



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONÍA PERUANA  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

**TESIS**

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO  
ETANOLICO DE LA CORTEZA DE *Tynanthus panurensis* (CLAVO  
HUASCA) FRENTE A *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* Y  
*Pseudomonas aeruginosa*”**

**PRESENTADO POR:**

**Br. CLAUDIA KATHERINE CÁRDENAS RIVERA**

**Br. AUREA LORENA LOPEZ ROJAS**

**ASESORES:**

**Q.F HENRY VLADIMIR DELGADO WONG**

**ING. ALENGUER GERÓNIMO ALVA AREVALO, Dr.**

**BLGA. JESSY PATRICIA VÁSQUEZ CHUMBE, MSc.**

**CO-ASESOR**

**LIC. ALEXANDER JAVIER IMAN TORRES**

**IQUITOS – PERÚ**

**2019**

**ACTA DE SUSTENTACIÓN**

En el caserío de Nina Rumi, Distrito de San Juan Bautista, Departamento de Loreto, a los..... días del mes de Junio del dos mil diecinueve, siendo las 10:15 Horas, los Miembros del Jurado Calificador de Tesis designado según Resolución Decanal N° 132-FFB-UNAP-2018, integrados por los señores docentes que a continuación se detalla:

- Blgo. FELIPE RÍOS ISERN Presidente
- Q.F. BRENDA SORAYA URDAY RUÍZ, Mgr. Miembro
- Q.F. ROSA DEL CARMEN MILUSKA VARGAS RODRÍGUEZ, PhD Miembro



Se constituyeron en las instalaciones de la Facultad de Farmacia y Bioquímica sala de docentes, para proceder a dar inicio al Acto Académico de Sustentación Pública de Tesis Titulada "**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA In Vitro DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LA CORTEZA DE *Tynanthus panurensis* (CLAVO HUASCA) FRENTE A *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* Y *Pseudomonas aeruginosa***" presentado por las Bachilleres **CLAUDIA KATHERINE CÁRDENAS RIVERA** y **AUREA LORENA LÓPEZ ROJAS**, para optar el TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO, que otorga la UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA, de acuerdo a la Ley Universitaria N° 30220 y el Estatuto General de la UNAP vigente.

Luego de haber escuchado con atención la exposición de los sustentantes, y habiéndose formulado las preguntas respectivas, las cuales fueron respondidas:

..... adecuadamente .....

Los miembros del Jurado Calificador llegaron a las siguientes conclusiones:

- 1.-La Tesis ha sido aprobada por unanimidad
- 2.-Observaciones ninguna

Siendo las 11:15 horas se dio por concluido el Acto Académico de Sustentación Pública de la Tesis, felicitándoles a los sustentantes por su adecuada .....

  
Blgo. FELIPE RÍOS ISERN  
PRESIDENTE

  
Q.F. BRENDA SORAYA URDAY RUÍZ, Mgr.  
MIEMBRO

  
Q.F. ROSA DEL CARMEN MILUSKA VARGAS RODRÍGUEZ, PhD  
MIEMBRO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LA  
CORTEZA DE *Tynanthus panurensis* (CLAVO HUASCA) frente a *Staphylococcus aureus*,  
*Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*”

TESIS

PRESENTADO POR:

BACH. CLAUDIA KATHERINE CÁRDENAS RIVERA  
BACH. AUREA LORENA LOPEZ ROJAS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUIMICO FARMACÉUTICO

APROBADO POR EL JURADO REVISOR CONFORMADO POR:

PRESIDENTE:

  
Blgo. FELIPE RÍOS ISERN

PRIMER MIEMBRO:

  
Q.F BRENDA SORAYA URDAY RUÍZ, Mgr

SEGUNDO MIEMBRO:

  
Q.F ROSA DEL CARMEN MILUSKA VARGAS RODRIGUEZ, PhD

ASESOR:

  
Q.F HENRY VLADIMIR DELGADO WONG

ASESOR:

  
ING. ALENGUER GERÓNIMO ALVA AREVALO, Dr.

ASESOR:

  
BLGA. JESSY PATRICIA VÁSQUEZ CHUMBE, MSc.

CO-ASESOR:

  
LIC. ALEXANDER JAVIER IMAN TORRES

## **DEDICATORIA**

Dedicamos nuestra tesis en especial a nuestro querido Dios, por su ayuda en los momentos difíciles de nuestras vidas, pues siempre nos esta iluminando y guiando nuestro caminar.

A nuestros queridos padres, Raquel Rivera Montoya, Lenith Rojas Vargas y Pedro Robinson López Díaz, que desde pequeñas nos enseñaron a no decaer en las adversidades que nos pone la vida, siempre están a nuestro lado apoyándonos y nos brindan sus sabios consejos.

A nuestros familiares que con sus apoyos morales también nos ayudaron a no decaer en las adversidades que encontramos en el camino.

## **AGRADECIMIENTO**

Queremos agradecer a la Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, (Laboratorio de la Facultad de Ing. Química), por prestarnos sus instalaciones y equipos para la ejecución del presente proyecto.

