

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA
“Nuevos tiempos. Nuevas ideas”



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE VAINA
DE *Caesalpinia spinosa* (tara) EN CULTIVOS DE *Escherichia coli*
ESTUDIO IN VITRO**

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

TESISTAS:

Bach: MEDINA LAYMITO ROXANA ELIZABETH

Bach: PALOMINO GONZALES ANA MILI

ASESOR: Dr. Q.F. HÉCTOR VILCHEZ CÁCEDA

LIMA – PERÚ

2019

TÍTULO DEL PROYECTO

EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE VAINA DE *Caesalpiniaspinosa*(tara) EN CULTIVOS DE ESCHERICHIA COLI ESTUDIO IN VITRO.

DEDICATORIA

A Dios nuestro señor, por darnos salud y fortaleza. Por encaminar nuestros pasos por el camino del bien en todo este proceso de formación profesional, por ayudarnos a superar los retos de cada día.

A nuestra familia por ser el pilar de nuestra vida, por el amor incondicional y comprensión, por las enseñanzas y consejos brindados a lo largo de esta etapa, por la motivación constante.

Ana y Roxana

AGRADECIMIENTO

A nuestra alma mater, la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica por su gran formación académica y profesional.

A todos los asesores que contribuyeron en nuestra investigación por su tiempo y dedicación, asesoramiento, consejos, orientación y apoyo con el cual fue posible el desarrollo de ésta tesis.

A nuestros docentes por transmitirnos sus conocimientos, enseñanzas y experiencias a lo largo de nuestra formación profesional.

Ana y Roxana

RESUMEN

El objetivo de investigación se fue determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de la vaina de *Caesalpiniaspinosa* (Tara) en cultivos de *Escherichia coli* estudio in vitro.

Para lo cual se preparó un extracto etanólico con las vainas de Tara, el cual se llevó a un proceso de tamizaje fitoquímico para comprobar la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, antocianinas, etc.

Para el desarrollo de la evaluación microbiológica se utilizó el método de difusión en disco en el cual se utilizó el extracto etanólico de las vainas de *Caesalpiniaspinosa*, posteriormente se evaluó el efecto inhibitorio mediante la medida de halos de inhibición generada por el extracto hidroalcohólico al 20%, 40% y 60% frente a cepas de *Escherichia coli*, comparado con Ciprofloxacino como control positivo con el medicamento.

En conclusión, el extracto etanólico de las vainas de *Caesalpiniaspinosa* presenta efecto antibacteriano, a una concentración de 22% que llegó hasta las concentraciones de 40% y 60% sobre cepas *Escherichia coli*.

Asimismo, se determinó la presencia de metabolitos bioactivos cuya acción antibacteriana se relaciona con los flavonoides, alcaloides y Compuestos fenólicos.

Palabras clave: *Caesalpinia spinosa*, efecto antibacteriano, *Escherichia coli*, extracto etanólico.

ABSTRACT

The research objective was to determine the antibacterial effect of the ethanol extract of the *Caesalpinia spinosa* (Tara) pod in *Escherichia coli* cultures in vitro study.

For which an ethanolic extract was prepared with the Tara pods, which was carried out in a phytochemical screening process to verify the presence of secondary metabolites such as flavonoids, anthocyanins, etc.

For the development of the microbiological evaluation, the disk diffusion method was used in which the ethanolic extract of the *Caesalpinia spinosa* pods was used, subsequently the inhibitory effect was evaluated by measuring inhibition halos generated by the hydroalcoholic extract at 20 %, 40% and 60% against *Escherichia coli* strains, compared with Ciprofloxacin as a positive control with the drug.

In conclusion, the ethanolic extract of the pods of *Caesalpinia spinosa* has an antibacterial effect, at a concentration of 22% that reached concentrations of 40% and 60% on *Escherichia coli* strains.

Likewise, the presence of bioactive metabolites whose antibacterial action is related to flavonoids, alkaloids and phenolic compounds was determined.

Keywords: *Caesalpinia spinosa*, antibacterial effect, *Escherichia coli*, ethanolic extract.

INTRODUCCIÓN

La medicina alternativa es considerada la aplicación de especies medicinales para el alivio de dolencias y tratamiento de ciertas enfermedades. Dentro de su flora el Perú cuenta con especies vegetales variadas con propiedades muy variadas con propiedades medicinales, las cuales no se han difundido debido al escaso conocimiento científico que se tiene en ellas y al poco apoyo que se brinda a la investigación de éstas. Las propiedades medicinales de las plantas solo pueden explicarse por la existencia en ellas de determinados compuestos químicos, que son los llamados principios activos, estas varían desde el punto de vista de su naturaleza química, como también del órgano vegetal en que radica su existencia.

La presente investigación establece la validación farmacológica del uso etnomedicinal de las vainas de la especie *Caesalpineia spinosa* denominada comúnmente taya o tara como agente antibacteriano, dado que el nuestro País se utiliza como alternativa en el tratamiento de diversas enfermedades por sus propiedades medicinales.

Se ha determinado que el uso como sorbetorios por la nariz, da buenos resultados cuando hay sinusitis. El principal constituyente del fruto de *Caesalpineia spinosa* es el tanino, contiene 42.2% de mesocarpo es muy rico en proteínas.

La tara es producida en varias zonas del país, la vaina separada de la pepa se muele y es un extraordinario producto de exportación como materia prima para la obtención del ácido tánico muy usado en las industrias paletteras de alta calidad, farmacéutica, química, entre otros. De las semillas o pepas se obtiene, mediante un proceso térmico mecánico una goma de uso alimenticio proveniente del endospermo, constituyéndose en una alternativa a las gomas tradicionales en la industria mundial de los alimentos, pinturas, entre otros. Esta goma ha sido aprobada en la comunidad europea, para ser usada como espesante y estabilizador de alimentos para el consumo humano.

La tara además es utilizada en la protección de suelos, especialmente cuando no se dispone de agua de riego, a fin de dar buena protección a muchas tierras que hoy estarían en proceso de erosión y con fines comerciales.

La relación existente entre los ciclos de vida de las plantas, y el contenido de metabolitos secundarios presentes en las mismas, así como la necesidad de conocer

en que fechas pueden recolectarse los diferentes órganos de cada especie, y en particular, las semillas son importantes para los estudios de plantas medicinales. Los productos naturales juegan un rol significativo en el descubrimiento de drogas, especialmente aquellas que actúan en contra de enfermedades infecciosas, los componentes naturales de estos poseen una alta diversidad y compleja estructura molecular comparada con pequeñas moléculas sintéticas utilizadas actualmente en la medicina.

Así mismo en el estudio se utilizó una cepa, *Escherichia coli* es el causante principal de la colitis hemorrágica, aunque otros serotipos de *E. coli* y *Shigella* sp. Pueden producir verotoxinas y desencadenar patologías graves en el hombre debido a la ingesta de agua y alimentos contaminados. *Escherichia coli* puede ser causa de enfermedad endógena en pacientes debilitados o en situación de alteración de la pared intestinal, pero las infecciones entéricas provocadas por este germen no son causadas por las cepas que habitan normalmente el intestino, sino por líneas especialmente patógenas que se transmiten por vía fecal oral de persona a persona o a través de la ingesta de agua y alimentos contaminados.

La resistencia bacteriana a los antibióticos, aunque no es un problema reciente, si es preocupante, en la actualidad, mientras que el número de nuevos fármacos, vacunas y otras tecnologías para combatirlas no aumentan.

En el Perú hay pocos estudios sobre el uso de los productos naturales, en el caso de la Tara sus usos comerciales están fuera del campo de la salud, siendo mayormente utilizados en la industria del calzado para curtir y volver impermeable el cuero. En la industria de los alimentos son utilizados como preservantes y antioxidantes tanto como en la industria cervecera y vinos, mas no existen estudios farmacológicos de ésta especie.

“Se postula que la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las de las vainas de *Caesalpinia spinosa*(tara) está relacionado con la presencia de metabolitos secundarios, como flavonoides, compuestos fenólicos y alcaloides dentro de su composición fitoquímica”.

ÍNDICE

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	11
1.1. Descripción de la realidad problemática	11
1.2. Identificación y formulación del problema	13
1.2.1. <i>Problema general.</i>	13
1.2.2. <i>Problemas específicos.</i>	13
1.3. Objetivos de la investigación.	13
1.3.1. <i>Objetivo general.</i>	13
1.3.2. <i>Objetivos específicos.</i>	14
1.4. Justificación y viabilidad de la investigación.	14
1.5. Delimitación de la investigación.....	15
1.6. Limitaciones de la investigación.	15
CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO	17
2.1. Antecedentes de la investigación.	17
2.1.1. Antecedentes Nacionales.....	17
2.1.2. Antecedentes Internacionales	Error! Bookmark not defined.
2.2. Bases teóricas	28
2.3. Formulación de hipótesis	Error! Bookmark not defined. 4
2.3.1. Hipótesis general.....	36
2.3.2. Hipótesis específicas.....	36
2.4. Operacionalización de variables e indicadores.....	37
2.4.1. Variables dependientes.	37
2.4.2. Variable independiente.....	37
2.4.3. Indicadores.....	37
2.5. Definición de términos básicos.	38

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA.....	40
3.1. Tipo de investigación.	40
3.2. Diseño de la investigación.	40
3.3. Población y muestra de la investigación.	40
3.3.1 Población.....	40
3.3.2 Muestra.....	40
3.3.3 Material Biológico.	41
3.3.4 Muestra.....	41
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.	41
3.5. Técnicas para el procesamiento de datos.	43
CAPÍTULO IV: Presentacion y analisis de resultados Error! Bookmark not defined.	
4.1. Presentacion de resultados	45
4.2. Contrastacion de hipotesis.....	55
4.3. Discusion de resultados.	64
CAPÍTULO V:Conclusiones y recomendaciones.... Error! Bookmark not defined.	
5.1. Conclusiones	65
5.2. Recomendaciones.	66
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	72
Matriz de consistencia.....	72

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la realidad problemática.

Las plantas medicinales han constituido desde tiempos remotos un recurso de gran importancia para cubrir las necesidades terapéuticas. Su uso como agentes de la salud es ampliamente conocido en múltiples culturas del mundo y ha sido transmitido a través de generaciones.

La especie vegetal Tara es utilizada tradicionalmente desde tiempos remotos como antiinflamatorio y antibacteriano, desintoxicante u otros usos terapéuticos que han tenido relevancia con el paso de los años. Se han realizado estudios sobre la efectividad de en las mencionadas actividades terapéuticas, pero uno de los principales problemas es no tener información acerca de que parte o partes de la planta presentan los metabolitos activos y/o el mecanismo por el cual realizan el efecto deseado, siendo este un motivo para que se use la las vainas de tara para obtener la efectividad comprobada en el tratamiento de estas afecciones o enfermedades. Aproximadamente el 85% de adultos y jóvenes a nivel mundial lo padecen. Esta enfermedad de proceso Bacterianos y esta puede ser mortal, pero puede causar una significativa morbilidad, sus principales causas son Incremento Bacteriano. El uso más conocido y tradicional de esta especie vegetal es precisamente combatir el proceso de Infección. A pesar de los estudios e investigaciones de las drogas comercializadas de vainas de Tara.

1.2. Formulación del problema.

1.2.1. Problema general.

¿El extracto etanólico de vaina de *Caesalpinia spinosa*(tara) presenta efecto antibacteriano en cultivos de *Escherichia coli* en estudio in vitro?

1.2.2. Problemas específicos.

- ¿Los componentes presentes en el extracto etanólico de vaina de *Caesalpinia spinosa*(tara) tendrá estructura química de naturaleza antibacteriana?
- ¿Los componentes del extracto etanólico de vaina de *Caesalpinia spinosa*(tara)tendrán actividad en cultivos de *Escherichia Coli*?

1.3. Objetivos.

1.3.1. Objetivo general.

Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de vaina de *Caesalpiniaspinosa*(tara) en cultivos de *Escherichia coli* estudio in vitro.

1.3.2. Objetivos específicos.

- Obtener el extracto etanólico de vaina de *Caesalpinia spinosa* (tara) y determinar la estructura química de algunos componentes.
- Evaluar la actividad antimicrobiana de los componentes del extracto etanólico de vaina de *Caesalpiniaspinosa*(tara)frente a *Escherichia Coli*.

1.4. Justificación e importancia de la investigación.

Teórico, el estudio se orienta a aportar nuevos conocimientos sobre la composición química de la vaina de *Caesalpiniaspinosa*(tara) que se tiene a partir de la descripción y explicación que ofrecen evidencias científicas que permiten justificar el empleo de esta especie en la actividad antimicrobiana.

