos primarios:** Son importantes para la vida del vegetal como proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, hormonas ⁴².
- **Metabolitos secundarios:** No cumplen ningún rol fisiológico en los vegetales: alcaloides, glicósidos, aceites esenciales, resinas, etc. Sirven para comparar perfiles químicos y diferenciar entre las diferentes especies vegetales ⁴².
- **UFC:** Unidad formadora de colonias ⁴¹.

CAPÍTULO III

MÉTODO

3.1 Tipo de Estudio

Experimental: Corresponde al estudio donde se prueba una hipótesis manipulando las condiciones de la investigación dentro de la población estudiada.

Longitudinal: Se realizó en función a un tiempo determinado con los datos obtenidos en un momento puntual, obteniendo una relación de causa y efecto.

Prospectivo: es una metodología en el cual se realizó las diferentes mediciones del diámetro de inhibición formado por los halos en el periodo del tiempo establecido.

3.2 Diseño a utilizar

Diseño experimental Aleatorizado: corresponde al proceso en el cual se induce a un control de variable de acuerdo al protocolo de estudio, de forma que se pueda identificar las posibles relaciones entre causa y efecto de una manera más certera.

3.3 Población y Muestra Vegetal

3.3.1 Población vegetal

Por la parte vegetal estuvo Constituida por las hojas secas *Camellia sinensis* L. (té verde).

3.3.2 Muestra vegetal

Se recolectaron 500 gramos de hojas de *Camellia sinensis* (té verde), que fueron recogidas en la provincia de la Convención, departamento de Cusco, de forma aleatoria; manteniendo el cumplimiento de los criterios de inclusión y exclusión.

3.4 Unidad de análisis

3.4.1. Población bacteriana

La población estuvo constituida por las cepas bacterianas de *Cutibacterium acnes* ATCC® 6919

3.4.2. Muestra bacteriana

Cepas estandarizadas: *Cutibacterium acnes* (ATCC® 6919)

3.5 Técnicas e Instrumentos de recolección de datos

Técnicas: Para la realización del trabajo de investigación se empleó la técnica de observación, la cual nos permitió abarcar la situación real del problema que se abordó.

Instrumento: Ficha de Observación ad - hoc

3.6 Procedimiento experimental

3.6.1 Materiales, reactivos y equipos de laboratorio

Materiales de bioseguridad:

- Guantes Quirúrgicos
- Gafas protectoras
- Mascarillas
- Gorros desechables
- Mandil
- Botas descartables (protector de zapatos)

Materiales de laboratorio

- Vasos de precipitado 50 mL, 200 mL
- Matraces 500 mL
- Probetas 50 mL, 100 mL
- Pipetas volumétricas 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL
- Placas de Petri
- Tubos de ensayo

- Tubos con tapa rosca
- Discos de antibiótico
- Embudos
- Placas de Silica gel
- Frascos goteros
- Escobillones estériles
- Frasco ámbar de 500 mL
- Frascos de vidrio pequeños
- Pliegos de papel de filtro
- Gradillas
- Goteros
- capilares
- Mortero
- Pinzas de madera
- Papel craft
- Bagueta
- Asa de siembra
- Hisopos

Reactivos químicos:

- Etanol de 96°
- Cloroformo QP
- Ciclohexano QP
- Acetona QP
- Ácido sulfúrico
- Ácido clorhídrico al 1%

- Rvo. Gelatina
- $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ al 1%
- Amonio al 10%
- Ácido Acético glacial
- Rvo. Dragendorff
- Rvo. Mayer
- Rvo. Wagner
- Ninhidrina 2,4-DNFH
- Hidróxido de sodio al 10%
- Cloruro de Fierro III al 5%
- Cintas de Magnesio metálico (Shinoda)
- Cloruro de sodio NaCl

Equipos de laboratorio

- Balanza analítica modelo XB220A
- Baño María Lab Companion modelo BW-10G
- Mechero Bunsen
- Cámara cromatográfica
- Cocinilla Welp Scientifica I2C Heating plate
- Estufa Memmert N° 36309 - 2005
- Incubadora Binder N° 72772 - 2014
- Autoclave Gemmy Kossodo
- Lámpara de luz ultravioleta

Medios de cultivo

- Agar Mueller Hinton
- Caldo Trypticase soya

3.6.2. Recolección de la muestra y autenticación botánica

La muestra de *Camellia sinensis* L. (té verde) fue recolectada en la provincia de la Convención, Imperio de los incas ciudad del Cusco. Se recolectó de la planta (tallos, hojas y flores), con la ayuda de una podadora se cortó y seleccionó solo las hojas, se almacenó en un saco que contenía orificios dispersos para evitar el aumento de la sudoración. Posteriormente la planta fue identificada y clasificadas taxonómicamente en el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

En el anexo N°5 se adjunta el certificado de identificación taxonómica.

3.6.3. Preparación del material vegetal

Se trabajó con 500 g de *Camellia sinensis* L. se seleccionó las hojas y tallos de la planta, se depuró cuidadosamente con etanol de 96° con el fin de eliminar cualquier residuo que podía haber contaminado la muestra. Una vez que se terminó de limpiar se procedió a dejar secar la muestra a temperatura ambiente por un lapso de 5 días.

Luego se transfirió la muestra a la estufa a una temperatura menor de 40° C con un tiempo de espera de 72 horas.

Posteriormente se trituro la muestra, obteniendo 250 g de hojas secas. *Camellia sinensis* L.

3.6.4. Obtención del extracto hidroalcohólico

Para la elaboración del extracto hidroalcohólico, se pesó 250 g de la muestra vegetal (*Camellia sinensis* L) seca y molida, luego se adicionó etanol de 96° como solvente.

Se Dejó macerar por un lapso de dos semanas, renovando el solvente utilizado cada semana con homogenización mecánica frecuentemente. El extracto se conservó en un frasco de vidrio ámbar debidamente rotulado.

Pasando las dos semanas de maceración, se filtró al vacío, obteniendo un extracto purificado libre de gérmenes.

3.6.5. Análisis del Extracto de la muestra Vegetal

3.6.5.1. Tamizaje Fitoquímico

Se realizó en el laboratorio de la facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega empleándose pruebas o Técnicas selectivas para las reacciones de identificación determinando la presencia o ausencia de los metabolitos activos en dicha planta, procediendo con el uso de reactivos específicos ⁴⁵.

Metabolitos	Reactivo	Procedimiento
Flavonoides	Shinoda	Agregamos en un tubo de ensayo 2 ml de la MP, luego se agregó X gotas de reactivo Mg metálico más X gotas de HCl al 1%.
	Acetato de plomo $Pb(CH_3COO)_2$	Agregamos en un tubo de ensayo 2 ml de la MP, luego se agregó III gotas de reactivo mencionado.
Compuestos Fenólicos	$FeCl_3$ al 5%:	Se empleó 2 ml de la MP agregando a un tubo de ensayo, luego se añadió II gotas del reactivo agitándose lentamente.
Cumarinas	NaOH al 10%	Se vierte en un tubo de ensayo 2ml de la MP, luego se agregó II gotas de reactivo.
Taninos	Reactivo de Gelatina	En un tubo de ensayo se adicionó 2ml de MP, luego se agregó V gotas de reactivo.
Alcaloides	Dragendorff	En un tubo de ensayo se adicionó 2ml de MP, luego se agregó II gotas de reactivo, se calentó hasta sequedad y se agregó HCl al 1%
	Mayer	En un tubo de ensayo se adicionó 2ml de MP, luego se agregó III gotas de reactivo, se calentó hasta sequedad y se agregó HCl al 1% y NaCl.
	Wagner	En un tubo de ensayo se adicionó 2ml de MP, luego se agregó III gotas de reactivo, se calentó hasta sequedad y se agregó HCl 1 %.
Aminoácidos	Nihidrina	Se usó un tubo de ensayo estéril, en él se adicionó 2ml de la muestra problema, finalmente se agregó II gotas de reactivo y se puso a baño maría.

Saponinas	Test afrosimetrico	En un tubo de ensayo estéril se agregó 2ml de MP, adicionado a ello 1ml de agua destilada..
-----------	--------------------	---

3.6.5.2. Prueba de solubilidad

En esta prueba se trabajó con cinco tubos de ensayos agregando a cada tubo 1 mL de las soluciones como:

Agua destilada, alcohol, acetona, cloroformo y Ciclohexano, luego se adicionó 2 mL de MP a cada tubo.

3.6.5.3. Cromatografía en capa fina - Flavonoides

Se utilizó esta Técnica analítica para determinar el grado de pureza de los compuestos del extracto.

Procedimiento:

En esta prueba cromatográfica en capa fina , se usó un tubo capilar diseñado para tomar la muestra y realizar el sembrado en la placa cubierta de Silica gel, en una cuba se adicionó los solventes correspondientes a utilizar según los metabolitos secundarios a evidenciar, acetona, etanol y agua destilada, colocamos la placa y cubrimos para que sature y proceda para que la fase móvil suba por capilaridad a través de la placa hasta un centímetro por debajo del borde superior luego procederemos a retirar, Se procedió a visualizar la lámina en la lámpara de luz ultravioleta.

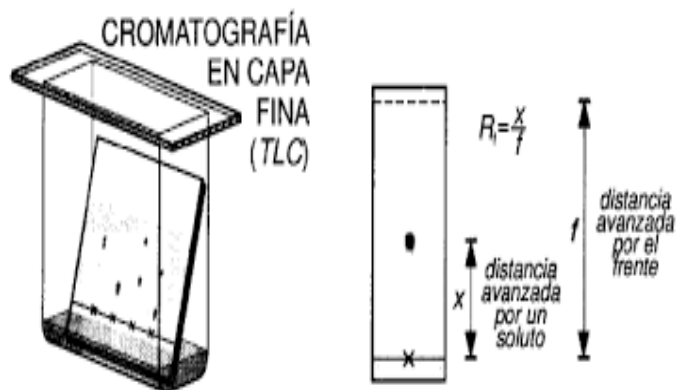


Figura 12. Cromatografía ascendente ⁷

Fuente Cromatografía de capa fina – Kurt Randerath

3.6.6. Ensayo Microbiológico

El método de Kirby Bauer es uno de los métodos que se recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana. Este método se basa en la difusión de la muestra a través de una capa de agar solidificado, en una extensión por el cual el crecimiento de microorganismos sensibles es inhibido en zonas alrededor del área que contiene los discos de papel impregnado con los con los compuestos a probarse como es el antibiótico y la muestra del extracto de *Camellia sinensis* ⁵⁰. Como se puede apreciar anexo N°5.

3.6.6.1. Cepa control

Cutibacterium acnes ATCC® 6919.

3.6.6.2. Controles

Como control positivo ya establecido por el INS ⁵², se emplearon discos de sensibilidad LyD Insumed. SAC, como control negativo se utilizó solución agua destilada estéril y como antibiótico a la tetraciclina (30ug) contra *Cutibacterium acnes* ATCC® 6919.

3.6.6.3. Medios de cultivos

Utilizamos medios de cultivo como el agar sangre y caldo Trypticase soya. Se utilizó el cultivo Agar Mueller-Hinton como base para la elaboración del agar sangre y este se añadió en placas petri para ensayo de sensibilidad antibacteriana ⁵².

3.6.6.3.1. Preparación de agar Sangre

Para la preparación se usó como base el medio de cultivo Müller-Hinton. El cual se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se pesó 13,32 g del agar y se diluyó en 360 mL de agua destilada, considerando pH a 7,2 a 7,4 con solución de NaOH 0.1 N.

Se procedió a la esterilización en autoclave a temperatura de 121° C por unos 15 minutos.

Se llevó a baño frío para minimizar la temperatura entre 48 - 50°C y añadirle 18 mL de sangre.

Se repartió el medio en las placas petri hasta considerar un nivel aproximado de 4 mm. Correspondiendo a 20 mL de medio de agar en placas petri de 15 x 100 mL de diámetro interno.

Por un lapso de tiempo se dejó solidificar el medio de cultivo durante 30 minutos aproximadamente.

3.6.6.3.2. Preparación del estándar (0,5 Mc Farland)

Para realizar la preparación del estándar (0,5 Mc Farland) se agregó 0.5 ml de BaCl₂ a 9,9 mL de una solución de H₂SO₄. Mezclando ambas soluciones en constante movimiento manteniendo la homogenización de la suspensión.

Se empleó 10 tubos de ensayos con tapa rosca en donde se distribuyó 6 mL de la solución, similares a la preparación del inóculo.