Al Q.F: Henry Vladimir Delgado Wong, al ING. Alenguer Gerónimo Alva Arévalo, Dr. a la Blga. Jessy Patricia Vásquez Chumbe, MSc. y al Co-Asesor Lic. Alexander Javier Iman Torres, asesores del presente proyecto, por su constante apoyo y orientación durante todo el tiempo que duro el desarrollo de la investigación.

A los miembros del jurado: Blgo. Felipe Ríos Isern (Presidente del jurado), Q.F. Brenda Soraya Urday Ruiz (Miembro), Q.F. Rosa del Carmen Miluska Vargas Rodríguez (Miembro), por sus exigencias en la revisión del proyecto de tesis.

A todos los docentes de nuestra querida Facultad de Farmacia y Bioquímica, que nos brindaron y enseñaron sus conocimientos en las diversas áreas de la carrera y así poder formarnos como futuros profesionales Químicos Farmacéuticos.

Al personal administrativo de la Facultad de Farmacia y Bioquímica por darnos la facilidad de realizar nuestros trámites para nuestro proyecto de tesis.

Y para finalizar agradecer a nuestras familias por el constante apoyo en nuestro camino estudiantil.

Muchas gracias a todos ustedes.

## INDICE DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	13
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	9
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	10
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	11
<b>LISTA DE ANEXOS</b> .....	12
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>CAPITULO I: MARCO TEORICO</b> .....	3
1.1 ANTECEDENTES .....	3
1.2 BASES TEORICAS .....	5
1.2.1 <i>Tynanthus panurensis</i> (Clavo Huasca) .....	5
1.2.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	5
1.2.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.....	6
1.2.1.3 USOS FARMACOLÓGICOS.....	6
1.2.2 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA .....	6
1.2.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA .....	7
1.2.3.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR .....	7
1.2.3.2 METODO DE MACRODILUCION.....	8
1.2.4 CEPAS DE ESTUDIO.....	9
1.2.4.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	9
1.2.4.2 <i>Escherichia coli</i> .....	11
1.2.4.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	13
1.3 DEFINICIÓN DE TERMINOS.....	15
<b>CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES</b> .....	16
2.1 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS.....	16
2.2 VARIABLES Y SU OPERACIONALIZACIÓN TIPO Y DISEÑO.....	17
<b>CAPÍTULO III: METODOLOGÍA</b> .....	
3.1 MÉTODO Y DISEÑO DE ESTUDIO.....	19
3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA.....	20
3.2.1 POBLACIÓN VEGETAL .....	20
3.2.2 POBLACIÓN MICROBIOLÓGICA .....	20
3.2.3 CONTROLES POSITIVOS:.....	20
3.2.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	20

3.2.5	CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	21
3.3	DISEÑO DE MUESTRAL .....	21
3.4	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS. ....	21
3.4.1	INFRAESTRUCTURA .....	21
3.4.2	EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS .....	22
3.4.2.1	EQUIPOS .....	22
3.4.2.2	MATERIALES DE VIDRIO .....	22
3.4.2.3	MATERIALES DE METAL, PLASTICO, DE BIOSEGURIDAD Y OTROS MATERIALES .....	23
3.4.2.4	MATERIALES DE BIOSEGURIDAD .....	23
3.4.2.5	MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS .....	24
3.4.3	PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS .....	25
3.4.3.1	FLUJOGRAMA DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA CORTEZA DE <i>Tynanthus panurensis</i> (CLAVO HUASCA) Y DE LA EVALUACION DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	25
3.4.3.2	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANOLICO.....	26
3.4.3.3	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA .....	26
3.4.4	PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE DATOS .....	33
<b>CAPÍTULO IV: RESULTADOS</b> .....		<b>34</b>
4.1.1	RESULTADOS.....	34
4.1.1.1	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO VEGETAL.....	34
4.1.1.2	EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA CORTEZA DE.....	36
<b>CAPÍTULO V: DISCUSIÓN</b> .....		<b>43</b>
5.1	DISCUSIÓN .....	43
<b>CAPITULO VI: CONCLUSIONES</b> .....		<b>46</b>
6.1	CONCLUSIONES.....	46
<b>CAPITULO VII: RECOMENDACIONES</b> .....		<b>47</b>
7.1	RECOMENDACIONES .....	47
<b>CAPITULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN</b> .....		<b>48</b>
6.1	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	48
6.1.2	BIBLIOGRAFÍA.....	48
6.1.3	WEBGRAFÍA .....	52
<b>ANEXOS</b> .....		<b>53</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla N° 1:</b> Clasificación taxonómica del <i>Tynanthus panurensis</i> . .....	5
<b>Tabla N° 2:</b> Clasificación Taxonomica del <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	10
<b>Tabla N° 3:</b> Clasificación taxonómica de <i>Escherichia coli</i> . .....	12
<b>Tabla N° 4:</b> Rendimiento del extracto etanólico de las hojas de <i>Tynanthus panurensis</i> .....	34
<b>Tabla N° 5:</b> Marcha Fitoquímica del extracto etanólico de la corteza de <i>tynanthus panurensis</i> . .....	35
<b>Tabla N° 6:</b> Actividad antibacteriana del extracto etanólico de la corteza de <i>Tynanthus panurensis</i> frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomons aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	36
<b>Tabla N° 7:</b> Actividad antibacteriana de los controles positivos frente a <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> . .....	38
<b>Tabla N° 8:</b> Actividad antibacteriana del extracto etanólico de la corteza de <i>Tynanthus panurensis</i> según Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), frente a <i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aureginosa</i> . .....	42