Práctico, la investigación *Caesalpiniaspinosa*(tara) sus resultados ofrece aportes como algunos metabolitos secundarios que son benéficos para la salud humana. El conocimiento de la composición química de vaina como la evaluación de la actividad antimicrobiana, permitirá emplearlo en la composición de medicamentos que se reflejarán en beneficio de la población, proponiendo una alternativa para el tratamiento y prevención de enfermedades e infecciones. Asimismo esto permitirá desarrollar mejor su producción y comercialización

Metodológico, El diseño metodológico empleado en el estudio, servirá de fuente referencial, para quienes en adelante quieran investigar en temas similares al propuesto, así como también el trabajo de investigación en su desarrollo ha permitido contrastar técnicas y procedimientos, que pueden mejorarse para investigaciones futuras

1.5. Delimitación de la investigación.

1.5.1 Delimitaciones Geográficas.

Esta Investigación se desarrolla en Lima - Perú y cuya parte experimental se desarrolló en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega con el apoyo de docentes expertos en el área.

1.5.2 Delimitaciones Temporales.

La investigación se desarrolló en un tiempo estimado de 3 meses ,el periodo de trabajo fue de octubre a diciembre del 2017.

1.6. Limitaciones de la investigación.

1.6.1 Limitación Interna.

La presente investigación limita sus resultados en la medida que los datos obtenidos son válidos sólo para la muestra en estudio no pudiendo extenderse a otras muestras similares sin el control de las variables del presente proyecto de investigación.

1.6.2 Limitación externa.

Disponibilidad presupuestaria y la obtención de recursos económicos para la ejecución de la parte experimental y otros recursos materiales, disponibilidad de tiempo para buscar datos y búsqueda de información a costo de los investigadores.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio.

2.1.1 Antecedentes Nacionales

Huarillo M (2011); Identificar el efecto antibacteriano del extracto alcohólico de la *C. spinosa*“tara” a la concentración de 6.25 mg/ml sobre flora bacteriana mixta salival. Comprobar el efecto antibacteriano del extracto alcohólico de la *C. spinosa* “tara” a la concentración de 12.5 mg/ml sobre flora bacteriana mixta salival. Evaluar el efecto antibacteriano del extracto alcohólico de la *C. spinosa*“tara” a la concentración de 25 mg/ml sobre flora bacteriana mixta salival. Identificar el efecto antibacteriano del extracto alcohólico de la *C. spinosa*“tara” a la concentración de 50 mg/ml sobre flora bacteriana mixta salival. Comprobar el efecto antibacteriano del extracto alcohólico de la *C. spinosa*“tara” a la concentración de 75 mg/ml sobre flora bacteriana mixta salival. Comparar los resultados obtenidos por medición de halos de inhibición generados por el extracto alcohólico de la *C. spinosa*“tara” en diferentes concentraciones sobre flora bacteriana mixta salival, Se usaron vainas de *C. spinosa* previamente procesadas. Colectadas las vainas de tara, estas fueron limpiadas y desinfectadas con cloro al 1%. Una vez desinfectadas las vainas de *Caesalpinia spinosa*(tara) se procedió a colocarlas en un cuarto de secado por 48 horas para que este libre de humedad. Luego se procedió a separar las semillas de las vainas de *C. spinosa* colocándolas en un mortero para su pulverizado. Se pesaron 50 gr. de polvo de las vainas de *C. spinosa*, se colocaron en un frasco de vidrio de color ámbar y se le agregó 200 ml de alcohol 70o, dejándose macerar por 1 semana, agitándolo todos los días. Al 4to día se agregó 100 ml más de alcohol 70o y se siguió todos los días. Al 4to día se agregó 100 ml más de alcohol 70o y se siguió Agitando hasta completar la semana, En nuestro país desde épocas remotas y ancestrales se han utilizado, con fines terapéuticos, las diversas plantas medicinales que se cultivan en nuestro ámbito territorial. En estudios realizados con drogas

vegetales para comprobar una eventual actividad antibacteriana, se emplea métodos de difusión en agar con discos o métodos de diluciones en caldo o en agar. El método de difusión en agar consiste en impregnar discos de papel de filtro Whatmann N° 1 de 6 mm de diámetro con el extracto vegetal, se aplican los discos sobre la siembra de la muestra y se incuba a 37° C por 24 horas. Al realizar la coloración Gram de los microorganismos que crecieron alrededor del halo se puede observar que estos pertenecían al grupo de bacterias Gram negativos. Al hacer la lectura, en caso de actividad, se observa halos de inhibición que se miden con un calibrador. El efecto antibacteriano se consideró en función al diámetro de los halos de inhibición del crecimiento del microorganismo: nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm; sensibilidad límite (sensible = +) de 9 a 14 mm; media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm y sumamente sensible (S.S. = +++) si fue igual o superior a 20 mm.

Montenegro A (2014); La periodontitis es una enfermedad de etiología infecciosa que presenta como síntomas el sangrado e inflamación de encías, movilidad dentaria, recesiones gingivales, en las que diversas enfermedades sistémicas favorecen su progresión. Uno de estos agentes más importantes es *Porphyromonas gingivalis*, especie bacteriana anaeróbica estricta, Gram negativo. A su vez, el uso de antibióticos sistémicos está indicado sólo en ciertos tipos de periodontitis, y no siempre el tratamiento es exitoso. Hoy en día, tanto en medicina general como odontológica, se está investigando nuevas alternativas de tratamientos antibacterianos, dado el continuo aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales y por las reacciones adversas que estos producen en algunos pacientes.

El objetivo principal de este trabajo de investigación es determinar la actividad antibacteriana de un extracto alcohólico de *Caesalpinia spinosa* "tara" sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis*. Este estudio es de tipo experimental, prospectivo, comparativo e *in vitro*. Se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la UNMSM.

Para realizar este estudio se utilizó cepas de *Porphyromonasgingivalis* previamente identificadas por los laboratorios MICROBIOLOGIC, las cuales fueron importadas a través de una Casa Comercial "GENLAB".

El estudio investigó la actividad antibacteriana, del extracto alcohólico de *Caesalpiniaspinosa* "tara" en cinco concentraciones (6,25 mg/ml; 12,5 mg/ml; 25 mg/ml; 50 mg/ml y 75 mg/ml) sobre la cepa ATCC 33277 *Porphyromonas6 gingivalis* mediante el test de difusión en Agar, se encontró que el extracto alcohólico de la *Caesalpiniaspinosa* (tara) posee actividad antibacteriana sobre *Porphyromonasgingivalis*, aunque entre las cinco concentraciones no existe diferencia significativa.

Ale D (2012); La tara (*Caesalpiniaspinosa*) fruto en vainas delgas con pepas, esta materia prima en su cascara contiene un alto contenido de taninos por lo que esta investigación estudió los factores que afectan en la etapa de extracción para la concentración de taninos (Ácido Gálico) a partir de la cascara de tara en polvo. Se determinó por análisis espectrofotométrico con rhodanine que comparando tres solventes (Acetona, etanol y metanol) para el proceso de lixiviación, el etanol provoca una mayor extracción de taninos hidrolizables, mientras que los otro dos es menor su eficiencia para la extracción. De acuerdo al criterio de mejorar el rendimiento en la extracción de taninos hidrolizables, utilizando tara en polvo como materia prima, se determinó utilizar cuatro variables de estudios como es la relación materia prima/solvente la cual afecta de forma directa en el rendimiento de la extracción de los taninos, siguiendo a este el factor solvente el cual está formado por la relación de etanol/agua y posteriormente los factores tiempo y temperatura. Para la etapa de optimización del rendimiento de la extracción se usó el método Superficie Respuesta utilizando el Diseño Compuesto Central Rotable, obteniéndose un concentrado con un máximo rendimiento de taninos hidrolizables de tara de 80.30 % bajo las siguientes condiciones de las variables de estudio: factor relación Materia Prima / Solvente con 2.5699gr/100 ml., factor Solvente con 99.9% de etanol, factor Tiempo con 29.5 minutos y el factor Temperatura con 40°C.

Palabras Clave: Tara; Taninos; hidrolizable; lixiviación; espectrofotométrico; concentración.

Centurión K (2015); El objetivo del presente estudio fue determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de *CaesalpiniaSpinosa*(Tara) sobre *Streptococcusmutans*ATCC 35668. La muestra estuvo conformada por 64 observaciones, distribuidas en 4 grupos de 4 placas Petri cada uno, en cada placa se colocó el porcentaje de concentración de estudio, frente a tres controles: control positivo (Clorhexidina al 0.12%), control negativo (Etanol) y un porcentaje de concentración similar (para comparación). Los resultados mostraron que la concentración al 30% del extracto etanólico de *Caesalpinia* mostró el mayor halo de inhibición (34.5 mm) y concentración mínima inhibitoria. La presente investigación concluye que el extracto etanólico de *CaesalpiniaSpinosa*(Tara) posee efecto antibacteriano *in vitro* sobre el *Streptococcusmutans*ATCC 35668.

Vargas J (2016); Se analiza la rentabilidad a corto y largo plazo del cultivo de tara nativa en Apurímac, se sostiene la hipótesis que este cultivo tiene una alta rentabilidad tanto a corto como a largo plazo, empleando el método de presupuesto de ingresos y egresos para obtener los beneficios por hectárea a corto plazo así como los indicadores de rentabilidad en el largo plazo.

Dado que la agricultura es una actividad sujeta a riesgos, se emplea un enfoque probabilístico con ayuda del software @Risk. Se concluye que este cultivo tiene una alta rentabilidad tanto a corto como a largo plazo, lo cual explicaría el avance de las siembras de este cultivo en la Región Apurímac.

Abanto M (2016); El resumen de esta Investigación tipo Experimental fue del efecto Antibacteriano *in vitro* del extracto etanolicocaesalpiniaspinosaTara frente a cepas de *estreptococcusMutans*. Se realizó la prueba de susceptibilidad, utilizando el método de

difusión de discos; todas las concentraciones presentaron halo de inhibición y los tamaños aumentaron directamente proporcional a las concentraciones utilizadas. Para hallar la concentración mínima inhibitoria se empleó el método de dilución de tubos, ensayando concentraciones al 40% 60% y 80% del extracto etanolico de *caesalpiniaspinosa* Tara; de cada cultivo se sembró en placas con agar muellerhinton-sangre para determinar las unidades formadores de colonia (UFC).

Los resultados mostraron que la concentración al 80% del extracto etanolico de *caesalpiniaspinosa* Tara presento el mayor tamaño en el halo de inhibición (14.80 mn) y la concentración mínima inhibitoria fue al 40%, se concluye que el extracto etanolico de vainas de *caesalpiniaspinosa* Tara posee actividad antibacteriana in vitro sobre el crecimiento de cepas *Streptococcusmutans*.

Aybar J et al (2016); *Caesalpiniaspinosa* “tara” es un recurso natural nativo del Perú usado en la industria alimentaria, ampliamente utilizado en medicina popular por sus propiedades antiinflamatorias y antimicrobianas. En tal sentido, la presente investigación tuvo por objetivo determinar el efecto citotóxico del extracto acuoso del pericarpio de *C. spinosa* en células meristemáticas de *Allium cepa* con el propósito de verificar y explicar su propiedad curativa difundida en medicina popular. Para el efecto, se expusieron bulbos enraizados de *A. cepa* a 10 tratamientos obtenidos de la combinación de las concentraciones 0%, 0.42%, 0,83%, 1.25% y 1.67% del extracto acuoso y 8 y 24 horas de exposición en un diseño anidado completamente al azar. Se obtuvieron los preparados citológicos y se realizó el recuento de aproximadamente 3000 células, determinando luego, el Índice Mitótico (IM) y de Fases (IF), cuyos datos fueron procesados mediante análisis de varianza y comparación de medias. Los resultados mostraron diferencias significativas entre los tratamientos que disminuyen el IM en función al incremento de las concentraciones y tiempo de exposición, siendo el tratamiento de 0,42% durante 8 horas el que generó un IM menor respecto al control. Estas observaciones posiblemente se deban a compuestos tánicos con propiedades inhibitorias de las moléculas que intervienen y regulan el ciclo celular. Por tanto, el

extracto acuoso del pericarpio de *C. spinosa* disminuye el Índice Mitótico en células meristemáticas de *A. cepa*, a las concentraciones y tiempos ensayados.