Se confirmó la seguridad de las tapas almacenándolo en un lugar oscuro y manteniendo a temperatura ambiente.

3.6.6.4. Dilución de los diferentes extractos

De la muestra madre extracto hidroalcohólico se utilizó 100 ml. Considerando una concentración al 100 %, a partir de éste más agua destilada estéril se procedió para obtener diferentes concentraciones al 75 % ,50 % y 25 % respectivamente dichos extractos fueron conservados en frascos de color ámbar.

Se prepararon Concentraciones de:

25% = empleando 25 ml de extracto hidroalcohólico más 75 ml de agua destilada.

50% =empleando 50 ml de extracto hidroalcohólico más 50 ml de agua destilada.

75% = empleando 75 ml de extracto hidroalcohólico más 25 ml de agua destilada.

100% = manteniendo 100 ml de extracto hidroalcohólico. Puro.

3.6.6.5. Preparación de discos de sensibilidad con el extracto

Estos discos de sensibilidad fueron creados con papel Wattman N°4, empleando un perforador común. A la vez los discos fueron esterilizados en autoclave a una temperatura de 121°C por un tiempo de 15 minutos. Procediendo con la preparación se agregó a cada uno de los discos obtenidos 20 µl de las diferentes concentraciones a utilizar 25 %, 50 %, 75 % y 100 % del extracto hidroalcohólico dejando secar a temperatura ambiente.

3.6.6.6. Preparación del inóculo

Se traspasó la bacteria a un tubo de ensayo estéril que contiene de 4 a 5 mL de caldo Trypticase soya.

El agar caldo se incubó a una temperatura de 35°C a 37°C, hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland (por un aproximado de 6 horas). Para estandarizar la concentración de la cepa bacteriana.

Dicha suspensión obtenida contendrá aproximadamente 1.5×10^9 U.F.C/mL para *Cutibacterium acnes* ATCC® 6919.

3.6.6.7. Inoculación de las placas

Procediendo 15 minutos siguientes al ajuste de la presente turbidez del inóculo, se tomó un hisopo estéril para contener dicha suspensión, frotamos diversas veces presionando sobre la pared interior del tubo y por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.

Para asegurar una distribución uniforme se procedió a realizar el estriado en tres direcciones inoculando la superficie seca de la placa petri. Ver Figura 13.

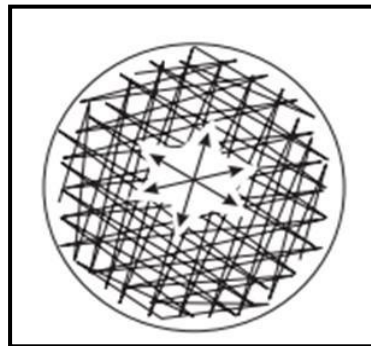


Figura 13. Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar.

Fuente: INS

3.6.6.8. Aplicación de los discos

Con ayuda de una pinza estéril se colocaron los discos de menor a mayor concentración del porcentaje empleado sobre la superficie del agar Müller-Hinton presionando suavemente para asegurar una fijación completa de los discos sobre placa inoculada con *Cutibacterium acnes*⁵² ATCC® 6919.

Tener presente que una vez teniendo los discos puestos en la placa estos no pueden ser removidos por lo mismo que algunos antibióticos tienden a difundirse rápidamente.

3.6.6.9. Incubación

Dichas placas Petri fueron incubadas en posición invertida a una temperatura de 35-40°C por un tiempo de 24, 48 y 72 horas, después de cada tiempo transcurrido se examinaron las placas, donde se pudo apreciar el crecimiento de los halos de inhibición alrededor de cada disco.

3.6.6.10. Medición de los halos de inhibición

Para poder realizar la medición de los halos de inhibición, utilizamos el vernier midiendo el diámetro de cada uno de los discos presentados en la zona incluyendo sin remover las placas.

Fórmula para la Determinación del Porcentaje de Efecto Inhibitorio Relativo (PEIR)

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Diámetro de la muestra} \times 100}{\text{Diámetro del control}}$$

Todos estos ensayos fueron trabajados por triplicado realizando cultivo de control de las cepas en general para comprobar su viabilidad.

Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición.

Actividad antibacteriana	Porcentaje de inhibición
Inactivo	<19%
Poco activo	20 – 30%
Moderadamente activo	31 – 50%
Buena actividad	>61%

Fuente: Carvalho Xavier, 2002

3.7. Procesamiento de Datos

Se hizo el cálculo de la media y desviación estándar de los diámetros del disco de inhibición, como tendencia de medida central, adquiridas del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L. (té verde), que son representados de acuerdo a los gráficos y tablas respectivas. Estos resultados se evaluaron utilizando el método de Análisis de varianza (ANOVA) empleando el programa estadístico SPSS® (Statistical Package for the Social Science) v.23, por Windows 10, con tal fin de que tenga consistencia la información levantada de la ejecución del instrumento de investigación. Este método se eligió ya que permite comparar diversas situaciones de medidas; muy ligado, por tanto, al diseño experimental. Las diferencias de los resultados entre medidas de grupos fueron estudiadas y a la vez analizadas mediante el test de comparaciones múltiples. Valor $p < 0.05$ considerándolo como significativo. Los resultados en dicha muestra fueron inferidos para un nivel de confianza del 95%.

3.7.1. Prueba estadística:

3.7.1.1. Análisis de Varianza:

Es una Técnica de procedimiento estadístico que nos permite medir la variación total de las observaciones hechas, la que se divide para sus componentes, quedando finalmente el residuo como error experimental. Este análisis nos revela la relación que hay entre una variable dependiente (El efecto antibacteriano sobre cultivos de *Cutibacterium acnes* estudios in vitro) y el factor independiente (Extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L.).

El análisis de varianza conocido como ANOVA es un método en el cual se realiza dos o más medias de las observaciones, además se mide la variación de las respuestas numéricas como valores de evaluación de diferentes variables.

Se realizó el cálculo del porcentaje de inhibición del extracto hidroalcohólico *Camellia sinensis* L., en la prueba de actividad

antibacteriana empleando el método de Difusión en agar (Kirby Bauer), estos valores obtenidos son plasmados en tablas, gráficos y clasificados de acuerdo a las especificaciones dadas.

CAPÍTULO IV

PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 Presentación de resultados

4.1.1. Prueba de Solubilidad

Tabla N° 1. Solubilidad

PRUEBA DE SOLUBILIDAD		
N°	SOLVENTE	RESULTADO
1	Agua	++
2	Etanol	+++
3	Cloroformo	+++
4	Acetona	++
5	Ciclohexano	+++

LEYENDA:

Muy soluble	+++
Soluble	++
Poco soluble	+
Insoluble	-

4.1.2 Investigación fitoquímica

Tabla N° 2. Lectura de la investigación del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.*

Principio Activo	Nombre de la Reacción	Resultado	Coloración o Precipitado
Flavonoides	Reacción de Shinoda	+++	Rojo anaranjado
	Reacción con $Pb(CH_3COO)_2$	++	Solución turbia color amarillo opaco
Compuestos Fenólicos	Cloruro Férrico al 5%	+++	Verde negruzco
Taninos	Gelatina Salada	++	pp. blanco
Aminoácidos	Reacción con Ninhidrina	++	Coloración violeta
Saponinas	Test afrosimetrico	+++	Espuma permanencia mayor de 30 minutos
Cumarinas	Reacción NaOH al 10%	++	pp. amarillo
Alcaloides	Reacción Dragendorff	+	Coloración naranja
	Reacción Mayer	+	pp. blanco
	Reacción Wagner	+	Coloración marrón

LEYENDA:

Muy abundante	+++
Abundante	++
Moderado	+
Escaso	+/-
Ausencia	-

Interpretación de los resultados:

Observando lo escrito en la tabla N°2, el extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.* identifico presencia de abundante contenido de metabolitos en su composición.

Se determinó en el extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.* la presencia de alcaloides en un cantidad moderada. Por otro lado aminoácidos y Cumarinas encontrados en cantidad abundante. Además encontramos presencia de flavonoides en una cantidad muy abundante gracias a las pruebas como son la reacción de Shinoda como resultado notable el color rojo y la reacción de medio alcalino coloración anaranjada característica y al añadir $FeCl_3$ la coloración cambia a una coloración verdosa indicando variaciones de flavonoides. También se encontró taninos cantidad muy abundante porque al añadir $FeCl_3$ al 5% la coloración se tornó verde entendiéndose como la presencia de taninos y reactivo gelatina salada (1% de gelatina + 10 % de NaCl) se logró determinar e identificar la muestra del precipitado blanco.

Por último se comprobó la presencia de saponinas dando como resultado muy abundante ya que formó una gran cantidad de espuma cuando se añadió agua destilada y se agitó la mezcla, su respuesta fue inmediata lo cual nos permite confirmar que las saponinas están presentes.

Gracias a la investigación fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.* Se logró concluir la presencia de metabolitos secundarios como: Flavonoides, Taninos, Saponinas, Aminoácidos, Cumarinas y Alcaloides.

Tabla N° 3. Resultados cromatografía del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.*

Principio activo	Fase Móvil	Revelador	Número de manchas	Rf
Alcaloides	Cloroformo: metanol (18:1)	Reactivo de Dragendorff	1	0.92
Flavonoides	Butanol: ácido acético: agua (4:1:5)	UV Fluorescencia	5	0.98 0.56 0.58 0.18 0.16

Rf = factor de retención de cada compuesto calculado como: distancia recorrida por el compuesto / distancia recorrida por la fase móvil.

Interpretación de los resultados:

En la cromatografía de capa fina realizada al extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.* a 360 nm para flavonoides se evidenció la presencia de compuestos con fluorescencia verde que corresponderían a 5 flavonoides diferentes. Y una débil fluorescencia a 250 nm en la cromatografía de capa fina para alcaloides indica la presencia de alcaloides.

4.1.2. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro

Tabla N° 4. Lectura de porcentaje de efecto antibacteriana del extracto, sobre *Cutibacterium acnes* a las 24, 48 y 72 horas.

Concentración	Placa Petri	Tiempo (horas)		
		24h	48h	72h
25 %	1	+++	+++	+++
	2	+++	+++	+++
	3	+++	+++	+++
50 %	1	++	+++	++
	2	+++	++	+++
	3	+++	+++	++
75 %	1	+	+	+/-
	2	+	+/-	+/-
	3	+/-	+	+
100 %	1	+/-	+/-	-
	2	+/-	-	-
	3	-	-	-

LEYENDA:

Crecimiento Microbiano	Especificación Crecimiento
-	Ausencia
+/-	Escaso
+	Moderado
++	Abundante
+++	Muy abundante

Interpretación de los resultados:

Como se observa en la tabla N° 4, se presenta los resultados obtenidos del crecimiento de *Cutibacterium acnes* a las 24, 48 y 72 horas en las diferentes placas petri que se realizaron por triplicado para una mejor apreciación del estudio, Cada placa contiene una determinada concentración del extracto hidroalcohólico.

El extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.* , a una concentración al 25% a las 72h no presento actividad antibacteriana significativa, ya que se observó crecimiento bacteriano muy abundante, de la misma manera a una concentración al 50% a las 72h presentó crecimiento abundante de la bacteria y no se evidenció formación del halo de inhibición.

A una concentración al 75% a las 24h se observó escaso crecimiento bacteriano, a las 48 y 72h no se observó cambio significativo, pero si se evidenció formación tenue del halo de inhibición.

A una concentración al 100% a las 24h se observó escaso crecimiento bacteriano, a las 48 y 72 h se observó evidencia de la formación de los halos de inhibición muy notorios, demostrando el efecto antibacteriano que posee el extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.*

Tabla N° 5. Lectura de formación de halos de inhibición según el porcentaje de efectividad de la concentración del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.*

Concentración del extracto	Lectura										Promedio (mm)
	24 horas			48 horas			72 horas			Σ	
	Lectura 1 (mm)	Lectura 2 (mm)	Lectura 3 (mm)	Lectura 1 (mm)	Lectura 2 (mm)	Lectura 3 (mm)	Lectura 1 (mm)	Lectura 2 (mm)	Lectura 3 (mm)		
25 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75 %	4	4	4	5	5	4	6	6	5	43	4,77
100 %	6	4	6	10	10	12	14	16	16	93.99	10,44
Tetraciclina	16	18	16	22	22	20	28	28	26	196	21,77
Agua Destilada 0 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Fórmula para la determinación del porcentaje de inhibición.

El porcentaje de Efecto Inhibitorio Relativo (PEIR) se calculó aplicando la siguiente fórmula teniendo como referencia la medición del diámetro de la zona de inhibición del control positivo y la medición del halo de los extractos ensayados.