López A et al (2015); El Perú es el principal abastecedor de “tara”, gracias a que nuestro país posee una gran variedad de climas y tipos de suelos, haciendo posible la obtención de este cultivo durante la mayor parte del año. El departamento de Junín cuenta con poblaciones naturales de “tara” que aun no han sido caracterizadas bioquímica ni genéticamente, que podrían aprovecharse en beneficio de las comunidades locales. En este trabajo se reporta la capacidad antioxidante de “tara” provenientes de las localidades de Picoy y Santa Fe, ambas ubicadas en Tarma, Junín. Se utilizó la técnica del DPPH y del ABTS para valorar la capacidad antioxidante; para la determinación de fenoles y flavonoides se utilizó el reactivo de Folin-Ciocalteu según la técnica de Singleton. La muestra de Picoy reportó mayor cantidad de fenoles siendo de 563.70 mg/g de extracto seco, mientras que la cantidad de flavonoides fue de 0.664 mg/g. La capacidad antioxidante mostro una mejor respuesta en la muestra de Picoy, reportándose mediante el DPPH un IC50 1.244 mg/ml y con el ABTS un 35.3% de inhibición. Estos datos podrían aprovecharse para incrementar el valor agregado y mejorar la oferta de este recurso en dicha localidad debido a sus mejores características antioxidantes.

2.1.2 Antecedentes Internacionales

Mendoza R (2015); La semilla es el medio principal para la generación de la mayoría de las especies. Se realizó el trabajo de investigación ya mencionado esto con la finalidad de encontrar el tratamiento pre germinativo y el sustrato más conveniente para una mejor y rápida germinación de la semilla (*Caesalpiniaspinosa*(Molina) Kuntze). Por lo tanto el presente estudio tiene por objetivo principal el evaluar el comportamiento germinativo de la semilla de la Tara, bajo dos tratamientos uno que es el de la escarificación y el otro el remojo en agua hirviendo por dos minutos. También se evaluó que nivel de sustrato es el más adecuado para una mejor germinación Fue entonces

así que se empezó la investigación tomando como parámetros el porcentaje de emergencia, porcentaje de germinación, altura de la planta, diámetro al cuello de la raíz y la caracterización de los usos actuales de la especie (*Caesalpiniaspinosa*(Molina) Kuntze). Se pudo observar que las semillas sometidas al tratamiento de escarificación obtuvieron buenos resultados en la prueba de germinación que el tratamiento de remojo en agua por dos minutos. En cuanto al tipo de sustrato que dio buenos resultados, es el sustrato de las proporciones (2: tierra de lugar, 2: humus de lombriz, 2: arena fina), se diría entonces que este es el mejor sustrato. En la actualidad la tara es una especie multiuso, como ornamental, plaguicida, medicinal, industrial y muchas otras más; entre lo más sobresaliente es el contenido del tanino en las semillas, útil para el curtido de cuero, lo que hace que se convierta en una especie muy importante para aportar en el crecimiento económico de una región.

Núñez E (2017);En Ecuador no se dispone de técnicas de propagación de plantas a nivel comercial que permitan establecer bancos clonales de árboles plus de *Caesalpiniaspinosa* (Mol.) O. Kuntz (guarango), lo cual limita el desarrollo de protocolos de propagación *in vitro* de esta especie. El objetivo del presente trabajo fue establecer un banco clonal de *C. spinosa* mediante la selección de árboles plus e injerto. Se seleccionaron árboles plus de guarango perteneciente a la provincia de Chimborazo, cantón Guano, en base a la altura total, altura al comienzo de la copa, altura de copa, superficie de copa, simetría de copa, floración, producción de frutos y contenido de taninos en la vaina. Las plantas patrones para realizar los injertos se obtuvieron a partir de semillas escarificadas, remojadas durante 48 horas a temperatura ambiente y sembradas en camas de 1.0 x 3.0 m. A los 40 días, las plántulas fueron trasplantadas a bolsas y a los 16 meses se realizaron los injertos en las plantas patrones. Se utilizaron tres tipos de injerto (hendidura simple en el patrón, hendidura simple en la púa y escudete). Por cada uno se usaron 100 patrones. De ocho árboles plus colectados en campo se seleccionó el ecotipo CHSt03 para realizar los injertos, pues fue quien mayor altura total (6.6m), altura al comienzo de la copa (2.2m), superficie de copa (>70%), volumen de copa (>10%), simetría de copa (1), Frutos (40kg/árbol) y contenido de polifenoles totales en vainas (5870 $\mu\text{gEAGgMS}^{-1}$) mostró. El injerto

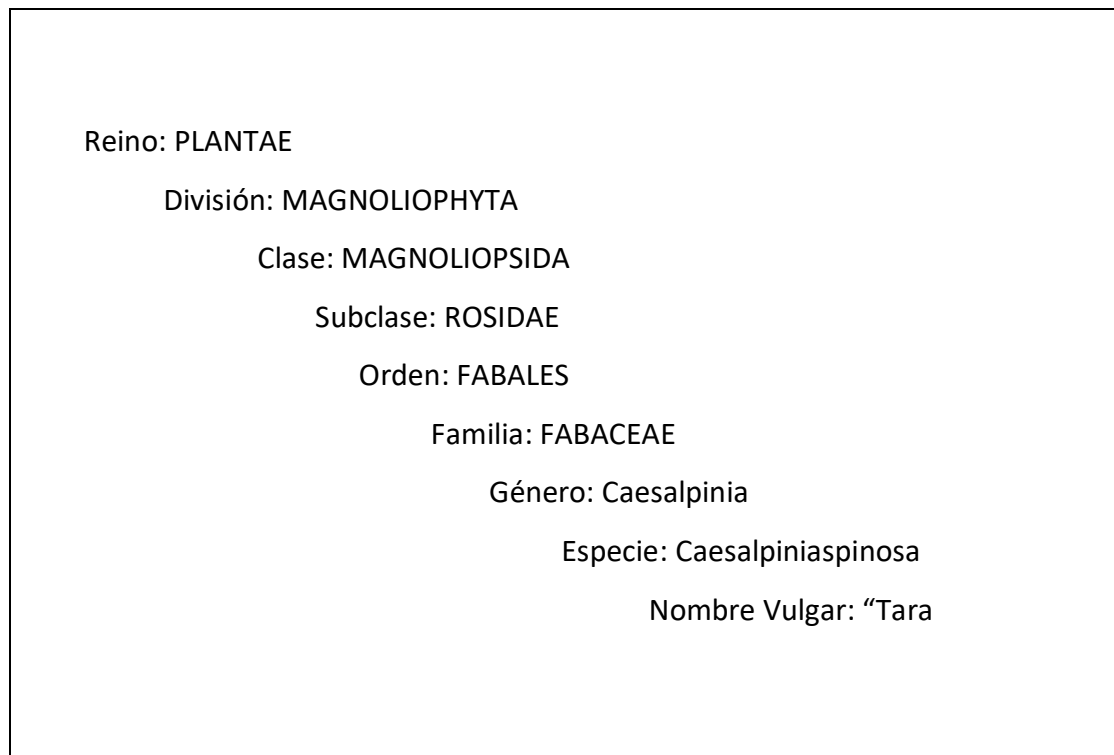
mediante hendidura simple en el patrón tuvo el mayor porcentaje de prendimiento (80%). Estos resultados permitieron establecer un banco clonal de 80 plantas injertadas de *C. spinosa* del ecotipo CHSt03, lo cual sienta las bases para desarrollar protocolos de propagación *in vitro* de esta especie forestal, nativa de Ecuador.

Fernández A (2008); La presente investigación tuvo por objetivo la obtención de un extracto de vaina de tara (*Caesalpiniaspinosa*) mediante la aplicación de la técnica de extracción supercrítica con CO₂ como solvente y usando etanol como modificador, de tal manera de evaluar este extracto como antioxidante en aceites sometidos a una degradación termooxidativa. El extracto obtenido surgió luego de probar diversas presiones entre 350 y 550 bar frente a una temperatura constante de 40°C y evaluando el pre tratamiento de desgomado a la vaina molida. El contenido de polifenoles del extracto supercrítico de vaina de tara (ESVT) se determinó espectrofotométricamente por el método de Folin-Ciocalteu; encontrándose, para los experimentos sin desgomado, valores entre 291 y 3408 ug equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de tara seca sin desgomar, observándose una mayor riqueza de estos compuestos en los experimentos realizados a mayor presión; en tanto, en los experimentos con vaina desgomada, se obtuvo 447 y 601 ug EAG/g de tara seca sin desgomar, a 500 y 550 bar, respectivamente. La menor concentración polifenólica en estos últimos, se fundamentó por posibles pérdidas en el pre tratamiento de desgomado. Además el ESVT se caracterizó y cuantificó mediante HPLC-DAD, encontrándose 109,43 mg EAG/kg de tara desgomada, correspondientes a 26 compuestos, todos derivados de ácido gálico. Respecto al ensayo DPPH, se obtuvo un valor de CE₅₀ = 0,83 ug EAG/ml de ESVT, el cual es considerablemente más alto al encontrado en extractos polifenólicos de otros estudio en el estudio Rancimat se observó que el ESVT ejerció un efecto antioxidante significativo en los aceites purificados (girasol, AGP; girasol alto oleico, AGAOP); en los aceites sin purificar (AG y AGAO) este fue de menor magnitud, debido principalmente a la naturaleza rica en tocoferoles naturales de las matrices lipídicas estudiadas. En el estudio de estabilidad efectuado sobre AGAO a 60 y a 80°C, se observó un menor deterioro en las muestras adicionadas de 400 ppm EAG de ESVT

en relación al control, lo que se reflejó en menores índices de peróxidos en el tiempo de almacenamiento.

2.2. Bases teóricas.

Taxonomía de Tara



2.2.1 Especie Botánica

Caesalpiniaspinosa (Molina) Kuntze Familia botánica: *Cesalpinaceae* Etimología: *Caesalpinia*, en honor a de Andrea Caesalpini (1524-1603), botánico y filósofo italiano; *spinosa*, del latín *spinosus-a-um*, con espinas. En el Perú, además de la *C. Spinosa* encontramos otras seis especies : *C. Ancashiana*, *C.Ulibarr*, *C.*

cassaoides Willd, C. decapetala (Roth) Alston, C. glabrata Kunth, C. Pulcherrima, (L.) Swartz y C. Trichocarpa Griseb⁵. Biotipos: en la Región Ayacucho se han descrito varios biotipos diferenciados los que se denominan: Morocha, Roja Ayacuchana, Almidón Corriente, Almidón Gigante, Precoz, Verde Esmeralda⁶. Así mismo, se menciona tres variedades comerciales: Cultivar Moroco, Cultivar Almidón y Cultivar Premium con las características siguientes: el primero, se encuentra en la zona norte, se caracteriza por su gran tamaño pero con bajo contenido de tanino; el segundo se encuentra en la zona sur con mayor nivel de tanino; y el tercero, es una variedad obtenida a partir de una selección masal y multiplicación vía biotecnología o multiplicación clonal. Aunque se indica los términos bajo y alto contenido de taninos no se señalan valores de referencia, por otro lado se señala que se está propiciando en los campos la aplicación de material genético tipo Premium que tendría alto contenido de tanino y goma

2.2.2 Nombres Comunes

Tara, taya (Perú), Guarango, Vainillo (Ecuador), Dividive, Dividivi, Guarango (Colombia), Tara (Bolivia, Chile, Venezuela), Acacia, Dividi de los Andes (Europa).

2.2.3 Sinonimias

Ponciana spinosa Molina *Caesalpinia pectinata* Cavanilles *Caesalpinia tara* Ruiz & Pavón *Caesalpinia tinctoria* HBK *Coulteria tinctoria* HBK *Tara spinosa* (Molina) Britton & Rose *Tara tinctoria* Molina

2.2.4 Distribución Geográfica y Habitat

El Perú es el país que tiene mayor área de bosques de tara, con el 80% de la producción mundial, seguido muy de lejos por Bolivia, Colombia, Chile, Ecuador y Venezuela. También es cultivada en el norte y este de África, Estados Unidos,

Brasil y Argentina. En el Perú, se encuentra en los valles interandinos secos entre 1000 y 3100 msnm, los departamentos de mayor producción son Cajamarca (41%), Ayacucho (16%), La Libertad (13%), Huánuco (13%), también se reporta su presencia en Huancavelica, Apurímac y Ancash, habiendo nuevas iniciativas en Ica y Lambayeque. En Lima (provincia de Cañete) ya se está cultivando tara orgánica en un arenal en el kilómetro 150 de la Panamericana Sur y se espera que al 2010 totalicen 320 hectáreas de cultivo. Hábitat: Eco regiones de la costa y la serranía entre los 0-4500 msnm, en bosques secos mayormente a partir de los 1000 msnm, reportada en todos los departamentos del país. Muy usada como cerco vivo, árbol de sombra y árbol ornamental..

Hábitat: Eco regiones de la costa y la serranía entre los 0-4500 msnm, en bosques secos mayormente a partir de los 1000 msnm, reportada en todos los departamentos del país. Muy usada como cerco vivo, árbol de sombra y árbol ornamental.

2.2.5 Descripción Botánica

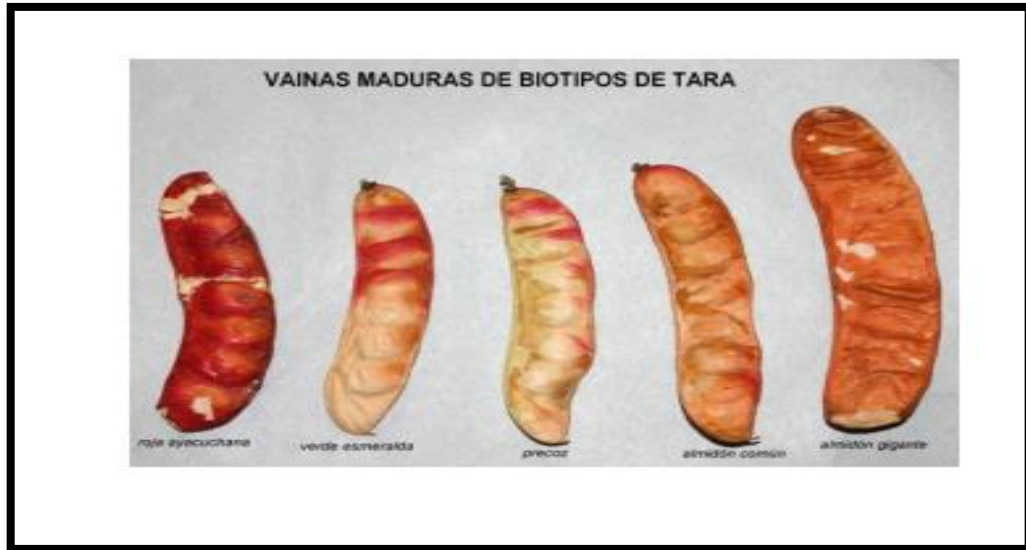
Materia Vegetal, La descripción botánica de una muestra de *Caesalpiniaspinosa* depositada en el Museo de Historia Natural de la UNMSM (MHN 5:282, 1941), proporcionada por la Dra. EleucyPérez. Arbusto: de dos a tres metros de altura de fuste corto, cilíndrico, a veces tortuoso, coloración gris, glabro áspero provisto de aguijones, triangulares aplanados, ramas delgadas pobladas iniciándose casi desde la base, dando la impresión de varios tallos, la parte apical es irregular, con ramitas terminales, con sección circular, de 4-6 cm de diámetro, aparasolada poco densas, glabras y con aguijones dispersos. Hojas: compuestas bipennadas, alternas, dispuestas en espiral, peciolo hasta de 2-3 cm, raquis de 3-5-7 cm de longitud, 2-3 pares de pinnas opuestas, foliolos 7-8 pares opuestos oblongos, el ápice marginado, diminutamente mucronado, base asimétrica, glabra, nervaduras secundarias 7-8 pares.

Flores, hermafroditas, Zigomorfas; cáliz tubular, púber con segmentos obtusos, de 3 mm de longitud, el superior con fibras pectinadas; corola con cinco pétalos libres, amarillos, orbiculares, espatulados o raramente oblongos, estambres, filamentos filosos o glandulares, blancos, anteras rojizas, con dehiscencia longitudinal, pistilo curvado verdoso. Frutos: legumbres rojizas, oblongas, ligeramente comprimidas de 6-11 cm de longitud, indehiscentes de color rosado, con el mesocarpio arenoso, esponjoso, y 9- 12 semillas de unos 1 x 0,5 x 0,3 cm, reniformes, de color marrón pardo con la superficie lustrosa dura, y con uno de los dos lados más grande.

Partes más usadas, Se utilizan los frutos (vainas y semillas); a la fecha las hojas son solamente usadas por la medicina popular. Los Incas supieron aprovechar los colores naturales de plantas y animales y fijarlos en los tejidos de lana y algodón, una de las plantas utilizadas fue la tara con la que lograron tintes que van del negro hasta el amarillo¹⁰, así mismo se reporta en la última década del siglo XIX una investigación titulada “La tara y sus glucósidos” publicada por Barranca (José Sebastián Barranca) quien fuera profesor en la Facultad de Ciencias de la UNMSM entre 1881 y 1905. Por otro lado, se señala que en Colombia la explotación de esta especie ya se hacía a principios del siglo XVII en la ciudad de Tunja por sus principios astringentes y colorantes constituyendo una gran industria de la confección; así mismo las referencias históricas señalan que antes de la invención de los curtientes sintéticos, el dividive, fue por largo tiempo una de las principales fuentes de extractos de tanino con que contó la industria colombiana. Aunque el proceso de utilización de extractos vegetales para el proceso de conversión de las pieles animales en cuero data de al menos 2000 años atrás, el término tanino, proveniente de “tanning” (curtiembre), ha sido acuñado quizás hace poco más de 100 años.

Vainas, Contiene taninos hidrolizables (galotaninos) en un rango de 40% a 60% según las condiciones ecológicas en las que vegeta, la hidrólisis de estos taninos conduce a la separación del ácido gálico; asimismo se han aislado galato de etilo y cuatro galatos del ácido químico correspondiendo a los ésteres metílicos de 4,5-

di-O-galoilquínico y de 3,4,5-tri-O-galoilquínico, y a los ácidos 3,4-di-O-galoilquínico y 3,4,5-tri-O-galoilquínico



Figuras Vainas de Tara

2.2.6. Componentes Químicos

Contiene taninos hidrolizables (galotaninos) en un rango de 40% a 60% según las condiciones ecológicas en las que vegeta, la hidrólisis de estos taninos conduce a la separación del ácido gálico; asimismo se han aislado galato de etilo y cuatro galatos del ácido químico correspondiendo a los ésteres metílicos de 4,5-di-O-galoilquínico y de 3,4,5-tri-O-galoilquínico, y a los ácidos 3,4-di-O-galoilquínico y 3,4,5-tri-O-galoilquínico.

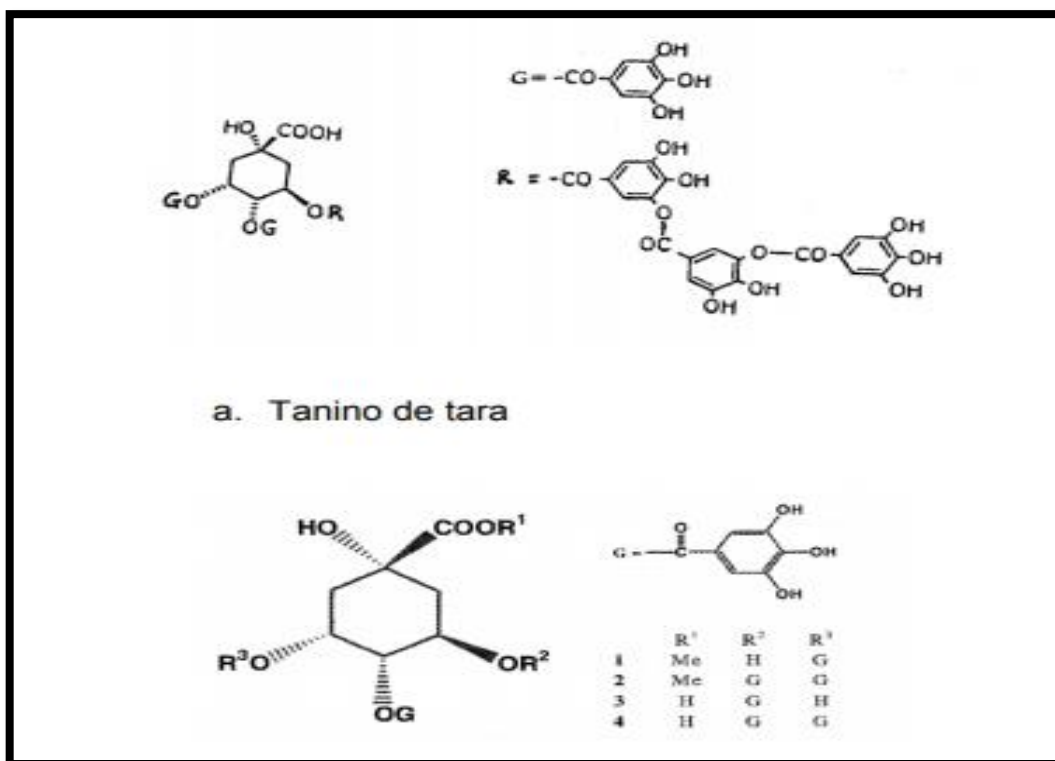


Figura de Tara

Semillas, del endospermo se ha separado la goma o hidrocoloidegalactomanánico en la que los componentes monoméricos galactosa y manosa se encuentran en una relación de 24,41:70,90 (1:2,9), (figura 4). La viscosidad intrínseca permitió determinar su peso molecular promedio en 351400, así mismo la goma da lugar a soluciones acuosas con característica de fluido pseudoplástico con una viscosidad promedio de 4000 cp.

Se aislaron dos lectinas de las semillas, una se señala como aislada de la *C. tinctoria* y la otra de la *C. spinosa*. La primera se caracteriza porque contiene 8,3% carbohidratos y exhibe actividad aglutinante contra eritrocitos humanos de los grupos ABO, con una composición de aminoácidos conteniendo un gran número de residuos ácidos e hidrofóbicos y una masa molecular de 12,5 kDa. Igualmente se indica que la lectina contiene 10% de α -hélice, 38% de β -hoja u hoja plegada, 28% con forma no ordenada y 6% de PII (poli-L-prolina II conformación hélice). De

la segunda lectina se dice que es también capaz de aglutinar eritrocitos humanos del grupo B Rh+, tiene un tamaño molecular de 29 kDa, y la característica de los aminoácidos es de carácter ácido y sumamente hidrofóbica, siendo el porcentaje de residuos ácidos de 16,3%, básicos 8,9%, neutros 17,0% y 57,8% de residuos hidrofóbicos.

2.2.7. Efecto antibacteriano

Las plantas son una gran fuente de metabolitos secundarios que tienen como función de protección contra bacterias e insectos. Que se puede dar el uso de los metabolitos secundarios que contienen algunas plantas en forma pura o de en forma de extractos, alimentos o en aplicaciones médicas. Plantas tienen una acción casi ilimitada para sintetizar sustancias aromáticas, siendo la mayoría fenoles o sus derivados oxígeno- sustituidos. En general los metabolitos secundarios (es decir que no tiene un papel esencial en el metabolismo de las plantas) de los cuales por lo menos el 10% se han aislado. Según nuestros antecedentes y colaboradores nos indica que “en muchos casos estas sustancias sirven a la planta como mecanismo de defensa contra el ataque de microorganismos, insectos y herbívoros” Los compuestos derivados de plantas que poseen actividad antimicrobiana “son los fenólicos y polifenoles dentro de los cuales se encuentran: quinonas, flavonoides, taninos y cumarinas. Otros son los terpenoides aceites esenciales, los alcaloides, lecitinas y polipéptidos, entre, otro.

2.2.8. Estructura bacteriana

Las bacterias son células unicelulares procariotas de pequeño tamaño y estructura sencilla, cuyo material genético se encuentra envuelto por la membrana nuclear.

Elementos Obligados: Como se define obligados son aquellas que se requieren que estén presentes en las bacterias de manera indispensable para la vida propia de la celular unicelular procariota.

- ✓ Pared celular
- ✓ Membrana Citoplasmática
- ✓ Citoplasma y Organelas
- ✓ Cromosoma Bacteriano

Elementos Facultativos: son aquellas que pueden estar o no presentes en la bacteria.