Porcentaje de Efecto Inhibitorio Relativo (PEIR)

$$\text{PEIR} = \frac{X \ \emptyset \text{ Halo de inhibición del extracto}}{X \ \emptyset \text{ Halo de inhibición del control positivo}} \times 100$$

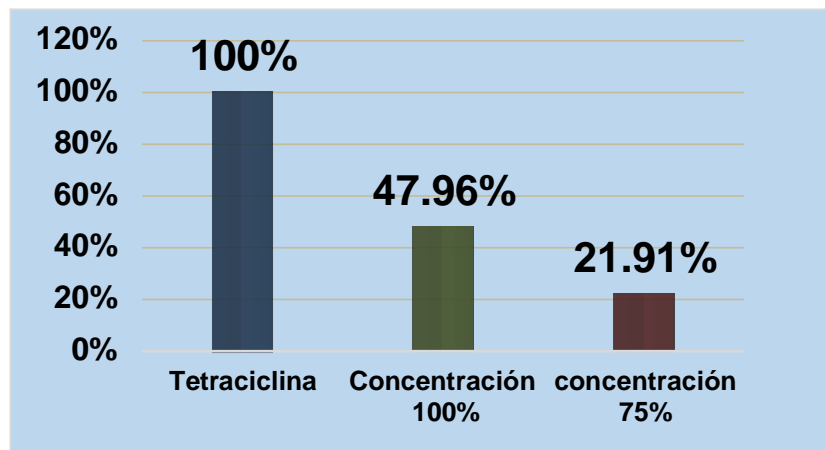
El halo de inhibición del desarrollo de *Cutibacterium acnes* promedio del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.* a 75% es 4,77 mm y de la Tetraciclina como fármaco de referencia es 21,77 mm.

$$\text{PEIR} = \frac{4,77}{21,77} \times 100 = 21,91\%$$

El halo de inhibición del desarrollo de *Cutibacterium acnes* promedio del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.* a 100% es 10,44 mm y de la Tetraciclina como fármaco de referencia es 21,77 mm.

$$\text{PEIR} = \frac{10,44}{21,77} \times 100 \% = 47,96\%$$

Gráfico 1. Porcentaje de efecto inhibitorio relativo de la Tetraciclina vs. El extracto hidroalcohólico al 100% y 75 %



Interpretación de los resultados:

De acuerdo a lo reportado en la tabla N° 6., los resultados obtenidos de la Lectura de formación de los halos de inhibición son:

El extracto a una concentración al 25 y 50% no presentan formación del halo de inhibición, por lo tanto a dicha concentración no posee efecto antibacteriano.

El extracto a una concentración al 75% si presenta formación del halo de inhibición en las muestras por triplicado que se realizó, el mejor resultado se observó a las 72 h de incubado. La suma promedio fue de 43 mm y el rango promedio de 4,77 mm.

Se reporta que el extracto a una concentración al 100% si presenta formación del halo de inhibición en las muestras por triplicado que se realizó, los resultados fueron más significantes en comparación a la concentración al 75%. La suma promedio fue de 93.99 mm y el rango promedio de 10,44 mm.

En las muestras procesadas por triplicado, los resultados de la tetraciclina que se usó como muestra control tuvo una suma promedio de 196 mm y un rango promedio de 21,77 mm teniendo un efecto inhibitorio al 100 %. En comparación del extracto hidroalcohólico en concentraciones de 75% y 100% que presentó un efecto inhibitorio del 21.91 % y 47.96% respectivamente.

Tabla N° 6. Porcentaje de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.* según concentración. (Expresados en %)

Concentración del extracto vs control positivo	Promedio (mm)	Porcentaje de inhibición	Actividad antibacteriana
Extracto de 75 % vs Tetraciclina	4,77	21,91%	Poco activo
Extracto de 100 % vs Tetraciclina	10,44	47,96%	Moderadamente activo
Tetraciclina	21,77	100%	Activo

Interpretación de los resultados:

Se aplicó la fórmula para la determinación del porcentaje de inhibición, en el extracto a una concentración de 25 y 50% se reporta ausencia de formación del halo de inhibición, Mientras en el extracto a una concentración de 75% reporta 21,91 % de efecto inhibitorio tomando como referencia a la Tetraciclina que tendrá el 100% de efecto inhibitorio.

En el extracto a una concentración de 100% reporta 47,96% de efecto inhibitorio tomando como referencia a la Tetraciclina que tendrá el 100% de efecto inhibitorio.

Análisis estadístico de los resultados obtenidos en los ensayos in vitro.

Tabla N° 7. Análisis de la varianza (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L. en cultivos de *Cutibacterium acnes* a las 24h

Unidireccional

Descriptivos						
Lectura_1_24h						
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
25%	3	,00	,000	,000	,00	,00
50%	3	,00	,000	,000	,00	,00
75%	3	4,00	,000	,000	4,00	4,00
100%	3	5,33	1,155	,667	2,46	8,20
Tetraciclina	3	18,67	3,055	1,764	11,08	26,26
Agua destilada	3	,00	,000	,000	,00	,00
Total	21	5,62	6,801	1,484	2,52	8,71

ANOVA					
Lectura_1_24h					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	900,952	6	150,159	87,593	,000
Dentro de grupos	24,000	14	1,714		
Total	924,952	20			

Tabla N° 8. Análisis de la varianza (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.* en cultivos de *Cutibacterium acnes* a las 48h

Unidireccional

Descriptivos						
Lectura_1_48h						
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
25%	3	,00	,000	,000	,00	,00
50%	3	,00	,000	,000	,00	,00
75%	3	4,67	,577	,333	3,23	6,10
100%	3	10,67	1,155	,667	7,80	13,54
Tetraciclina	3	21,33	1,155	,667	18,46	24,20
Agua destilada	3	,00	,000	,000	,00	,00
Total	18	7,14	7,882	1,720	3,55	10,73

ANOVA					
Lectura_1_48h					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1233,905	6	205,651	332,205	,000
Dentro de grupos	8,667	14	,619		
Total	1242,571	20			

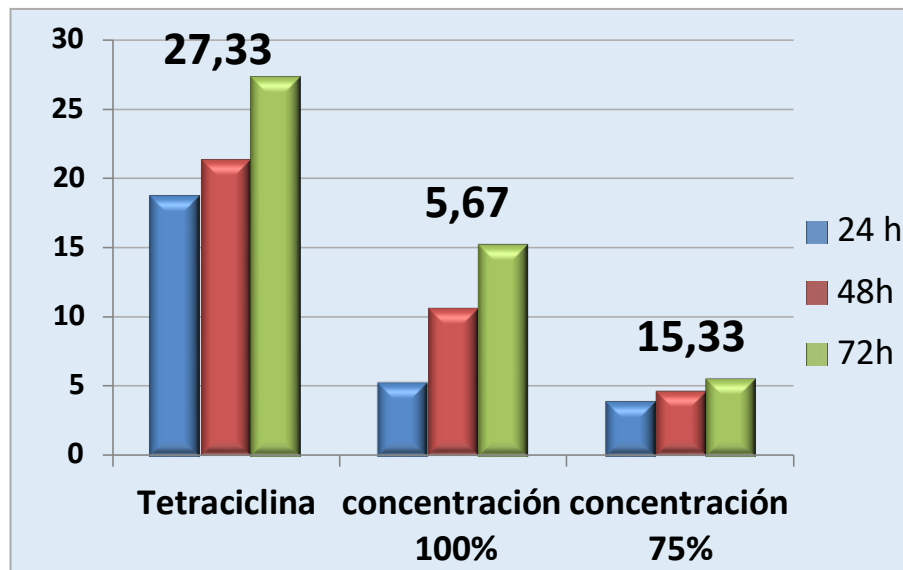
Tabla N° 9. Análisis de la varianza (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L. en cultivos de *Cutibacterium acnes* a las 72h

Unidireccional

Descriptivos						
Lectura_1_72h						
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
25%	3	,00	,000	,000	,00	,00
50%	3	,00	,000	,000	,00	,00
75%	3	5,67	,577	,333	4,23	7,10
100%	3	15,33	1,155	,667	12,46	18,20
Tetraciclina	3	27,33	1,155	,667	24,46	30,20
Agua destilada	3	,00	,000	,000	,00	,00
Total	18	9,29	10,184	2,222	4,65	13,92

ANOVA					
Lectura_1_72h					
	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2065,619	6	344,270	556,128	,000
Dentro de grupos	8,667	14	,619		
Total	2074,286	20			

Grafico 2. Lectura de formación de los halos de inhibición según el porcentaje de efectividad de la concentración del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.* al 75 % y 100% vs Tetraciclina a las 24, 48, y 72h



Interpretación de los resultados estadísticos:

Las tablas 7, 8 y 9 muestran el Análisis de Varianza de los efectos sobre los cultivos de *Cutibacterium acnes* con sus pruebas de comparaciones múltiples e intervalos de confianza al 95% según lo siguiente:

Para la bacteria *Cutibacterium acnes* se encontraron significancias estadísticas, en el modelo corregido ($p=0,000$), de igual forma para la intersección entre extracto hidroalcohólico, la bacteria y la concentración se determinó significancia estadística ($p=0,000$) lo mismo para los diferentes niveles de concentraciones ($p =0,000$).

La tabla 10 muestra la media de las concentraciones a las 72 h, la concentración al 75% es de 5,67, al 100% es de 15,33. Mientras que los controles positivos, Tetraciclina es de 27,33.

Tabla N° 10. Contrastes post hoc y comparaciones múltiples (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L en cultivos de *Cutibacterium acnes* a las 24h.

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: Lectura_1_24h							
	(I) Concentración del extracto	(J) Concentración del extracto	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	25%	50%	,000	1,069	1,000	-3,65	3,65
		75%	-4,000*	1,069	,028	-7,65	-,35
		100%	-5,333*	1,069	,003	-8,98	-1,68
		Tetraciclina	-18,667*	1,069	,000	-22,32	-15,02
		Agua destilada	,000	1,069	1,000	-3,65	3,65
	50%	25%	,000	1,069	1,000	-3,65	3,65
		75%	-4,000*	1,069	,028	-7,65	-,35
		100%	-5,333*	1,069	,003	-8,98	-1,68
		Tetraciclina	-18,667*	1,069	,000	-22,32	-15,02
		Agua destilada	,000	1,069	1,000	-3,65	3,65
	75%	25%	4,000*	1,069	,028	,35	7,65
		50%	4,000*	1,069	,028	,35	7,65
		100%	-1,333	1,069	,864	-4,98	2,32
		Tetraciclina	-14,667*	1,069	,000	-18,32	-11,02
		Agua destilada	4,000*	1,069	,028	,35	7,65
	100%	25%	5,333*	1,069	,003	1,68	8,98
		50%	5,333*	1,069	,003	1,68	8,98
		75%	1,333	1,069	,864	-2,32	4,98
		Tetraciclina	-13,333*	1,069	,000	-16,98	-9,68
		Agua destilada	5,333*	1,069	,003	1,68	8,98
	Tetraciclina	25%	18,667*	1,069	,000	15,02	22,32
		50%	18,667*	1,069	,000	15,02	22,32
		75%	14,667*	1,069	,000	11,02	18,32
		100%	13,333*	1,069	,000	9,68	16,98
		Agua destilada	18,667*	1,069	,000	15,02	22,32
	Agua destilada	25%	,000	1,069	1,000	-3,65	3,65
		50%	,000	1,069	1,000	-3,65	3,65
		75%	-4,000*	1,069	,028	-7,65	-,35
100%		-5,333*	1,069	,003	-8,98	-1,68	
Tetraciclina		-18,667*	1,069	,000	-22,32	-15,02	

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

Tabla N° 11. Contrastes post hoc y comparaciones múltiples (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L. en cultivos de *Cutibacterium acnes* a las 48h.