- ✓ Capsula
- ✓ Flagelo/Pilis
- ✓ Esporas e Inclusiones citoplasmáticas

2.2.9. *Escherichia coli*

Es una bacteria que se localiza normalmente en el tracto digestivo de los seres vivos y tiene la función de producir vitamina B y K. “Debido a su elevada presencia en el tracto gastrointestinal y en las heces, la *E. coli* se utiliza como el indicador principal de contaminación fecal en la evaluación de la inocuidad de los alimentos y el agua”. La mayoría de las *E. coli* son microorganismos comensales inofensivos cuando se encuentran en su hábitat intestinal natural. Diferentes cepas de *E. coli* son patógenos gastrointestinales graves para los seres humanos, y algunas también son patógenos para animales jóvenes destinados a la producción de alimentos.

Escherichia coli

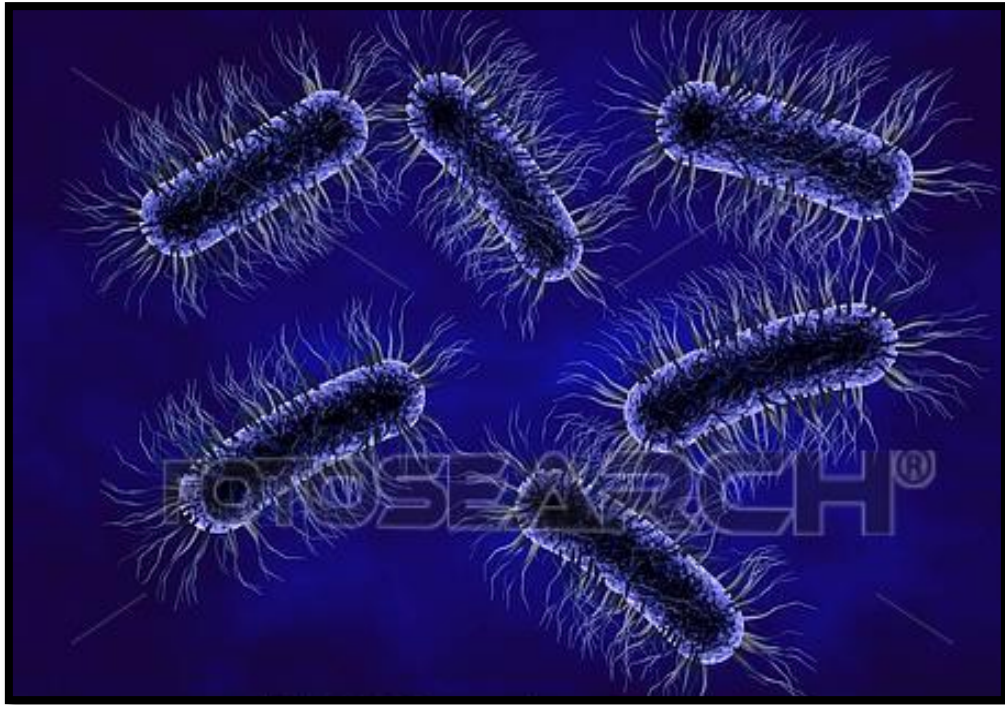


Imagen de Escherichia Coli Medical salud 2016.

Aislamiento, identificación y caracterización de *Escherichia coli* patógena

Para el aislamiento, la identificación y la caracterización de cepas de *E. coli* se aplican métodos tradicionales, métodos *in vivo* e *in vitro* y de biología molecular; a continuación se mencionarán los métodos tradicionales y los de biología molecular.

El método tradicional es el aislamiento de la bacteria, tomada directamente de materia fecal o con hisopo rectal. Después se siembra con la punta del hisopo en la parte superior de una placa de agar Mac Conkey u otro medio selectivo y, con una asa redonda de nicromel, se continúa el aislamiento, sembrando por estría cruzada; después se incuba a 37 °C durante 18-24 h. Posteriormente se seleccionan de 5 a 10 colonias típicas de *E. coli* lactosa positivas.

En muestras provenientes de casos de diarrea con sangre se deben seleccionar también cepas lactosa negativa.

La identificación se hace mediante pruebas bioquímicas en tubo como TSI, LIA, MIO, citrato, sorbitol, mucato, urea, rojo de metilo, VogesProskauer, malonato y caldo manitol-rojo de fenol. Estas pruebas se interpretan de acuerdo con el cuadro I. Simultáneamente se siembra la cepa en tubos de agar base sangre (BAB), sin sangre para posteriormente hacer la serología.

En los laboratorios y hospitales que cuentan con antisuero polivalente A, B o C de EPEC se realiza la prueba de aglutinación en niños con diarrea con moco y sangre, especialmente menores de un año.

Cuando se sospecha la presencia de EHEC, en muestras provenientes de diarrea con sangre, el diagnóstico se hace empleando agar Mac Conkey con 1% de sorbitol (SMAC) en lugar de lactosa, se seleccionan de tres a 10 colonias sorbitol negativo que son incoloras y sospechosas de ser O157:H7. Este agar se debe considerar sólo como un medio de selección y nunca como una forma definitiva de diagnóstico ya que no todas las cepas sorbitol negativo son *E. coli* O157:H7 y hay cuadros de SUH producidos por cepas no-O157:H7 que son sorbitol positivo.

2.2.10 Agar Mueller Hinton

Es un medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano. Por su composición, ha sido recomendado por The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) antiguamente llamado National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), para ser utilizado en forma rutinaria en la realización del antibiograma en medio sólido, debido a que presenta buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, su contenido en inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y tetraciclina es bajo, la mayoría de los patógenos microbianos crece satisfactoriamente y una gran cantidad de datos adicionales que han sido evaluados y avalados usando este medio decultivo.

Cuando se suplementa con sangre de carnero al 5%, permite realizar las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en especies de estreptococos. También, con el agregado de sangre puede utilizarse para el cultivo y aislamiento de microorganismos nutricionalmente exigente.

Fórmula (en gramos por litro)	Cantidad
Infusión de carne	300.0
Peptona acida de caseína	17.5
Almidón	1.5
Agar	15.0
Ph Final	7.3±0.1

Cuadro Composición de Agar Mueller Hinton Laboratorios Británica 2016

2.3. Formulación de hipótesis.

2.3.1. Hipótesis general.

El extracto etanólico de vaina de *Caesalpinia spinosa* (tara) presenta efecto antibacteriano en cultivos de *Escherichia coli* en estudio in vitro.

2.3.2. Hipótesis específicas.

- Los componentes presentes en el extracto etanólico de vaina de *Caesalpinia spinosa* (tara) tienen estructura química antibacteriana.
- Los componentes del extracto etanólico de vaina de *Caesalpinia spinosa* (tara) tienen actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*.

Operacionalización de variables e indicadores.

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores
Independiente: Extracto Etanolicode vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (tara)	Producto de la maceración en alcohol 65% por 7 días, concentrado en estufa hasta eliminación del solvente, conservado y almacenado en envase de vidrio color ámbar. Administrado según la concentración y el peso.	Maceración en alcohol 65% por 7 días, concentrado en estufa a 40°C.	Dosis del extracto administrado.
Dependiente: Efecto Antibacteriano	Acción Antibacteriana la administración del Extracto etanolicovaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (tara)	Evaluación del Extracto etanolicovaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (tara)	Halo de inhibición.

Variable independiente.

Extracto hidroalcohólico de vaina de *Caesalpinia spinosa* (tara)

Variable dependiente.

Efecto antibacteriano.

2.5. Definición de términos básicos.

- a) **Aerobios:** Es aquel organismo capaz de sobrevivir y desarrollarse en presencia de oxígeno
- b) **Agliconas:** Molécula en la cual un glúcido se enlaza a través de su carbono anomérico a otro compuesto de diferente naturaleza química.
- c) **Anaerobios:** Organismo que puede vivir o desarrollarse en ausencia de oxígeno.
- d) **Andriamicina:** Nombre comercial de un fármaco ampliamente utilizado en la quimioterapia del cáncer; antibiótico de la familia de las antraciclinas.
- e) **Cepas:** En microbiología significa población de células de una sola especie descendiente de una única célula.

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1. Tipo de estudio.

En su tipificación metodológica el estudio responde al carácter cuantitativo, explicativo y aplicado.

3.2. Diseño a utilizar.

Debido a la posibilidad del manejo de la variable independiente, la investigación responde al diseño Experimental, transversal y prospectivo

3.3. Población

- **Población:** Las vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) serán recogidas en la provincia de Concepción distrito de Quichuay. Departamento de Junín.

3.4. Muestra: Un kilo de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) el cual se llevó para su clasificación botánica al centro de Identificación Taxonómica al museo botánico de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.

Para el estudio fitoquímico del extracto etanólico de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) se realizaron mediante marcha fitoquímica, cromatografía en capa fina para hallar el metabolito secundario responsable de la actividad antibacteriana.

Para evaluar la inhibición del crecimiento de cepas de bacterias en cultivos adecuados de *Escherichia Coli*, se realizó la medición en mm de los halos de inhibición del crecimiento microbiano.

3.6. Procesamiento de datos.

Los datos fueron evaluados utilizando el sistema estadístico SPSS, de evalúa la media y el promedio de los datos para cada una de las muestras, también se empleó ANOVA para determinar la contratación de hipótesis.

Procedimiento experimental

A. Materiales, reactivos y equipos para utilizar en la Investigación.

✓ Implementos de bioseguridad

- Bata o guardapolvo
- Tapaboca o mascarilla quirúrgicas
- Gorro descartable
- Guantes quirúrgicos
- Botas desechables
- Gafas

✓ Materiales:

- Frasco de vidrio ámbar de 1 litro
- Beaker de 100, 250 y 500mL.
- Papel kraff
- Probetas 100, 250 y 500mL.
- Pipetas de 5 y 10mL.
- Propipetas

- Baguetas
- Tubos de ensayo 13x100
- Gradillas
- Cubas cromatográficas
- Láminas cromatofolios
- Embudos
- Papel filtro
- Recipientes de Vidrio
- Espatulas
- Pipetas Pasteur
- Goteros

✓ **Equipos:**

- Balanza Analítica (modelo Quintix, marca Santorius)
- Balanza precisión (modelo ES6600h, marca Rice like)
- Espectrofotómetro UV visible (marca Cronalab)
- Estufa esterilizadora a calor seco (marca Binder)
- Incubadora (marca Binder)
- Alcoholímetro(marca S65)
- Baño María(marca Binder)
- Autoclave (marca Binder)

✓ **Medios de cultivo**

- Agar Mueller Hinton BD
- Caldo nutritivo BD

✓ **Reactivos:**

N°	Reactivos
1	Reactivo de Mayer
2	Reactivo de Wagner
3	Reactivo de Dragendorff
4	Reactivo de ácido Fosfowolframio o fosfotungstico "Scheibler
5	Reactivo de Sonneschein
6	Reactivo de Reineckato
7	Reactivo de Shinoda (tiras de magnesio + ácido clorhídrico
8	Reactivo de Cloruro férrico
9	Reactivo de Gelatina al 1%
10	Hidróxido de sodio al 5% (reacción de Bortranger)
11	Reactivo de Ninhidrina
12	Reactivo de Lugol
13	Reactivo de Fehling A
14	Reactivo de Fehling B
15	Agua destilada
16	Metanol
17	Etanol
18	Acetato de etilo
19	Cloroformo
20	Reactivo de tricloruro férrico de aluminio al 2%
21	Acetato de sodio 1M
22	Reactivo metanol – agua (25-75)
23	Reactivo de BAW: butanol – agua – ácido acético glacial (4-3-1)
24	Ácido sulfúrico 2N
25	Hidróxido de sodio al 10%

B. Diseño experimental

Se utilizaron 30 placas Petri con medio de cultivo agar MuellerHinton preparadas en forma estéril para su sembrado de *Escherichia coli* luego fueron incubados con una temperatura de 37 grados centígrados por 48 horas para ser verificados y medidos con un vernier, después se registraron los resultados obtenidos y discutidos con los antecedentes con las concentraciones de nuestra investigación del extracto etanólico de vaina de *Caesalpiniaspinosa*(tara).

Cuadro N° 1 cuadro experimental

Grupos	Sembrado bacteriano con <i>Escherichia coli</i>	Tratamiento	Recolección de datos por horas	
			24	48
Grupo 1			x	x
Grupo 2	✓		x	x
Grupo 3	✓	Extracto Etanólico de Tara 20% 100 mg/kg	x	x
Grupo 4	✓	Extracto Etanólico de Tara 40% 250mg/kg	x	x
Grupo 5	✓	Extracto Etanólico de Tara 60% 400 mg/kg	x	x
Grupo 6	✓	control 500mg	x	x

- a) En el caso del grupo 1 será el Blanco. No se administrara ningún tipo de Drogas.
- b) En todos los casos del grupo 2 al grupo 6 serán sembradas la bacteria *Escherichia coli* en medio de Cultivo MuellerHinton.
- c) En los grupos 3,4,5 luego siembre bacteriana de *Escherichia coli* se administrara el extracto Etanolicovaina de *Caesalpiniaspinosa*(tara).
- d) El Grupo 6 se administró con el medicamento antibiótico de 500 mg.
- e) Se recolectara los datos después de 24 y 48 horas para su discusión de resultados

C. Actividad antimicrobiana

- Método: Difusión de disco.
- Técnica: Siembra en superficie

D. Obtención de los microorganismos.

Se adquirió en centro RICFER LAB., se realizó el trabajo de Investigación con una cepa de bacteria estándar de Escherichia coli de Marca MICROBIOLOGICS Producto diseñado solo para propósito de estudio en investigaciones in vitro.

E. Preparación de materiales para el medio de cultivo.

Se Preparó los siguientes Materiales:

- 5 Pipetas 0,5 mL “ Pyrex”
- 5 Pipetas 1,0 mL “ Pyrex”
- 5 Tubos 10 mm x 100 mm “ Pyrex”
- Gradilla para tubos de ensayo - Mechero de Bunsen
- 30 Placas petriesteriles descartables
- Agar MuellerHinton
- 4 Asas de siembra de metal
- 2 Pinzas estériles
- Cepas de Staphylococcus Aureus (ATCC® 6538™*)
- Discos de papel filtro esteriles
- Refrigerador, marca LG/ER, serie 27177 BQ
- Autoclave horizontal semiautomatico.
- Incubadora
- Regla para medición
- Materiales de Limpieza

F. Discos de sensibilidad

El disco estándar se preparó con papel filtro Watman N°10 de 6 mm de diámetro y posteriormente se procedió a esterilizar. Su almacenamiento fue a temperatura ambiente antes de colocar sobre la superficie de agar preparado de MuellerHinton cuidadosamente con una pinza estéril presionando suavemente con la punta de la pinza para asegurar un contacto uniforme con el agar preparado de MuellerHinton, con la seguridad de no moverlos una vez colocados en los medios de cultivos.

Se colocaron los discos sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril que se nos ayudó a presionar suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar, Se colocaron los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro. Los discos no fueron removidos una vez que tomó contacto con la superficie del agar debido a que difunden rápidamente en la superficie.

G. Preparación del inóculo

Preparamos de acuerdo al tubo N° 0,5 de la escala de Mc Farland. Se obtiene al tocar con un hisopo estéril la superficie de una o varias colonias de cepas bacterianas, se utilizó *Escherichia coli*.

La muestra biológica de *Escherichia coli* para transferirlos a los tubos que contienen 3 ml de Caldo Nutritivo, previa agitación para un mejor homogenizado, hasta obtener la turbidez de la escala 0.5 de Mac. Farland por comparación visual con dicho patrón, Cabe mencionar que se usó una luz apropiada y se pudo observar los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste. La suspensión del inóculo con turbidez comparable al tubo de la escala de Mac. Farland contiene aproximadamente $1,5 \times 10^8$ ufc/mL; para el ensayo la suspensión bacteriana se preparó agregando 0,1 mL del tubo de caldo Nutritivo (que contiene las bacterias de estudio) en 9.9 ml de Caldo Nutritivo obteniéndose

un total de 10 ml con una concentración bacteriana para su siembra correspondiente en las placas de medio de cultivo de MuellerHinton.

H. Preparación de los medios de cultivo

El agar Mueller - Hinton se preparó con agua destilada de acuerdo a la indicación técnica del laboratorio fabricante del medio de cultivo, Fundir el medio de cultivo solido de Muellerhinton como indica la especificación técnica del laboratorio fabricante para este proceso, el agar requiere una temperatura 121°C y 15 lb/pg durante 15 minutos. Luego de este proceso de esterilización y fundición dejar enfriar en Baño María a 50 - 55°C. Alcanzado esta temperatura verter el preparado fresco y tibio a las placas petri estériles del laboratorio biologix, para dar un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm. Esto corresponde a 20 ml para placas de 100 mm de diámetro. El medio de agar se dejó enfriar a temperatura ambiente. Considerando el pH de cada medio de cultivo de agarMuellerHintontiene un pH entre 7,2 - 7,4, este proceso se realizó con pHmetro de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la UIGV.

I. Sembrado de Bacteriano de *Escherichia coli*

Método de Kirby-Bauer. (Método disco-placa-cultivo) según (Udayakumar&Hazzena, 2002). Se empleó el agar Müeller Hinton, dado que se considera el mejor medio dirigido para estos tipos de pruebas de sensibilidad de rutina y se preparó como indica el laboratorio fabricante, las cuales fueron adquiridas en Laboratorio de microbiológico Ibaclin Medica. Este método, que sufrió diferentes modificaciones hasta que fue estandarizado por Kirby-Bauer en los Estados Unidos en 1966, representa la prueba de susceptibilidad más ampliamente utilizada en bacteriología clínica porque permite obtener resultados bastante exactos mediante un método cuantitativo, semicuantitativo o cualitativo, este último es el más utilizado. Según el acuerdo 62 El Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud OMS (NCCLS en su documento M7-T) publicó las "Normas" para efectuar algunas modificaciones al descrito por Bauer, de

manera que los resultados sean comparables y medidos en todas partes del mundo con fines de brindar resultados razonables.

J. Preparación de las diluciones

Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo (4 tubos), se procedió a extraer con una micropipeta 100 uL del inóculo (4 tubos correspondiente a las 4 bacterias de estudio), para luego verter en placas con Agar MuellerHinton, que ya fueron preparadas para el ensayo (3 placas por bacteria) diseminando con la espátula de Drigalsky en todas las direcciones de la superficie de cada placa, asegurando una distribución uniforme del inóculo. - Antes de colocar los discos dejamos secar las placas a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.

K. Medición de los Halos de Inhibición

Medir la zona de inhibición de cada disco contra una superficie oscura bajo luz reflejada. Medir el diámetro de la zona incluyendo los 6 mm del disco, con una regla sobre el respaldo de la caja de Petrí sin remover la tapa. Una lectura de 6 mm indica que no hay zona de inhibición. Si se ha usado agar muellerHinton para la prueba, la medición de la zona de inhibición debe hacerse sobre la superficie removiendo la tapa de la caja. El punto final de inhibición completa del crecimiento se estima a simple vista, crecimiento en la zona de inhibición, sin embargo, la zona de inhibición está usualmente bien delimitada y este tipo de crecimiento invasivo, debe ser ignorado. Si se necesita un resultado muy rápido, el diámetro de la zona de inhibición puede leerse después de 6-8 horas de incubación pero estas lecturas deben confirmarse posteriormente, al término del período de incubación de 24 horas.

CAPITULO IV

PRESENTACION Y ANALISIS DE LOS RESULTADOS

4.1. Presentación de resultados

4.1.1. Prueba de solubilidad

Según la prueba de solubilidad realizada al extracto etanólico de la vaina de *Caesalpinia spinosa* presenta solubilidad solo en Agua destilada.

Tabla N° 1: Prueba de Solubilidad de la vaina de *Caesalpinia spinosa* (Tara).

TUBO N°	SOLVENTE	RESULTADO
1	Éter etílico	-
2	Acetona	-
3	Agua	+++
4	Cloroformo	-
5	Butanol	-
6	Etanol	-
7	N-hexano	-

LEYENDA:

- No soluble o insoluble (-)
- Poco soluble (+)
- Mediana o moderadamente soluble (++)
- Completamente soluble (+++)

Fuente: elaboración propia.

4.1.2. Tamizaje fitoquímico

Según el tamizaje fitoquímico realizado el extracto hidroalcohólico presenta algunos compuestos metabólicos tales como flavonoides, alcaloides, quinonas, carbohidratos, taninos, esteroides y terpenos

**Tabla N° 2: Marcha Fitoquímica del extracto etanólico de la vaina de
Caesalpiniaspinosa(Tara).**

TUBO N°	METABOLITO	ENSAYO (Muestra + Reactivo)	REACCIÓN POSITIVA	RESULTADO
1	Alcaloides	Mayer	Precipitado blanco	++
2		Dragendroff	Precipitado rojo-naranja	+++
3	Lactonas	Baljet	Coloración rojo oscuro	++
4	Quinonas	Bortranger	Coloración roja	+
5	Carbohidratos	Antrona	Coloración verde	+
6		Fehling A y B	Precipitado rojo ladrillo	-
7		Molish	Anillo violeta	-
8	Compuestos fenólicos	Tricloruro Férrico	Coloración verde o azul	++
9	Taninos	Gelatina	Turbidez blanquesina	++
10	Flavonoides y flavonas	Shinoda	Coloración amarillo a rojo	++
11	Antocianinas y flavonoides catequicos	Rosenheim	Coloración rojo oscuro	-
12	Esteres y terpenos	Liberman-Burchard	Esteroides: verde-azul Triterpenoides: rojo-naranja	-
13	Aminoácidos libres	Ninhidrina	Coloración violácea	-
14	Saponinas	Espuma	Formación de 0,5cm de espuma persistente de 5 a 30min.	-

LEYENDA:

- Ausente (-)
- Leve (+)
- Moderada (++)
- Abundante (+++)

Fuente: elaboración propia.

4.1.3. Halos de inhibición.

En la tabla se muestran el registro de todos los resultados de los halos de inhibición de los 5 grupos de estudio para evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de vaina de *Caesalpiniaspinosa*(Tara) frente a cepas de *Escherichia coli*.

Tabla N° 3: Resultados de las mediciones de los halos de inhibición (mm)

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS					
MÉTODO DE KIRBY BAUER					
CONCENTRACION (%) <i>Caesalpiniaspinosa</i> (Tara)				CONTROL	
				ES	
				Ciprofloxacino	CONTROL
				CONTROL(+)	(-)
N° DE PLACAS	Resultados de las mediciones de los halos de inhibición (mm)				
	20%	40%	60%		
PLACA 1	10.48	12.45	14.50	15.80	6
PLACA 2	10.45	12.46	13.20	15.60	6
PLACA 3	10.46	12.42	14.50	15.50	6
PLACA 4	10.47	12.40	14.50	15.30	6
PLACA 5	10.48	12.40	14.80	15.50	6
PLACA 6	10.49	12.30	14.80	15.50	6

Fuente: Elaboración propia

Tabla N°4: Actividad antibacteriana del extracto etanólico de vaina de *Caesalpiniaspinosa*(Tara) frente a cepas de *Escherichia coli*. según la escala de Duraffourd

Extracto etanólico de vaina de <i>Caesalpiniaspinosa</i> (Tara)	Media de los Halos de inhibicion (mm)	Escala de Duraffourd
20%	10,4717	Sensible limite (+)
40%	12,4050	Sensible limite (+)
60%	14,3833	Muy sensible (++)

Fuente: Elaboración propia

Criterios de evaluación según la escala de Duraffourd

4.2 Contrastación de hipótesis:

4.2.1 Hipótesis general:

El extracto etanólico de vainas de *Caesalpiniaspinosa*(Tara) tienen tipo con actividad antibacteriana en cepas de *Escherichia coli*.

4.2.2 Hipótesis específicas (1)

- Ho: No existen componentes químicos en el extracto etanólico de vaina de *Caesalpiniaspinosa*(Tara) tienen efecto antibacteriano frente a cepas de *Escherichia coli*.

- H1: Existen componentes químicos en el extracto etanólico de vaina de ***Caesalpiniaspinosa***(Tara) tienen efecto antibacteriano frente a cepas de ***Escherichia coli***.

Hipótesis específicas (2)

- Ho: No existe una concentración con actividad antibacteriana del extracto etanólico de vaina de ***Caesalpiniaspinosa***(Tara) frente a cepas de ***Escherichia coli***.
- H1: Existe una concentración con actividad antibacteriana del extracto etanólico de vaina de ***Caesalpiniaspinosa***(Tara) frente a cepas de ***Escherichia coli***.

TABLA N° 5: PRUEBA DE NORMALIDAD:

Pruebas de normalidad							
	CONCENTRACION (%)	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	<i>Caesalpiniaspinosa</i> (Tara)						
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
RESULTADOS DE LOS HALOS DE INHIBICION EN mm	20%	,214	6	,200 [*]	,958	6	,804
	40%	,298	6	,102	,861	6	,194
	60%	,411	6	,002	,693	6	,005
	CONTROL (+) Ciprofloxacino	,252	6	,200 [*]	,916	6	,480
	CONTROL NEGATIVOS	.	6	.	.	6	.