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: Lectura_1_48h							
	(I) Concentración del extracto	(J) Concentración del extracto	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	25%	50%	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
		75%	-4,667*	,642	,000	-6,86	-2,47
		100%	-10,667*	,642	,000	-12,86	-8,47
		Tetraciclina	-21,333*	,642	,000	-23,53	-19,14
		Agua destilada	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
	50%	25%	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
		75%	-4,667*	,642	,000	-6,86	-2,47
		100%	-10,667*	,642	,000	-12,86	-8,47
		Tetraciclina	-21,333*	,642	,000	-23,53	-19,14
		Agua destilada	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
	75%	25%	4,667*	,642	,000	2,47	6,86
		50%	4,667*	,642	,000	2,47	6,86
		100%	-6,000*	,642	,000	-8,19	-3,81
		Tetraciclina	-16,667*	,642	,000	-18,86	-14,47
		Agua destilada	4,667*	,642	,000	2,47	6,86
	100%	25%	10,667*	,642	,000	8,47	12,86
		50%	10,667*	,642	,000	8,47	12,86
		75%	6,000*	,642	,000	3,81	8,19
		Tetraciclina	-10,667*	,642	,000	-12,86	-8,47
		Agua destilada	10,667*	,642	,000	8,47	12,86
Tetraciclina	25%	21,333*	,642	,000	19,14	23,53	
	50%	21,333*	,642	,000	19,14	23,53	
	75%	16,667*	,642	,000	14,47	18,86	
	100%	10,667*	,642	,000	8,47	12,86	
	Agua destilada	21,333*	,642	,000	19,14	23,53	
Agua destilada	25%	,000	,642	1,000	-2,19	2,19	

		50%	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
		75%	-4,667*	,642	,000	-6,86	-2,47
		100%	-10,667*	,642	,000	-12,86	-8,47
		Tetraciclina	-21,333*	,642	,000	-23,53	-19,14

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

Tabla N° 12. Contrastes post hoc y comparaciones múltiples (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L en cultivos de *Cutibacterium acnes* a las 72h

Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: Lectura_1_72h							
	(I) Concentración del extracto	(J) Concentración del extracto	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	25%	50%	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
		75%	-5,667*	,642	,000	-7,86	-3,47
		100%	-15,333*	,642	,000	-17,53	-13,14
		Tetraciclina	-27,333*	,642	,000	-29,53	-25,14
		Agua destilada	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
	50%	25%	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
		75%	-5,667*	,642	,000	-7,86	-3,47
		100%	-15,333*	,642	,000	-17,53	-13,14
		Tetraciclina	-27,333*	,642	,000	-29,53	-25,14
		Agua destilada	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
	75%	25%	5,667*	,642	,000	3,47	7,86
		50%	5,667*	,642	,000	3,47	7,86
		100%	-9,667*	,642	,000	-11,86	-7,47
		Tetraciclina	-21,667*	,642	,000	-23,86	-19,47
		Agua destilada	5,667*	,642	,000	3,47	7,86
	100%	25%	15,333*	,642	,000	13,14	17,53
		50%	15,333*	,642	,000	13,14	17,53
		75%	9,667*	,642	,000	7,47	11,86
		Tetraciclina	-12,000*	,642	,000	-14,19	-9,81
		Agua destilada	15,333*	,642	,000	13,14	17,53
Tetraciclina	25%	27,333*	,642	,000	25,14	29,53	
	50%	27,333*	,642	,000	25,14	29,53	

		75%	21,667*	,642	,000	19,47	23,86
		100%	12,000*	,642	,000	9,81	14,19
		Agua destilada	27,333*	,642	,000	25,14	29,53
	Agua destilada	25%	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
		50%	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
		75%	-5,667*	,642	,000	-7,86	-3,47
		100%	-15,333*	,642	,000	-17,53	-13,14
		Tetraciclina	-27,333*	,642	,000	-29,53	-25,14

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

Interpretación de los resultados estadísticos:

La tabla 10, 11 y 12 muestra las comparaciones múltiples de los efectos entre los halos de inhibición por extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.* Sobre cultivos de *Cutibacterium acnes* del que se aprecia lo siguiente:

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los halos de inhibición según niveles de concentración del extracto hidroalcohólico para *Cutibacterium acnes* con significancias ($p=0,000$) $p<0,05$; siendo la de mayor diferencia la del nivel de concentración al 100% en comparación con los demás niveles.

4.2. Contrastación de hipótesis

4.2.1. Contrastación de la hipótesis general

Existe efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Camellia sinensis L.* (té verde) en cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris), in vitro.

H_A: El extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis L.* (té verde), si tiene efecto antibacteriano en cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris), in vitro.

H₀: El extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde), no tiene efecto antibacteriano en cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris), in vitro.

Resultados: La comprobación de la hipótesis general se basa en las contrastaciones de cada una de las hipótesis específicas ya planteadas. En consecuencia, al encontrarse significatividad en los resultados estadístico ANOVA en cepas de *Cutibacterium acnes*, por lo tanto se rechaza la hipótesis nula (H₀) y se acepta la hipótesis alterna (H_A).

Conclusión: El extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde), si tiene efecto antibacteriano en cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris), in vitro.

4.2.2. Contrastación de las hipótesis específicas

H₁: Existe presencia de metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde)

H_A: El extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L. (té verde) si tiene presencia de metabolitos secundarios.

H₀: El extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L. (té verde) no tiene presencia de metabolitos secundarios.

Resultados: Para la contrastación de esta primera hipótesis específica, se realizó el tamizaje fitoquímico y cromatografía en capa fina para poder determinar cualitativamente si el extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L. (té verde) obtiene presencia de metabolitos secundarios.

Los resultados para el tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde) están referidos en la tabla N° 2 donde se obtuvo como resultado, según el cuadro de leyenda, una abundante (+++) presencia de flavonoides, taninos, saponinas. Y en la cromatografía de capa fina para flavonoides se evidenció una fluorescencia verde a 360 nm indicando presencia de flavonoides. Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula (H₀) y se acepta

la hipótesis alterna (H_A).

Conclusión: El extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L. (té verde) si tiene presencia de metabolitos secundarios.

H₂: Existe concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde) con mayor efecto antibacteriano en cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris).

H_A: El extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde) si muestra una concentración con mayor efecto antibacteriano en cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris).

H₀: El extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde) no muestra una concentración con mayor efecto antibacteriano en cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris), in vitro.

Resultados: Para la contrastación de esta segunda hipótesis específica, se realizó el método por difusión en agar (Kirby Bauer) para determinar si existe una concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis* L. con mayor efecto antibacteriano en cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris). Los resultados obtenidos están referidos en la tabla N° 4, 5 y 6 donde se obtiene como resultado, según el cuadro de leyenda, una concentración al 75% poco activo y al 100% moderadamente activo. Por tanto se infiere como válida la hipótesis alterna (H_A) y se rechaza la hipótesis nula (H_0) de la segunda hipótesis específica (H_2).

Conclusión: El extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde) si muestra una concentración con mayor efecto antibacteriano en cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris).

H₃: Existe actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde) comparado con tetraciclina frente a cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris).

H_A: El extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té

verde) si tiene actividad antibacteriana comparado con tetraciclina frente a cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris).

H₀: El extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde) no tiene actividad antibacteriana comparado con tetraciclina frente a cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris).

Resultados: Para la contrastación de la tercera hipótesis específica, en el antibiograma (método de Kirby Bauer) se utilizó como control positivo la tetraciclina comparada con diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde) frente a cultivos de *Cutibacterium acnes*, donde se pudo observar la inhibición y la actividad antibacteriana de las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L. (té verde), obteniendo como resultado que los extractos al 75 y 100 por ciento si presentan actividad antibacteriana frente a cultivos de *Cutibacterium acnes*. Los resultados obtenidos están referidos en la tabla N° 4, 5 y 6. Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula (H₀) y se acepta la hipótesis alterna (H_A).

Conclusión: El extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Camellia sinensis* L. (té verde) si tiene actividad antibacteriana comparado con tetraciclina frente a cultivos de *Cutibacterium acnes* (acné vulgaris).

4.3 Discusión de los resultados

En cuanto a las respuestas de las investigaciones fitoquímicas del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L. realizado se confirmó la presencia de metabolitos secundarios, como alcaloides cuyo crecimiento microbiano es moderado, también posee flavonoides en abundancia, y otros como taninos, saponinas, aminoácidos y Cumarinas.

En su estudio Rivera B., determinó la evidencia presente de los aminoácidos, taninos, compuestos fenólicos, esteroides y/o triterpenos, quinonas y leucoantocianidinas; resaltando como principales metabolitos activos a los flavonoides, esteroides y triterpenos.

En la prueba de cromatografía en capa fina a 360 nm para flavonoides tiene como grupo fitoquímico la presencia de 5 flavonoides diferentes, observadas en la prueba 5 manchas en la placa. Y una de ellas mostrando una fluorescencia a 250 nm en la cromatografía de capa fina para alcaloides evidenciando la presencia de alcaloides.

En el trabajo de investigación se comprobó que el extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L. a una concentración de 75 y 100% da como resultado positivo efecto antibacteriano en cultivos de *Cutibacterium acnes*, estudios in vitro.

En su estudio Jaramillo J, et al. Señala que el género *Camellia* presenta Efecto de inhibición del extracto de Té verde en concentraciones de 100%, 75%, 50%, 25% frente a *Streptococcus mutans* en 20 muestras". Y Ulloa T. Susceptibilidad in vitro del *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 frente a tres extractos hidroalcohólicos diferentes de concentración de *Camellia sinensis* (té verde). Concluyó que el *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 es susceptible a los extractos hidroalcohólicos de 5%, 10% y 20% de *Camellia Sinensis* "Te verde".

En lo referente a la investigación los resultados obtenidos en el extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L. ., en la determinación de la actividad antibacteriana; en la muestra del *Cutibacterium acnes* ATCC 6919, se verificó que el extracto hidroalcohólico *Camellia sinensis* en una concentración de 75% se visualizó una moderada actividad -antibacteriana significativa, en tanto el extracto

hidroalcohólico *Camellia sinensis* con una concentración al 100% demostró la presencia de una mejor actividad antibacteriana por que la medición de los halos en respuesta fue superior. Demostrándose así que las concentraciones en pruebas del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L., con actividad antibacteriana dieron como resultados las concentraciones al 75 y 100%.

Por lo tanto demostrado en las pruebas indicaremos las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en las medidas de los diámetros obtenidos en los halos de inhibición de las diferentes concentraciones empleadas del extracto hidroalcohólico frente a *Cutibacterium acnes*, destacándose las concentraciones al 75% y 100%. Considerando así que poseen acción antibacteriana activa frente a los cultivos de *Cutibacterium acnes*. La razón de estas diferencias en la actividad del extracto hidroalcohólico puede deberse a los metabolitos secundarios encontrados como: flavonoides, alcaloides, fenoles, cumarinas, estos se encuentran en todo el grupo de plantas en mayor proporción.

En su estudio Purizaca M., et al., Publicaron sobre la Actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos de las hojas, flores, tallo y raíz de *Schkuhria pinnata* (canchalagua) frente a cepas de *Propionibacterium acnes*, en el trabajo usaron diferentes fármacos controles pertenecientes a distintos grupos farmacológicos como: Tetraciclinas, Quinolonas, Macrólidos y Penicilinas; escogiendo de cada grupo un fármaco para ser comparado con el extracto hidroalcohólico, obteniendo como resultado que el extracto presentó mayor halo de inhibición.

Siendo la Tetraciclina uno de los fármacos utilizados como tratamiento de primera línea en caso de acné; se optó como fármaco control positivo para así determinar el porcentaje de efectividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L., por consiguiente se realizó el cálculo del efecto inhibitorio relativo a las concentraciones de 75% y 100%, siendo estas concentraciones las que presentaron mayor valor de medida en la formación del halo de inhibición, obteniendo los valores de 21,96% y 47,96 % en comparación con la Tetraciclina. Por tal motivo se considera que el extracto hidroalcohólico en la concentración al 100% posee mayor efecto antibacteriano.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Existe presencia de metabolitos secundarios en el extracto las cuales son: flavonoides, taninos, aminoácidos, saponinas, Cumarinas y alcaloides.

El extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.* en las concentraciones de 75 % presento un porcentaje de inhibición de 21,91 y 100 % su porcentaje de inhibición fue 47,96 presentando efecto antibacteriano en los cultivos de *Cutibacterium acnes*, in vitro.

La concentración al 100 por ciento del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis L.* Presentó efecto antibacteriano de un 47.96 %, con un halo de inhibición de 10,44 mm al fármaco control de tetraciclina (TE) en cultivos de *Cutibacterium acnes*, estudios in vitro

5.2. Recomendaciones

1. Las instituciones académicas de enseñanzas Universitarias deben fomentar conjuntamente con la autoridad de la cual deriva, el estudio e investigación de las diversas plantas nativas que se cultivan en nuestro Perú. Realizar nuevas investigaciones ya que el Perú cuenta con una amplia defensa de insumos naturales hallados en los metabolitos secundarios propios de cada planta con propiedades terapéuticas en el tratamiento del acné.
2. Realizar nuevas investigaciones fitoquímicas farmacológicas microbiológicas de la planta *Camellia sinensis* L siendo un potencial fitoterapéutico para el tratamiento del acné.