Nivel de significancia: 0.05

Al tener un tamaño de muestra menor de 30 datos, se elige la prueba de Shapiro-Wilk.

La Significancia ó p-valor resultó ser **0.804**, **0.194** y **0.480**, en la mayoría de los grupos, estos resultados son mayores que α 0.05.

Por lo tanto, no se rechaza la hipótesis nula H_0 y se concluye que los resultados obtenidos de las lecturas de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la vaina de *Caesalpiniaspinosa*(Tara), presentan distribución Normal.

En ese sentido, se aplica la prueba Análisis de Varianza (ANOVA).

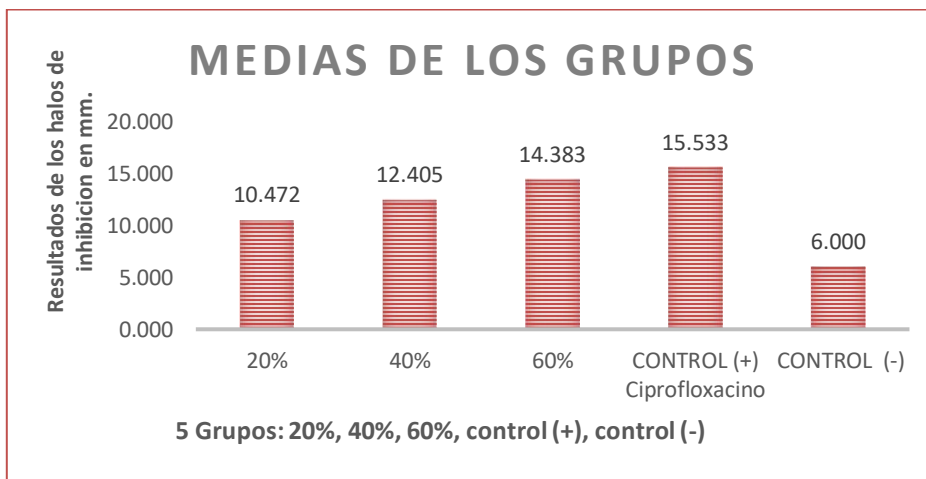
Tabla N°6: ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

DESCRIPTIVOS								
GRUPOS DE ESTUDIO	Numero de Placas	Media	Desv. Desviación	Desv. Error	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1. 20%	6	10,4717	,01472	,00601	10,4562	10,4871	10,45	10,49
2. 40%	6	12,4050	,05718	,02335	12,3450	12,4650	12,30	12,46
3. 60%	6	14,3833	,59805	,24415	13,7557	15,0110	13,20	14,80
4. CONTROL (+) Ciprofloxacino	6	15,5333	,16330	,06667	15,3620	15,7047	15,30	15,80
5. CONTROL (-)	6	6,0000	,00000	,00000	6,0000	6,0000	6,00	6,00
Total	30	11,7587	3,42495	,62531	10,4798	13,0376	6,00	15,80

Fuente: Elaboración propia

En la Tabla de Descriptivos se muestra la media de los cinco grupos de estudio utilizados para evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las vainas de *Caesalpiniaspinosa* (Tara) frente a cepas de *Escherichia coli*. Todas las medias se encuentran dentro de los límites establecidos a un intervalo de confianza del 95% y un error relativo del 5%, la concentración que mayor halo de inhibición presenta corresponde a la concentración de 60% con una media de 14,3833 mm. Para garantizar el desarrollo del procedimiento experimental se agregaron los controles positivos que corresponde al medicamento sintético Ciprofloxacino dando una Media de 15,5333mm. y con respecto al control negativo que no contiene ninguna sustancia, su media es 6,00 mm.

Tabla N° 7: Prueba de homogeneidad de varianzas de las medias



Prueba de homogeneidad de varianzas					
		Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
RESULTADOS DE LOS HALOS DE INHIBICION EN mm	Se basa en la media	4,385	4	25	,008
	Se basa en la mediana	1,889	4	25	,144
	Se basa en la mediana y con gl ajustado	1,889	4	5,695	,237
	Se basa en la media recortada	3,257	4	25	,028

Fuente: Elaboración propia

Ho: Las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneos. ($P < 0.05$)

H1: Las varianzas de los tratamientos aplicados no son homogéneos. ($P > 0.05$)

La prueba de homogeneidad de varianzas nos permite determinar si las varianzas de cada tratamiento aplicado son iguales o diferentes estadísticamente. La significancia es de 0.008. Observamos que es < 0.05 , por lo tanto, se concluye que las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneas, rechazando la H1.

Tabla N° 8: Prueba de ANOVA

ANOVA					
RESULTADOS DE LOS HALOS DE INHIBICION EN mm					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	338,240	4	84,560	1090,197	,000
Dentro de grupos	1,939	25	,078		
Total	340,179	29			

Fuente: Elaboración propia

H₀: $\mu_{20^{\circ}C} = \mu_{40^{\circ}C} = \mu_{60^{\circ}C}$ (P > 0.05)

H₁: $\mu_{20^{\circ}C} \neq \mu_{40^{\circ}C} \neq \mu_{60^{\circ}C}$ (P < 0.05)

$\alpha=0.05$

La tabla nos permite descifrar si existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados en los diferentes grupos de estudio, comparando la media de cada uno de ellos. Al observar el resultado de la Sig 0.000 que es P < 0.05, se puede afirmar que existe diferencias estadísticas significativas al 95% entre los grupos de tratamientos o concentraciones usados, validándose la H1.

PRUEBA DE POST HOC (Tukey)

Tabla N° 9: Comparaciones múltiples de las diferencias de los halos de inhibición

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: RESULTADOS DE LOS HALOS DE INHIBICION EN mm							
	(I) CONCENTRACION (%) <i>Caesalpinia aspinosa</i> (Tara)	(J) CONCENTRACION (%) <i>Caesalpiniaspinosa</i> (Tara)	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite inferior	Límite superior
T U K E Y	20%	40%	-1,93333*	,16079	,000	-2,2645	-1,6022
		60%	-3,91167*	,16079	,000	-4,2428	-3,5805
		CONTROL POSITIVO	-5,06167*	,16079	,000	-5,3928	-4,7305
		CONTROL NEGATIVOS	4,47167*	,16079	,000	4,1405	4,8028
	40%	20%	1,93333*	,16079	,000	1,6022	2,2645
		60%	-1,97833*	,16079	,000	-2,3095	-1,6472
		CONTROL POSITIVO	-3,12833*	,16079	,000	-3,4595	-2,7972
		CONTROL NEGATIVOS	6,40500*	,16079	,000	6,0738	6,7362
	60%	20%	3,91167*	,16079	,000	3,5805	4,2428
		40%	1,97833*	,16079	,000	1,6472	2,3095
		CONTROL POSITIVO	-1,15000*	,16079	,000	-1,4812	-,8188
		CONTROL NEGATIVOS	8,38333*	,16079	,000	8,0522	8,7145
	CONTROL POSITIVO	20%	5,06167*	,16079	,000	4,7305	5,3928
		40%	3,12833*	,16079	,000	2,7972	3,4595
		60%	1,15000*	,16079	,000	,8188	1,4812
		CONTROL NEGATIVOS	9,53333*	,16079	,000	9,2022	9,8645
	CONTROL NEGATIVOS	20%	-4,47167*	,16079	,000	-4,8028	-4,1405
		40%	-6,40500*	,16079	,000	-6,7362	-6,0738
		60%	-8,38333*	,16079	,000	-8,7145	-8,0522
		CONTROL POSITIVO	-9,53333*	,16079	,000	-9,8645	-9,2022

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

Fuente: Elaboración propia

En la tabla, La prueba de Tukey nos permite realizar comparaciones múltiples y además poder determinar que medias son estadísticamente homogéneas. Podemos observar que los valores de significancia son de 0.000 ($p < 0.05$), en los diferentes grupos de estudio utilizados para evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de vaina de *Caesalpiniaspinosa*(Tara) frente a cepas de *Escherichia coli*.

Tabla N° 10: SUB CONJUNTOS HOMOGENEOS

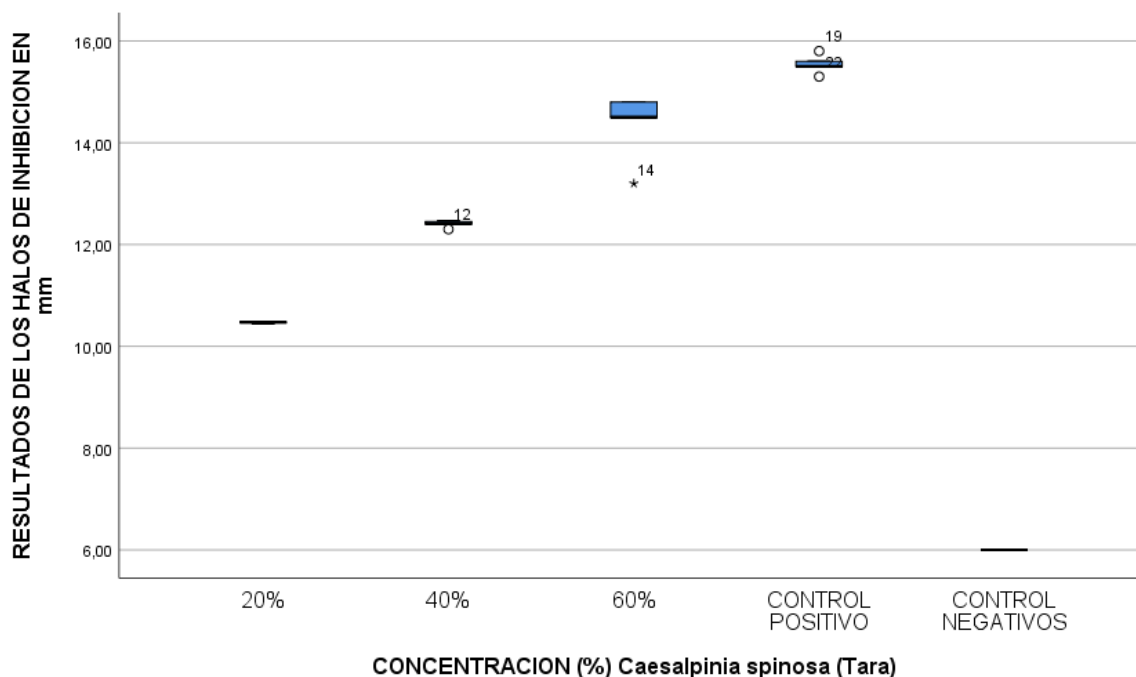
HOMOGENEIDAD DE LOS RESULTADOS EN mm.							
	CONCENTRACION (%)		Subconjunto para alfa = 0.05				
	<i>Caesalpiniaspinosa</i> (Tara)	N	1	2	3	4	5
HSD Tukey	CONTROL NEGATIVOS	6	6,0000				
	20%	6		10,4717			
	40%	6			12,4050		
	60%	6				14,3833	
	CONTROL POSITIVO	6					15,5333
	Sig.			1,000	1,000	1,000	1,000

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

Fuente: Elaboración propia

En la tabla de homogeneidad de sub conjuntos entre los grupos de estudio de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de vaina de *Caesalpiniaspinosa*(Tara), se observan que las Medias de las concentraciones son diferentes en cada una de ellas con una significancia de 0.05.

Tabla N° 11: Gráfico de Medias de los grupos de estudio



En la tabla se muestra los resultados de las Medias que corresponden a los diferentes grupos usados para evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las vainas de *Caesalpiniaspinosa*(Tara) frente a en cepas de *Escherichia coli*. La Medias de las concentraciones al 20% es 10,471mm, al 40% 12,405mm y al 60% fue 14,3833mm. Para la interpretación de las medidas de los halos de inhibición se utilizó la escala de Duraffourd, el cual nos indica la sensibilidad o resistencia de la bacteria.

4.3 Discusión de resultados

Huarillo M (2011), en su investigación “Determinación del efecto antibacteriano del extracto alcohólico de *Caesalpiniaspinosa (tara)* a la concentración de 6.25 mg/ml sobre flora bacteriana mixta salival”, Su realización de la prueba de sensibilidad antimicrobiana fue in vitro, para concentración inhibitoria mínima se realizó por método de dilución en tubo y para las concentraciones bactericidas mínimas por el método de agar. Resultados: El efecto antibacteriano se consideró en función al diámetro de los halos de inhibición del crecimiento del microorganismo: nula (-) si fue inferior o igual a 8 mm; sensibilidad limite (sensible = +) de 9 a 14 mm; media (muy sensible = ++) de 15 a 19 mm y sumamente sensible (S.S. = +++) si fue igual o superior a 20 mm. En nuestra tesis de investigación “Efecto antibacteriano del extracto etanólico de vaina de *Caesalpiniaspinosa(tara)* en cultivos de *Escherichia coli* estudio in vitro”, al realizar la medición de los halos de inhibición bacteriana se encontró que la concentración de 60% favorece la actividad antibacteriana frente a cultivos de *Escherichia coli*, al poseer un promedio de 14.3833 mm lo que indica que el microorganismo presenta un gran área de inhibición causada por el metabolito (flavonoides) comparado con el medicamento Ciprofloxacino demostrando el efecto antibacteriano del extracto etanólico de vaina de *Caesalpiniaspinosa(tara)* en cultivos de *Escherichia coli*, la medida que éstas presentan son de similar tamaño.

Con respecto a la tesis anterior se utilizaron un fármaco antibacterianos para realizar la comparación de la inhibición antibacteriana de estos y solo se utilizaron en cultivos de *Escherichia coli*.

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

- Se determinó el efecto antibacteriano del extracto etanólico de vaina de *Caesalpinia spinosa* (tara) en cultivos de *Escherichia coli*, en el cual resulta que la concentración al 60% presenta mayor efecto frente a las otras concentraciones, comparado con el Ciprofloxacino.
- Se determinó la estructura química de componentes en el extracto etanólico de vaina de *Caesalpinia spinosa* (tara) encontrando la presencia de metanolitos como alcaloides y flavonoides.
- Se evaluó la actividad antimicrobiana de los componentes del extracto etanólico de vaina de *Caesalpinia spinosa* (tara) frente a *Escherichia coli* obteniéndose una sensibilidad 14.3833 próxima a la del fármaco Ciprofloxacino con una media de 15.50.

5.2 Recomendaciones.

- ✓ Se sugiere continuar con investigaciones a fin de consolidar mejores resultados, ya que sería importante encontrar puntos que ajusten concentraciones en forma de dosis.
- ✓ Se recomienda realizar la prueba con distintas concentraciones para y en varios grupos con la finalidad de obtener un principio activo con el cual se podría desarrollar la fabricación de alguna forma farmacéutica.
- ✓ Debido a su presencia de flavonoides cuya propiedad es antioxidante puede ser de importancia y apoyo para la aplicación y/o estudios posteriores para la formulación de productos antioxidantes o productos con fines de industrialización o innovación tecnológica.

REFERENCIAS

1. Mendez Á. Concepto de solubilidad. [Online]; 2010. Acceso 15 de mayo de 2018. Disponible en: <https://quimica.laguia2000.com/conceptos-basicos/concepto-de-solubilidad>.
2. Dirección General de Medicamentos, Insumos y Drogas [Digemid]. Formulario Nacional de Medicamentos Digemid. Formulario de Medicamentos.
3. Hernández Sampiere R, Fernández Collado C, Baptista L. Metodología de la Investigación. 6th ed.; 2014.
4. Instituto Nacional de Salud. Catálogo florístico de plantas medicinales peruanas. Lima. 2013.
5. Romero A. plantas naturales en España; 2012.
6. Centurion K. Efecto antibacteriano in vitro de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668. [Tesis]. Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo; 2015.
7. Haro A. Estudio in vitro de la eficacia antibacteriana entre el extracto alcohólico de la *Caesalpinia spinosa* (Tara) al 100% e hipoclorito de sodio al 5.25% sobre el *Enterococcus faecalis*. [Tesis]. Universidad Central de Ecuador., Trujillo; 2015.
8. Zarate M. Efecto in vitro antibacteriano del extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* (Tara) sobre cepas de *Streptococcus Pyogenes* y *Escherichia Coli* aisladas de pacientes de Hospital Regional Docente de Trujillo. 2014; 26(1):1-9.

9. Añanca E. Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuso de vainas de *Caesalpinia spinosa* (Tara) En cepas de *Staphylococcus Aureus* y *Streptococcus Pyogenes*. [Tesis]. Tacna: Universidad Jorge Basadre Grogman, Tacna; 2015.
10. Montenegro A. Actividad antibacteriana de *Caesalpinia spinosa* (Tara) sobre *Porphyromonas gingivalis*. [Tesis]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima; 2014.
11. Huarino M. Efecto antibacteriano de *Caesalpinia Spinosa* (Tara) sobre la flora salival mixta. [Tesis]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima; 2011.
12. Guevara J. Evaluación del conocimiento de diferentes biovariedades de *Cesalpinia Spinosa* (Tara) frente a cepas de *Staphylococcus Aureus* sensibles y resistentes a oxacilina. An. Fac. Med. 2014; 75(2).
13. Benites C. Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanolico de *Cesalpinia spinosa* (Tara) sobre cepas de *Candida Albicans* ATCC 90028 [Tesis]. Universidad Privada Antenor Orrego, Trujillo; 2015.
14. Castro AJ, Ramos NJ, Juarez JR, Ruiz JR. Composición química del aceite esencial de *Caesalpinia Spinosa* (Tara) evaluación antioxidante y efecto antibacteriano frente a *Streptococcus Mutans*. Ciencia e Investigación. 2016; 19(2).

15. Gallardo Perez J, Esparza Aguilar M, Gómez Campos A. Importancia etnobotánica de una planta vascular sin semilla Equisetum. 2006.
16. Vega J. Plantas medicinales [Internet]. 2014Jul [citado 2018 Nov 30]; Capítulo I pág. 17 Disponible en: [http://dspace.ucacue.edu.ec/bitstream/reducacue/6553/1/Estudio%20de%20los%20beneficios%20terape%20C3%BAticos%20de%20la%20planta%20cola%20de%20caballo%20\(equisetum%20arvense%20l.\).pdf](http://dspace.ucacue.edu.ec/bitstream/reducacue/6553/1/Estudio%20de%20los%20beneficios%20terape%20C3%BAticos%20de%20la%20planta%20cola%20de%20caballo%20(equisetum%20arvense%20l.).pdf).
17. Villavicencio O. Criterios de aplicación clínica de las plantas medicinales. Lima. 2010.
18. Instituto Biológico. Manual de fitoterapia. Lima. 2011.
19. Servicio Nacional de Aprendizaje. Introducción a la industria de los aceites esenciales de plantas medicinales y aromáticas. 2010.
20. Instituto Nacional de Salud. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antibacteriana por el método de difusión de disco, serie de normas técnicas. 68 pag. Lima – Peru. 2002.
21. Sisa T. recolección de plantas medicinales. Medicina natural al alcance de todos. (citado 2017 julio 01). Disponible en: <http://ecoaldea.com/plmd/recoleccion.htm>. 2004.
22. Singh N. et al. Equisetum arvense: pharmacology and phytochemistry. Rev. Pharmaceutical and clinical research. Vol (3)3. 2010.
23. Castillo, E. y otros., Manual de Fitoterapia., Madrid-España., Editorial Elsevier., 2007., Pp 423.

24. Grupo Latino., Manual Curativo de Frutas y Platas Medicinales., Bogota-Colombia., EditorialGrupo Colombia., 2005., Pp 320.
25. Palomino, O., Revista de Botánica., Métodos analíticos para la identificación de Plantas Medicinales., Madrid-España., 2001., Pp 87-93.
26. Miranda, E. Farmacognosia y productos naturales. Universidad de la habana Cuba.2002.
27. Muñoz, O. Plantas medicinales de uso farmacologico.segundaedicion.santiago de chile.2004. pag 111.

ANEXOS



ANEXO. 01 Matriz de Consistencia

Título: EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE VAINA DE <i>Caesalpinia spinosa</i> (tara) EN CULTIVOS DE <i>Escherichia coli</i> ESTUDIO IN VITRO.					
Problema General	Objetivo General	Hipótesis General	Variable Independiente	Indicadores	Método de Investigación
¿El extracto etanólico de vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (tara) presenta efecto antibacteriano en cultivos de <i>Escherichia coli</i> en estudio in vitro?	Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (tara) en cultivos de <i>Escherichia coli</i> estudio in vitro	El extracto etanólico de vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (tara) presenta efecto antibacteriano en cultivos de <i>Escherichia coli</i> en estudio in vitro	Extracto etanólico de vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (tara)	a. Marcha fitoquímica b. Solubilidad c. Concentración del extracto	<p>Nivel: Experimental.</p> <p>Enfoque: Cuantitativo Longitudinal</p> <p>Diseño Específico: Experimental Ensayo pre-clínico</p> <p>Temporalidad: Prospectivo.</p> <p>Propósito: Aplicativo</p> <p>Instrumento: Ficha de recolección de datos</p> <p>Población y muestra: 30 placas de medio de cultivo de Agar Mueller Hinton.</p>
Problemas específicos	Objetivos específicos	Hipótesis Específicos	Variable Dependiente	Indicadores	
¿Los componentes presentes en el extracto etanólico de vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (tara) tendrá estructura química de naturaleza antibacteriana?	Obtener el extracto etanólico de vaina de <i>Caesalpiniaspinosa</i> (tara) y determinar la estructura química de algunos componentes.	Los componentes presentes en el extracto etanólico de vaina de <i>Caesalpiniaspinosa</i> (tara) tienen estructura química antibacteriana.	Actividad antibacteriana.	a. Halo de inhibición b. Tiempo	
¿Los componentes del extracto etanólico de vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (tara) tendrán actividad en cultivos de <i>Escherichia coli</i> ?	Evaluar la actividad antimicrobiana de los componentes del extracto etanólico de vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (tara) frente a <i>Escherichia coli</i> .	Los componentes del extracto etanólico de vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (tara) tienen actividad antimicrobiana frente a <i>Escherichia coli</i> .			

ANEXO. O2. Operacionalizacion de Variables

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores
Independiente: Extracto Etanolico de vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (tara)	Producto de la maceración en alcohol 65% por 7 días, concentrado en estufa hasta eliminación del solvente, conservado y almacenado en envase de vidrio color ámbar. Administrado según la concentración y el peso.	Maceración en alcohol 65% por 7 días, concentrado en estufa a 40°C.	Dosis del extracto administrado.
Dependiente: Efecto Antibacteriano	Acción Antibacteriana la administración del Extracto etanolico vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (tara)	Evaluación del Extracto etanolico vaina de <i>Caesalpinia spinosa</i> (tara)	Halo de inhibición.

ANEXO. 03. Certificación Botánica

 
UNIVERSIDAD del PERÚ, DEL ANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL

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

CONSTANCIA N° 308-USM-2019

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

La muestra vegetal (frutos) recibida de **Roxana Medina Laymfo** estudiante de la Universidad Alas Peruanas, Facultad de Estomatología, ha sido estudiada y clasificada como: ***Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ROSIDAE

ORDEN: FBALES

FAMILIA: CAESALPINACEAE


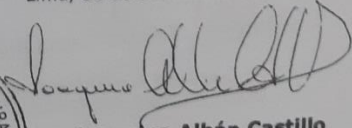
GENERO: *Caesalpinia*

ESPECIE: *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze

Nombre vulgar: "Tara"
Determinado por Mag. María I. La Torre Acuy


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

Lima, 23 de setiembre de 2019

 
Dra. Joaquina Albán Castillo
JEFE (e) DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

JAC/ddb

ANEXO. 04. Certificación Bacteriana

 LABORATORIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS
RICFER LAB E.I.R.L.

LABORATORIO DE ANALISIS CLINICO Y BIOLOGICO RICFAR E.I.R.L.

CONSTANCIA


Por presente de este medio hago constar de enero, febrero y marzo del 2019, sean aislados diversas cepas clínicas patológicas de pacientes de rutina analizadas en el laboratorio de análisis clínico y biológico RICFAR.E.I.R.L.

El siguiente microorganismo:

- *Escherichia coli* correspondiente a un uro cultivo.

Así mismo se realiza la entrega del microorganismo para trabajo de investigación Tesis al Bachiller. Ana Milil Palomino Gonzales, tesista de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

San Martin de Porres 15 de abril 2019


MARIA CHIRIHUANCA CAÑAMA
CTMP 0598
RFE 0066

ANEXO. 05. PARTE EXPERIMENTAL