BIBLIOGRAFÍA

1. Creces, ciencia y tecnología [Internet] 2002. [consultado el 23 marzo de 2019], Disponible en: <http://www.creces.cl/new/index.asp?imat=%20%20%3E%20%2037&tc=3&nc=5&art=897>.
2. León Rodríguez L, Multirresistencia antimicrobiana de cepas *Cutibacterium acnes* productoras de betalactamasas de espectro extendido (blee) aislados en antibiograma del Hospital Regional Manuel Nuñez Butrón Puno, 2012.
3. Kuehnast, Torben; Cakar, Fatih; Weinhäupl, Theresa;. [Análisis comparativo de la formación de biofilm entre muestras diferentes de *Cutibacterium acnes*],. Internatinal Journal of Medical Microbiology. Vol 2: 18ª ed. Austria 2018.
4. Jorge Eduardo Arellano, Acné es una enfermedad crónica que afecta autoestima, señala experta mexicana. el nuevo diario, México 2018
5. Sociedad Peruana de Derecho Ambiental [Internet]. Análisis de Potenciales Casos de Biopiratería en el Perú; 2005[consultado el 23 de marzo de 2019] Disponible en: <http://cendoc.esan.edu.pe/fulltext/e-documents/SerieIniciativa3.pdf>.
6. Landeta J., Naranjo L., Evaluación de la actividad antibacteriana de *Camellia sinensis* L. (Té verde). Treinta Reales, utilizando un modelo in vivo. Quito, Marzo, 2015.
7. Odom D. *Camellia sinensis* the tea plant. The *Camellia sinensis* Journal 2007; pag. 18 – 20.
8. Rivera B., Bárbara D., Efecto de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos hidroalcohólicos a base del llantén (*Plantago mayor*) y Te verde (*Camellia sinensis*), a la concentración del 25%, 50% y 100% en *Streptococcus mutans*”, Universidad católica de Santa María, Facultad Farmacia y bioquímica, Arequipa.2015
9. Pauca Y., Efecto del extracto acuoso de *Camellia sinensis* (Té verde) y la clorhexidina al 0.12% sobre *Streptococcus mutans* y *Candida sp.* de la microflora

de conductos infectados en dientes deciduos u.c.s.m. - Arequipa. Universidad Católica de Santa María. Facultad de odontología.2016.

10. Purizaca M., Condori A. Actividad antibacteriana de los extractos hidroalcohólicos de las hojas, flores, tallo y raíz de *Schkuhria pinnata* (Lanm.) Kuntze ex Thell “canchalagua” frente a *Propionibacterium acnés*. Universidad Norbert Wiener, Facultad Farmacia y Bioquímica. 2018.
11. García K. Efecto antibacteriano de una infusión de *Camellia sinensis* (Té verde) usada como colutorio, sobre placa bacteriana y saliva .Universidad de Trujillo. Escuela de Postgrado. Trujillo. 2015
12. Ulloa T. Susceptibilidad in vitro del *Streptococcus mutans* ATCC 2652263 frente a tres extractos etanólicos de *Camellia sinensis* Té verde. Universidad Nacional de Trujillo, Facultad Postgrado. 2009.
13. Jaramillo J., Barragán G., Efecto de inhibición del extracto de Té verde en concentraciones de 100%, 75%, 50%, 25% frente a *Streptococcus mutans* en 20 muestras in vitro. Facultad de Odontología. Quito.2018
14. Mora A., Parra J., Chaverri J., Arias L. Determinación de la capacidad antimicrobiana del Té verde (*Camellia sinensis*) contra los agentes potencialmente patógenos *Escherichia coli*, *Salmonella entérica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeriamonocytogenes*, *Candida albicans* y *Aspergillus niger*. Universidad de Costa Rica, Facultad de Nutrición, 2013.
15. Gallardo C., Determinación del efecto inhibidor de tres variedades de Té sobre flora fúngica presente en una sala de maduración de quesos, Universidad Austral de Chile, Facultad de ciencias agrarias, Valdivia -Chile 2013.
16. Solis M., Velasco N., Estudio sobre la susceptibilidad antimicrobiana del *Propionibacterium acnes* y *Staphylococcus epidermidis* en pacientes con acné vulgaris, atendidos en el servicio de dermatología en el Hospital General Enrique Garcés, en el periodo comprendido entre junio y agosto. Pontificie Universidad Católica de Ecuador, Facultad de medicina. Ecuador ,2015.
17. Descripción del Té verde. [Internet] [consultado el 21 marzo 2019]. Disponible en: <https://www.botanicalonline.com/medicinalsteverde.htm>

18. Información general. [Internet] [consultado el 21 marzo de 2019]. Disponible en: <http://www.biovirtual.unal.edu.co/es/colecciones/detail/119479/>
19. Ing. Manuel Cevallos A., Cultivo y Procesamiento del Té. Lima-Perú, 1979, pag. 1 – 4.
20. Eliana Palacio Sánchez, Marcel Enrique Ribero Vargas, Juan Carlos Restrepo Gutiérrez. Toxicidad hepática por Té verde (*Camellia sinensis*): Revisión de tema. Rev Col Gastroenterol / 28 (1) 2013.
21. Botanical, Plantas Medicinales. [Internet]. 2009. [consultado el 23 marzo el 2019]. Disponible en: https://www.botanicalonline.com/fitoterapia_plantas_medicinales.htm
22. Tiamina del té verde. [Internet] [consultado el 19 marzo en 2019]. Disponible en: <https://www.lineaysalud.com/salud/mente/l-teanina>
23. Flavonoides.org US application 20150274692, Keqiang Ye, “7,8-Dihydroxyflavone and 7,8-substituted flavone derivatives, compositions, and methods related thereto”, published 2015-10-01, assigned to Emory University
24. Hartisch C, Kolodziej H, von-Bruchhausen F. Dual inhibitory activities of tannins from Hamamelis virginiana and related polyphenols on 5-lipoxygenase and lyso-PAF: acetyl-CoA acetyltransferase. Planta Medica 2013; 63: 106-10.
25. Angel w. Vargas Mosqueria, Plantas medicinales y fitomedicamentos pag 86-87.2016.
26. Carlos Kozel, Guía moderna de medicina natural 2º Edición pag. 317, Editorial asdimos.
27. Harrison. Principios de medicina interna McGraw - Hill, Vol. III Pag. 103 -105. Madrid. 2009 [consultado el 22 de marzo de 2019]. Disponible en: [Bra unwald, Fauci,kasper, Hauser,Longo, jameson.](#)
28. Enciclopedia de la Salud.[Internet]. 2010 [consultado el 20 marzo el 2019]. Disponible en: <http://www.encyclopediasalud.com/definiciones>.

29. UNMSM, revista científica dermatológica. [Internet]. 2009. [consultado el 20 marzo el 2019]. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/dermatologia/v22_n2/pdf/a01v22n2.pdf
30. Medlineplus, Biblioteca Nacional de los E.E.UU. Acné 07 marzo 2019
31. J.Henson J.M. Gatell, mt. Jimenez., G. Prats. Guía terapéutica antimicrobiana. 2002. pag 240.
32. Michel T. Madigan, John M. Martinka, Jack Parker libro Brock biología de los microorganismos. pag-722
33. Tetraciclinas Dr. Miguel Ángel Rodríguez Rodríguez, Dr. José Gundián González Piñera, Dr. Jesús Barreto Penié, Dra. Nora Lim Alonso, Dr. Alejandro Areu y Dr. Armando Pardo Núñez. M. Rodríguez Rodríguez et al. acta medica 1998; 8(1):75.
34. Consuelo Ramírez palomares, Alfonso Garfias A., Farmacología Vol. II pag 395

ANEXOS

ANEXO N° 1: MATRIZ DE CONSISTENCIA

TITULO: EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE HOJAS SECAS DE <i>Camellia sinensis</i> (TE VERDE) EN CULTIVOS DE <i>Cutibacterium acnes</i> (ACNE VULGARIS), IN VITRO							
DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS	CLASIFICACIÓN DE VARIABLES	INDICADORES	METODOLOGIA	POBLACION, MUESTRA	INSTRUMENTO
<p>Problema General:</p> <p>¿Cuál será el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas secas de <i>Camellia sinensis</i> (té verde) en cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> (acné vulgaris), in vitro?</p>	<p>Objetivo General:</p> <p>Determinar cuál es el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas secas de <i>Camellia sinensis</i> (té verde) en cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> (acné vulgaris), in vitro</p>	<p>Hipótesis Principal:</p> <p>Existe efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas secas de <i>Camellia sinensis</i> (té verde) en cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> (acné vulgaris), in vitro.</p>	<p>Variable Independiente:</p> <p>a) Extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Camellia sinensis</i> L. (té verde)</p>	<p>VI:</p> <p>Metabolitos secundarios</p> <p>Dosis</p> <p>Concentración al 25 %</p> <p>Concentración al 50 %</p> <p>Concentración al 75 %</p> <p>Concentración al 100 %</p>	<p>DISEÑO:</p> <p>Experimental</p> <p>Aleatorizado</p> <p>TIPO:</p> <p>Aplicativo</p> <p>NIVEL:</p> <p>Explicativo</p>	<p>POBLACION VEGETAL</p> <p>Constituida por la especie <i>Camellia sinensis</i> L. (té verde)</p> <p>UNIDAD DE ANALISIS</p> <p><i>Cutibacterium acnes</i> ATCC® 6919</p> <p>MUESTRA VEGETAL</p> <p>500 gr de hojas secas de <i>Camellia sinensis</i> L. (té verde)</p>	<p>TECNICA Tamizaje fitoquímico Método de Kirby- Bauer</p> <p>INSTRUMENTO Y RECOLECCIÓN DE DATOS</p> <p>Ficha de observación ad-hoc</p> <p>PROCESAMIENTO DE DATOS</p> <p>Estadística</p>
<p>Problemas Específicos:</p> <p>¿Existirá metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Camellia sinensis</i> L. (té verde)?</p> <p>¿Cuál será concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Camellia sinensis</i> L. (té verde) con mayor efecto antibacteriano en cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> (acné vulgaris)?</p> <p>¿Cuál será la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de hojas secas de <i>Camellia sinensis</i> L. (té verde) comparado con tetraciclina frente a cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> (acné vulgaris)?</p>	<p>Objetivos Específicos:</p> <p>Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Camellia sinensis</i> L. (té verde).</p> <p>Determinar la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Camellia sinensis</i> L. (té verde) con mayor efecto antibacteriano en cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> (acné vulgaris).</p> <p>Comparar la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de hojas secas de <i>Camellia sinensis</i> L. (té verde) con tetraciclina frente a cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> (acné vulgaris).</p>	<p>Hipótesis Específicas:</p> <p>Existe presencia de metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Camellia sinensis</i> L. (té verde)</p> <p>Existe concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Camellia sinensis</i> L. (té verde) con mayor efecto antibacteriano en cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> (acné vulgaris).</p> <p>Existe actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Camellia sinensis</i> L. (té verde) comparado con tetraciclina frente a cultivos de <i>Cutibacterium acnes</i> (acné vulgaris)</p>	<p>Variable Dependiente:</p> <p>b) Efecto antibacteriano</p>	<p>VD: Diámetro de halos Mm</p>			

ANEXO N° 2: FICHA DE VALIDACIÓN POR JUICIO DE EXPERTO

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA

FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE MARCHA FITOQUIMICA

“Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Camellia sinensis* L. (te verde) en cultivos de *Cutibacterium acnés* (Acné Vulgaris), in vitro

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación. Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios donde no pueda registrar información, táchelos con una línea.

MARCHA FITOQUIMICA DEL TE VERDE (<i>Camellia sinensis</i> L.)			
Principio Activo	Nombre de la Reacción	Resultado	Interpretación
Flavonoides	Reacción de Shinoda		
	Reacción con $Pb(CH_3COO)_2$		
Compuestos Fenólicos	Cloruro Férrico al 5%		
Taninos	Gelatina Salada		
Aminoácidos	Reacción con Ninhidrina		
Saponinas	Reacción con agua		
Cumarinas	Reacción NaOH al 10%		
Alcaloides	Reacción Dragendorff		
	Reacción Mayer		
	Reacción Wagner		

LEYENDA:

Muy abundante	+++
Abundante	++
Moderado	+
Escaso	+/-
Ausencia	-



**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA**

**HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO
FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

“Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas secas de Camellia sinensis L. (Té Verde) en cultivos de Cutibacterium acnés (Acné Vulgaris), in vitro

1. DATOS GENERALES

- 1.1. Apellido y nombre del experto: PINEDA PEREZ, NEUMAN MARIO
 1.2. Cargo e institucion donde labora: DOCENTE - FAC. DE FARMACIA Y BIOQUIMICA - UJGV
 1.3. Grado Academico: MAGISTER Profesional: QUIMICO FARMACEUTICO
 1.4. Nombre de Instrumento y motivo de evaluacion: FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE RECOLECCION DE DATOS ANTIBACTERIANO SOBRE CUTIBACTERIUM ACNES
 1.5. Autor de Instrumento: MARCIA F. PALACIOS HOYOS, JUANA E. DAMULENA VARGAS

Instrucciones: Luego de analizar el instrumento y cotejar la investigacion con la matriz de consistencia de la presente, le solicitamos que, en base a su criterio y experiencia profesional, valide dicho instrumento para su aplicación

Nota: Para cada criterio se consieraron las escalas de 50 a 100 donde:

50.- Muy poco	60.- Poco	70.- Regular	80.- Aceptable	90.- Por Modificar	100.- Muy Aceptable
---------------	-----------	--------------	----------------	--------------------	---------------------

CRITERIOS	PUNTUACIÓN					
	50	60	70	80	90	100
¿En que porcentaje estima que con este instrumento se logran los objetivos propuesto?					X	
¿En qué porcentaje considera que los items están referidos a los conceptos del tema?					X	
¿En qué porcentaje de los Items planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?					X	
¿En qué porcentaje estima que los Items del instrumento son de ejecución viable?					X	
¿En qué porcentaje de los Items considera usted que siguen una secuencia lógica?						X
¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrían datos similares si se aplicara en otras muestras?					X	
Total					X	

SUGERENCIAS:

Ninguno

Opinión de Aplicabilidad: Aplicar

Promedio de Validación: 95%

Mg. Q.F. Pineda Pérez
 Firma del Experto C.Q.F.P 18130

Puntuacion	
50	No valido
60	No valido, Reformular
70	No valido
80	No valido, modificar
90	Valido, por mejorar
100	Valido, Aplicar



**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA**

**HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO
FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

“Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Camellia sinensis* L. (te verde) en cultivos de *Cutibacterium acnés* (Acné Vulgaris), in vitro

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación. Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios donde no pueda registrar información, táchelos con una línea.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA SOBRE <i>Cutibacterium acnés</i>				
CONCENTRACION	PLACA PETRI	TIEMPO (horas)		
		24 h	48 h	72 h
25 %	1			
	2			
	3			
50 %	1			
	2			
	3			
75 %	1			
	2			
	3			
100 %	1			
	2			
	3			

LEYENDA:

Crecimiento Microbiano	Especificación Crecimiento
-	Ausencia
+/-	Escaso
+	Moderado
++	Abundante
+++	Muy abundante



**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA**

**HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO
FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

“Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas secas de Camellia sinensis L. (Té Verde) en cultivos de Cutibacterium acnés (Acné Vulgaris), in vitro

1. DATOS GENERALES

- 1.1. Apellido y nombre del experto: MUGURUZA LOPEZ, OSCAR ALBERTO
 1.2. Cargo e institucion donde labora: DOCENTE - FAC. DE FARMACIA Y BIOQUIMICA - VIGV
 1.3. Grado Academico: MAGISTER Profesional: QUIMICO FARMACEUTICO
 1.4. Nombre de Instrumento y motivo de evaluacion: FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE RECOLECCION DE DATOS ANTIBACTERIANA SOBRE CUTIBACTERIUM ACNES
 1.5. Autor de Instrumento: MARCIA F. PALACIOS HOYOS, JUANA E. PAHUCENA VARGAS

Instrucciones: Luego de analizar el instrumento y cotejar la investigacion con la matriz de consistencia de la presente, le solicitamos que, en base a su criterio y experiencia profesional, valide dicho instrumento para su aplicación

Nota: Para cada criterio se consieraron las escalas de 50 a 100 donde:

50.- Muy poco	60.- Poco	70.- Regular	80.- Aceptable	90.- Por Modificar	100.- Muy Aceptable
---------------	-----------	--------------	----------------	--------------------	---------------------

CRITERIOS	PUNTUACIÓN					
	50	60	70	80	90	100
¿En que porcentaje estima que con este instrumento se lograran los objetivos propuesto?					X	
¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidos a los conceptos del tema?					X	
¿En qué porcentaje de los ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?					X	
¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de ejecución viable?					X	
¿En qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia lógica?						X
¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrían datos similares si se aplicara en otras muestras?					X	
Total						

SUGERENCIAS:

..... NINGUNA

Opinión de Aplicabilidad: APLICABLE

Promedio de Validación: 950/0

.....


Firma del Experto

Puntuacion	
50	No valido
60	No valido, Reformular
70	No valido
80	No valido, modificar
90	Valido, por mejorar
100	Valido, Aplicar

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA**

FICHA DE OBSERVACION AD-HOC PRUEBA DE SOLUBILIDAD

“Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Camellia sinensis* L. (te verde) en cultivos de *Cutibacterium acnés* (Acné Vulgaris), in vitro

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación. Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios donde no pueda registrar información, táchelos con una línea.

PRUEBA DE SOLUBILIDAD		
N°	SOLVENTE	RESULTADO
1	Agua	
2	Etanol	
3	Cloroformo	
4	Acetona	
5	Ciclohexano	

LEYENDA:

Muy soluble	+++
Soluble	++
Poco soluble	+
Insoluble	-



**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA**

**HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO
FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

“Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas secas de Camellia sinensis L. (Té Verde) en cultivos de Cutibacterium acnés (Acné Vulgaris), in vitro

1. DATOS GENERALES

- 1.1. Apellido y nombre del experto: PONCE PARDO, JOHN ELOY
 1.2. Cargo e institucion donde labora: DOCENTE - FAC. DE FARMACIA Y BIOQUIMICA-USGV
 1.3. Grado Academico: MAGISTER Profesional: QUIMICO FARMACEUTICO
 1.4. Nombre de Instrumento y motivo de evaluacion: FICHA DE OBSERVACION AD-HOC DE RECOLECCION DE DATOS ANTIBACTERIANA SOBRE CUTIBACTERIUM ACNES
 1.5. Autor de Instrumento: MARCIA F. PALACIOS HOYOS, JUANA E. PAMUCENA VARGAS

Instrucciones: Luego de analizar el instrumento y cotejar la investigacion con la matriz de consistencia de la presente, le solicitamos que, en base a su criterio y experiencia profesional, valide dicho instrumento para su aplicación

Nota: Para cada criterio se consieraron las escalas de 50 a 100 donde:

50.- Muy poco	60.- Poco	70.- Regular	80.- Aceptable	90.- Por Modificar	100.- Muy Aceptable
---------------	-----------	--------------	----------------	--------------------	---------------------

CRITERIOS	PUNTUACIÓN					
	50	60	70	80	90	100
¿En que porcentaje estima que con este instrumento se logran los objetivos propuestos?				X		
¿En qué porcentaje considera que los items están referidos a los conceptos del tema?					X	
¿En qué porcentaje de los Items planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?				X		
¿En qué porcentaje estima que los Items del instrumento son de ejecución viable?				X		
¿En qué porcentaje de los Items considera usted que siguen una secuencia lógica?					X	
¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrían datos similares si se aplicara en otras muestras?				X		
Total						

SUGERENCIAS:

NINGUNA

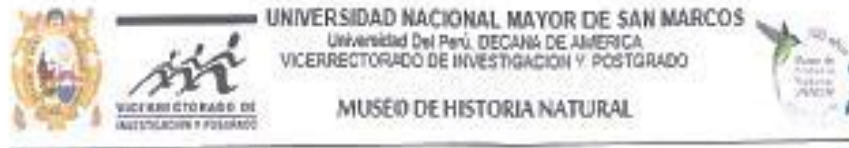
Opinión de Aplicabilidad: Aplicable

Promedio de Validación: 80

[Firma]
Firma del Experto

Puntuacion	
50	No valido
60	No valido, Reformular
70	No valido
80	No valido, modificar
90	Valido, por mejorar
100	Valido, Aplicar

ANEXO N° 3: CERTIFICADO BOTANICO DEL TE VERDE (*Camellia sinensis* L.)



"Año de la lucha contra la corrupción e impunidad"

CONSTANCIA N° 249-USM-2019

EL JEFE 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 completa) recibida de **Marcia Fernanda Palacios Hoyos, Juana Elisa Pamucena Vargas**, estudiantes de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega; **Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica**, ha sido estudiada y clasificada como: *Camellia sinensis* L. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de clasificación de Cronquist (1981):

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUB CLASE: ASTERIDAE

ORDEN: ERICALES

FAMILIA: THEACEAE

GENERO: *Camellia*

ESPECIE: *Camellia sinensis* L.

Nombre vulgar: "Te verde"

Determinado por: Bigo, Mario Benavente Palacios

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

Lima, 08 de Agosto de 2019



D^a. Arenales 1756, Jesús María
Cajal. 144034 Lima 14, Perú

Teléfono:
610-7890 anexo 3701, 3702, 3704

Email: marcovin@unsm.edu.pe
<http://www.unsm.edu.pe>

ANEXO N° 4: CERTIFICADO DE LAS CEPAS *Cutibacterium acnes* (ATCC® 6919)



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Cutibacterium acnes</i> Catalog Number: 0170 Lot Number: 170-21** Reference Number: ATCC® 6919™** Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2020/5/31 Release Information: Quality Control Technologist: Tracy A. Blenker Release Date: 2018/6/25
---	---

Performance	
Macroscopic Features: Punctiform to small, circular, convex, entire edge, glistening, becoming larger as colonies age Microscopic Features: Small gram positive rods	Medium: A/R SBAP Method: Gram Stain (1)

ID System: MALDI-TOF (1)
 See attached ID System results document

Amanda Kuperus
 Quality Control Manager
 AUTHORIZED SIGNATURE

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

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

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



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

(†) These tests are accredited to ISO15189:2013.



Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: *Culibacterium acnes*
 Sample Description: C170
 Sample ID: 170-21
 Sample Creation Date/Time: 2018-05-18T17:11:42.683 MB
 Applied MSP Library(ies): BDAL_Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listana

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
D3 (+++)(A)	170-21	<i>Propionibacterium acnes</i>	2.36

Comments:

N/A

ANEXO N° 5: FICHA TECNICA DE LA TETRACICLINA (TE) 30 mcg



Tetraciclina (Te) 30 mcg

SENSIDISCOS DE TETRACICLINA PARA PRUEBA DEL ANTIBIOGRAMA

Para uso en el diagnóstico in vitro,
Vial conteniendo 200 discos. Cód. 400-320
Vial conteniendo 50 discos. Cód. 400-320b
Dispensador conteniendo 50 discos. Cód. 400-320c

INTRODUCCION

Se pueden usar una serie de técnicas para determinar la susceptibilidad in vitro de las bacterias a los agentes antimicrobianos.

En la mayoría de los laboratorios clínicos, se utiliza de rutina el método de la difusión en agar, para las bacterias comunes de desarrollo rápido.

El método estándar recomendado comúnmente por el CLSI (1) está basado en la técnica descrita por Bauer et al. (2).

De todos los medios disponibles el agar Mueller-Hinton fue elegido para realizar este método.

REACTIVOS

Frasco vial con 50 discos de celulosa impregnados con Tetraciclina (Te) 30 mcg. Frasco vial con 200 sensidiscos, Dispensador con 50 sensidiscos. Reactivos listos para su uso.

CONSERVACION

Los sensidiscos se deben mantener en refrigeración (2 a 8°C o congelados bajo -14°C, hasta su uso), y éstos son estables hasta la fecha de vencimiento indicada en el rótulo del envase.

MUESTRAS

Todo espécimen biológico que presente una infección bacteriana

TECNICA

1.	Seleccionar al menos cuatro a cinco colonias aisladas del mismo tipo morfológico desde el agar de la placa de cultivo.
2.	Traspasar las colonias a un tubo que contenga cuatro a cinco mililitros (ml) de caldo de cultivo apropiado, tal como el caldo de soya caseína.
3.	Incubar el cultivo a 35°C hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar McFarland N° 0.5 (DO a 625 nm debería ser 0.08 a 0.10).
4.	Sembrar la superficie seca de la placa de agar Mueller-Hinton con una tórula estéril con el cultivo recién preparado en el paso anterior a través de toda la superficie en tres direcciones, previo haber eliminado el exceso de caldo presionando y rotando la tórula en las paredes del tubo, sobre el nivel del caldo.
5.	Volver a tapar la placa y esperar unos 3 a 5 minutos (no más de 15 minutos) para que se absorba cualquier exceso de humedad antes de aplicar los sensidiscos. Colocar los sensidiscos con pinzas estériles, en la superficie del agar inoculado, presionar levemente cada disco para asegurar un completo contacto con la superficie del agar.
6.	Como algunos de los antimicrobianos difunden casi instantáneamente, no se debe mover un disco una vez que éste ha hecho contacto con el agar.

6.	Invertir la placa e incubar a 35° C después de 15 minutos de haber aplicado los discos.
7.	Examinar las placas transcurridas de 16 a 18 hrs. de incubación y medir los diámetros de los halos de las zonas de inhibición (20 a 24 hrs. para <i>N.gonorrhoeae</i> o para <i>Sthaphylococos</i> Meticilina-resistentes).
8.	Comparar el tamaño de las zonas medidas con: Resistente ≤11 mm, Susceptible ≥15 mm

CRITERIO DE DESEMPEÑO

Halos de inhibición de acuerdo a las especificaciones CLSI.

MATERIALES ADICIONALES NO SUMINISTRADOS

Se requiere de estufa de cultivo, pinzas, placa de Petri con agar Muller Hinton, mechero de Bunsen y tórula estéril.

LIMITACIONES DEL METODO

Microorganismos de lento desarrollo, anaerobios estrictos y capnófilos no se les aplica este método.

S. Aureus "Meticilina-resistente" presentan problemas, estas cepas parecen tener una resistencia clínica aumentada a las penicilinas y cefalosporinas, aunque parezcan ser susceptibles in vitro.

PRECAUCIONES Y ADVERTENCIAS

Discos conteniendo compuestos B-lactámicos, deben mantenerse siempre congelados para asegurar la mantención de su potencia, se puede mantener una cantidad en uso entre 2 a 8° C durante una semana. No afecta su desempeño si son mantenidos a menos de 0°C.

Sacar el frasco vial del refrigerador 1 a 2 hrs. antes de ser usado y permitir que alcance la temperatura ambiente antes de ser abierto.

Utilizar placas con agar Mueller Hinton exento de azufre, de un espesor de 4 mm en la placa, preparadas en una superficie nivelada. Se recomienda realizar controles de calidad periódicos.

CONTROL DE CALIDAD

Cada Lote de sensidiscos se controla con Cepas Estándares ATCC según su espectro con la técnica de Bauer et al. y se comparan los halos obtenidos con los descritos por CLSI.

E.coli ATCC 25922 : **18-25 mm**, *S.aureus* ATCC 25923 : **24-30 mm**.

REFERENCIAS

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1993 December, NCCLS Document Vol. 13 N° 24, Villanova, PA.
2. Bauer, A.W., W.M.M. Kirby, J.C. Sherris, and Turck. 1966. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *Am.J.Clin.Pathol.* 45:493-496.

ANEXO N° 6: TESTIMONIOS FOTOGRAFICOS

FOTO N°1: Preparación del material vegetal *Camellia sinensis* L.



FOTO N°2: Preparación del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L.

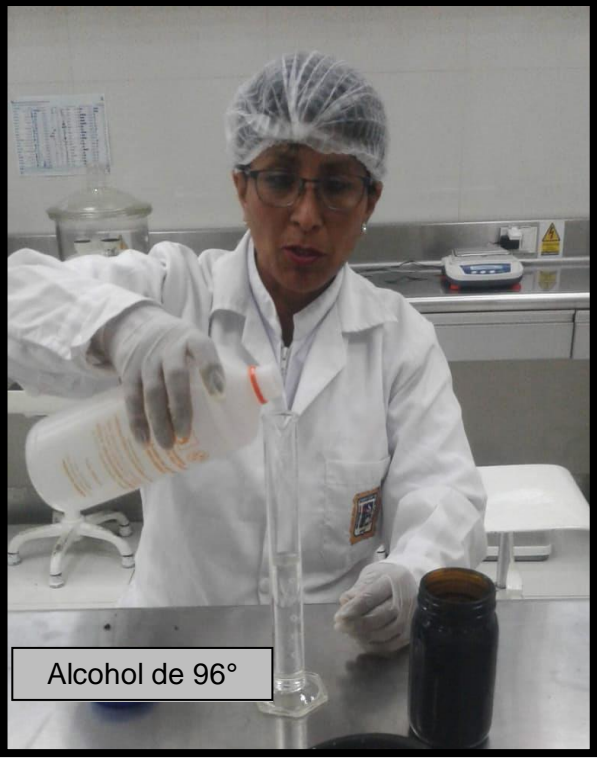


FOTO N°3: Obtención del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L.

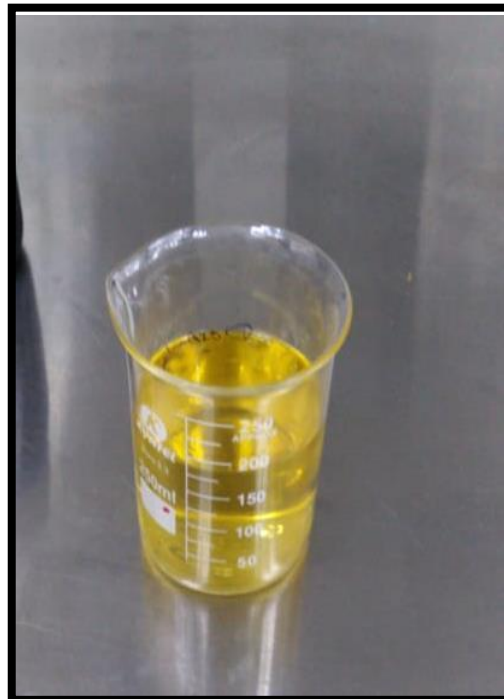


FOTO N°4: Prueba de solubilidad

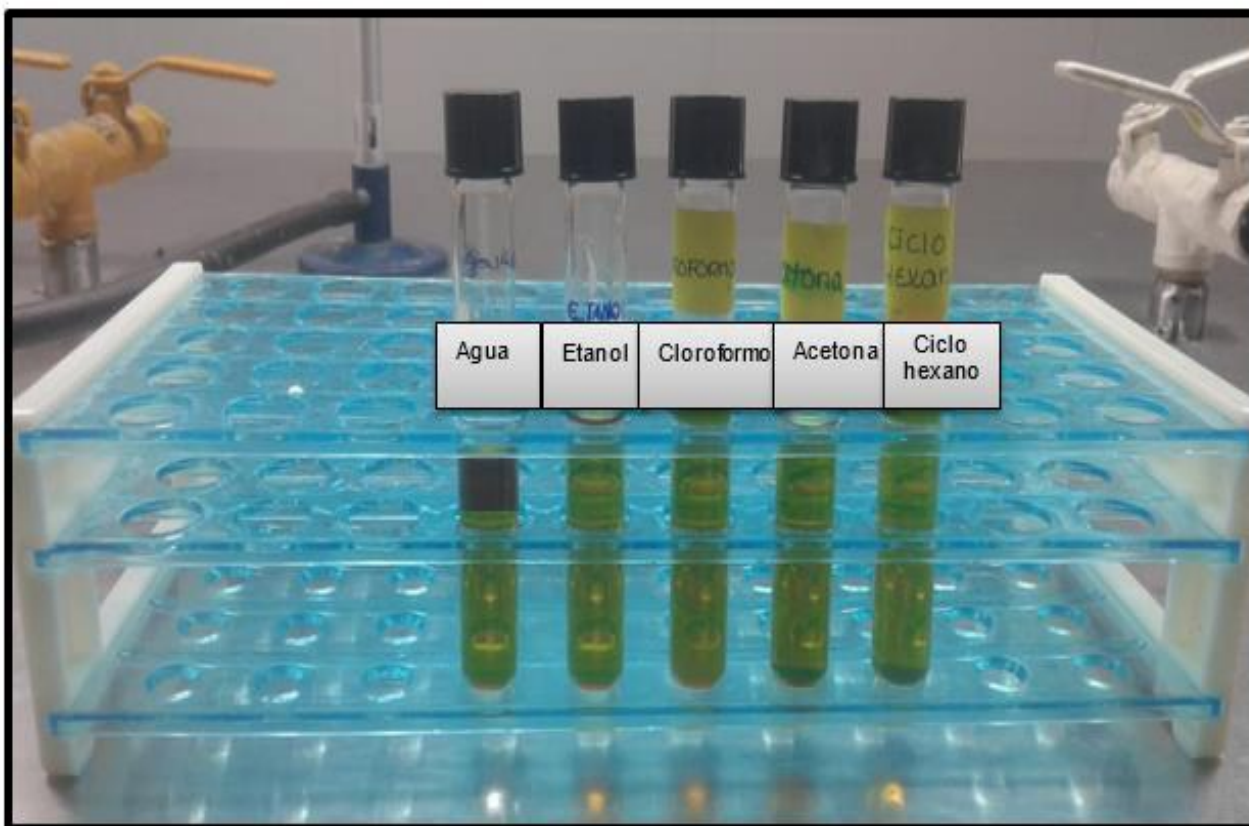


FOTO N°5: Tamizaje Fitoquímico, identificación de metabolitos secundarios

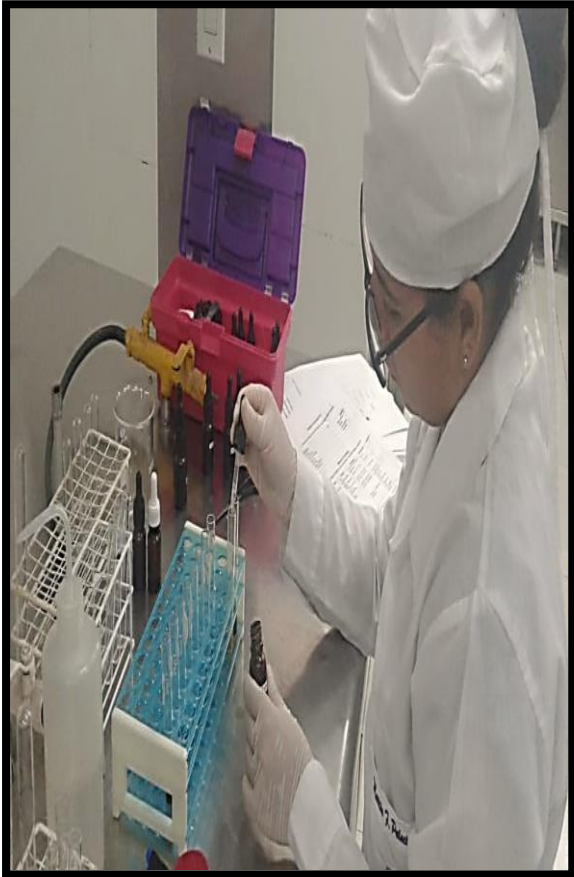


FOTO N°6: Cromatografía en capa fina del extracto hidroalcohólico de *Camellia sinensis* L

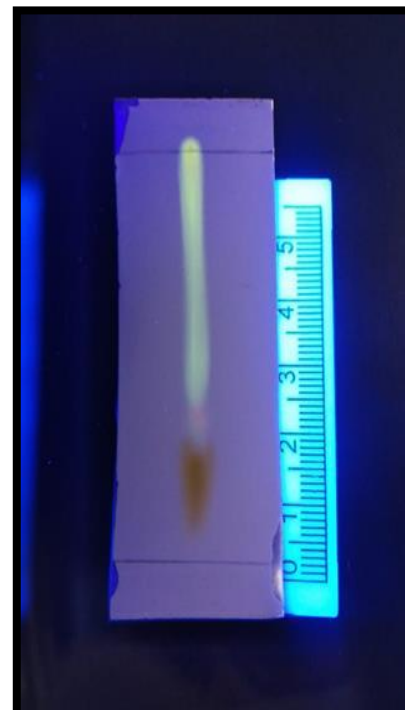
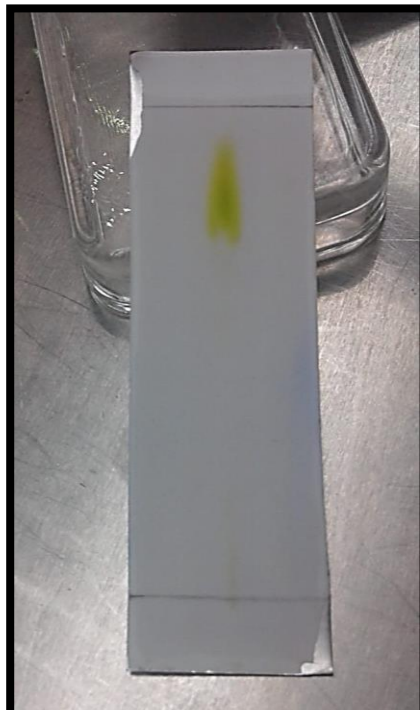
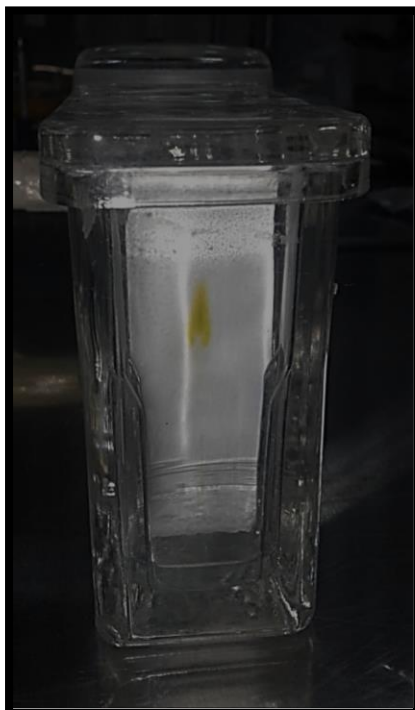


FOTO N° 7: Preparación del estándar (0,5 mc. farland) para el inóculo



TUBO	Cl ₂ Ba 1%	SO ₄ H ₂ 1%	u.f.c/ml
1	0,1	9,9	3,0x10 ⁸
2	0,2	9,8	6,0x10 ⁸
3	0,3	9,7	9,0x10 ⁸
4	0,4	9,6	1,2x10 ⁹
5	0,5	9,5	1,5x10 ⁹
6	0,6	9,4	1,8x10 ⁹
7	0,7	9,3	2,1x10 ⁹
8	0,8	9,2	2,4x10 ⁹
9	0,9	9,1	2,7x10 ⁹
10	1,0	9,0	3,0x10 ⁹

FOTO N°8: Preparación del agar sangre



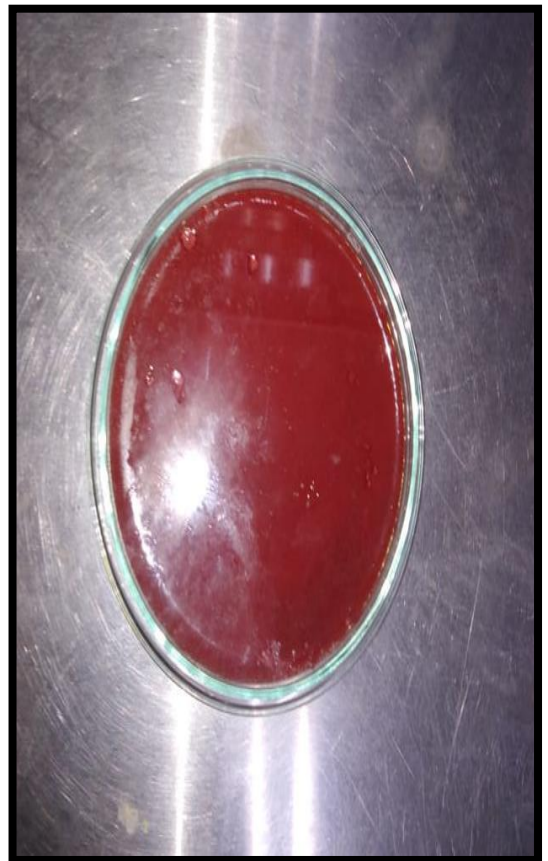


FOTO N°9: Siembra de la cepa *Cutibacterium acnes* y Aplicación de los discos



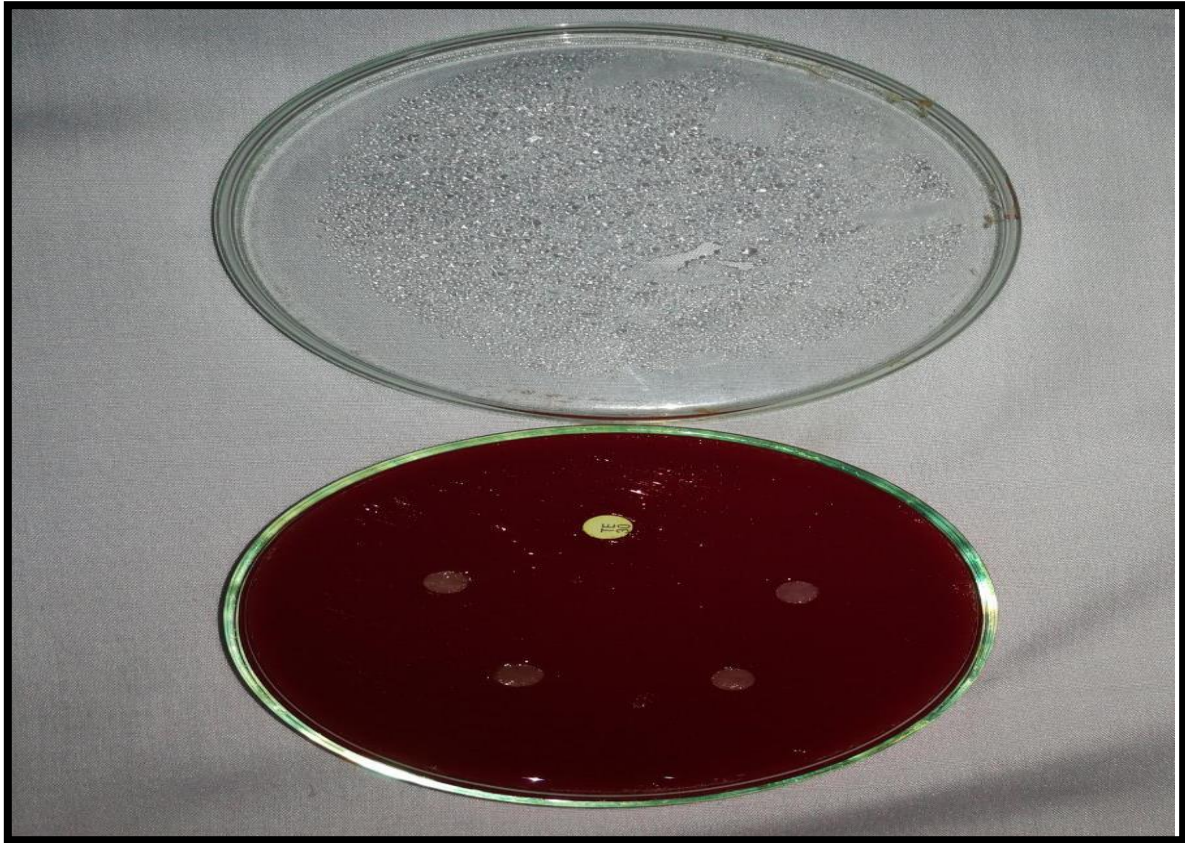
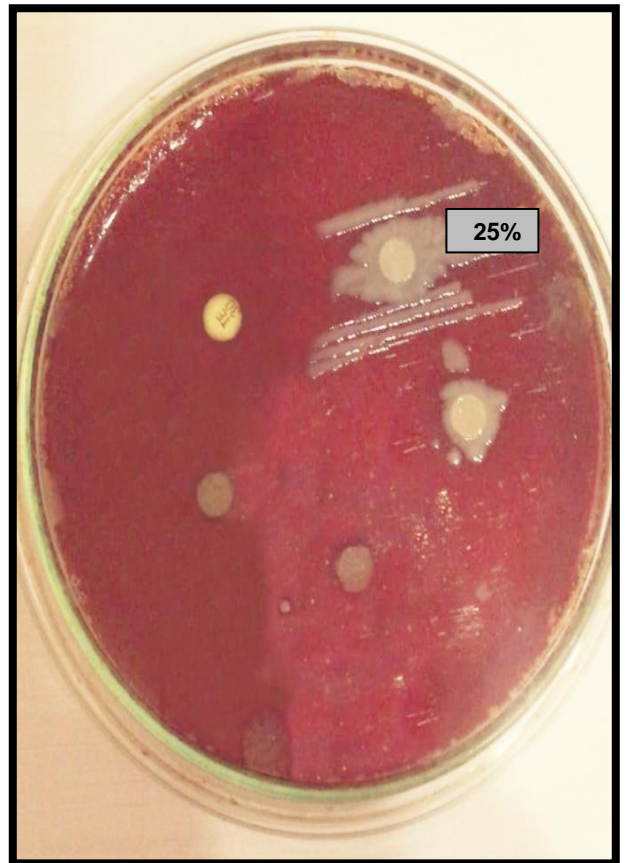


FOTO N°10: Incubación



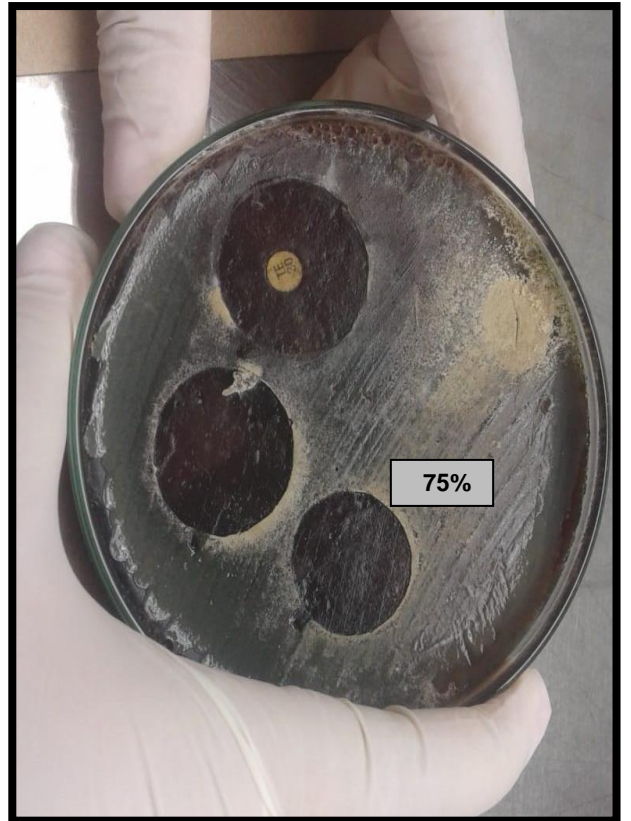
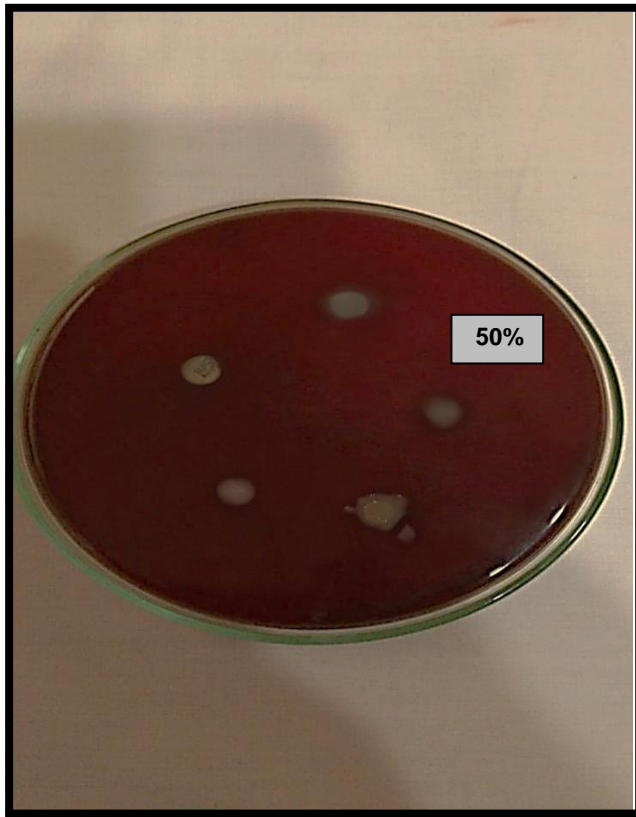


FOTO N° 11: Medición de los halos de inhibición por efecto del extracto etanólico de *Camellia sinensis* L.