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura N° 1:</b> <i>Tynanthus panurensis</i> .....	5
<b>Figura N° 2:</b> Placas con disco de antibióticos. ....	7
<b>Figura N° 3:</b> Microtubos en la prueba antibacteriana por el método de macrodilución.....	8
<b>Figura N° 4:</b> <i>Staphylococcus aureus</i> .....	9
<b>Figura N° 5:</b> <i>Escherichia coli</i> . ....	11
<b>Figura N° 6:</b> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	13
<b>Figura N° 7:</b> Placa Petri con el inóculo bacteriano. ....	28

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Grafico N° 1:</b> Porcentaje de rendimiento del extracto etanólico del <i>Tynanthus panurensis</i> .....	34
<b>Grafico N° 2:</b> Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de <i>Tynanthus panurensis</i> frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> según diámetro de la zona de inhibición.....	39
<b>Grafico N° 3:</b> Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de <i>Tynanthus panurensis</i> frente a <i>Escherichia coli</i> según diámetro de la zona de inhibición.....	40
<b>Grafico N° 4:</b> Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de <i>Tynanthus panurensis</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> según diámetro de la zona de inhibición.....	41

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo N° 1:</b> <i>Tynanthus panurensis</i> . .....	54
<b>Anexo N° 2:</b> Obtención de la Corteza de <i>Tynanthus panurensis</i> . .....	54
<b>Anexo N° 3:</b> <i>Pesado de la corteza de Tynanthus panurensis</i> . .....	55
<b>Anexo N° 4:</b> Macerado de la corteza de <i>Tynanthus panurensis</i> . .....	55
<b>Anexo N° 5:</b> Filtrado del macerado de la corteza de <i>Tynanthus panurensis</i> ...	56
<b>Anexo N° 6:</b> Recuperación de solvente utilizado en la maceración de la corteza de <i>Tynanthus panurensis</i> por arrastre a vapor. ....	56
<b>Anexo N° 7:</b> Extracto etanólico de la corteza de <i>Tynanthus panurensis</i> . .....	57
<b>Anexo N° 8:</b> Materiales utilizados en el proyecto .....	57
<b>Anexo N° 9:</b> Activación de las bacterias .....	58
<b>Anexo N° 10:</b> Impregnación de los discos con el extracto etanólico para la prueba de sensibilidad por el método de difusión en disco. ...	58
<b>Anexo N° 11:</b> Preparación del inóculo bacteriano. ....	59
<b>Anexo N° 12:</b> Aplicación del inóculo y de los discos impregnados con el extracto de <i>Tynanthus panurensis</i> .....	60
<b>Anexo N° 13:</b> Resultados de los ensayos realizados, por el método de difusión en agar. ....	21
<b>Anexo N° 14:</b> Resultados de los ensayos realizados por el método de macrodilución. ....	21
<b>Anexo N° 15:</b> Descripción botánica de la muestra vegetal en estudio. ....	62

**“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LA CORTEZA DE *Tynanthus panurensis* (CLAVO HUASCA) FRENTE A *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* Y *Pseudomonas aeruginosa*”**

**CLAUDIA KATHERINE CÁRDENAS RIVERA; AUREA LORENA LOPEZ ROJAS <sup>(1)</sup>**

**1: Bachiller en Farmacia y Bioquímica; FFBQ-UNAP-IQUITOS**

---

**RESUMEN**

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar y determinar la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de la corteza de *Tynanthus panurensis* (CLAVO HUASCA) frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. La muestra vegetal fue recolectada del Centro Experimental de Plantas Medicinales (Jardín Botánico Arboterum) de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la UNAP ubicado en la Carretera de Zungarococha; para la evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* se utilizó el método de Difusión en disco “Kirby-Bauer” y dilución en caldo “Macrodilución”, Se utilizaron como controles positivos los antibióticos meropenem, ciprofloxacino, gentamicina y vancomicina. Resultados: la actividad antibacteriana *in vitro* por el método de disco difusión, a concentraciones de 1300 mg/ml, 1500 mg/ml, y 1700 mg/ml del extracto etanólico de la corteza de *Tynanthus panurensis*, para *Staphylococcus aureus* se presenciaron halos de inhibición de 7 mm, 9 mm y 11 mm respectivamente, mientras que para *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, no se apreció ningún halo de inhibición a las concentraciones mencionadas, clasificándolas como resistente; en el método de Macrodilución, para *Staphylococcus aureus* se encontró una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 32 mg/ml del extracto etanólico, mientras que para *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, no se encontró una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Se concluye según la interpretación de los resultados que las bacterias utilizadas son resistentes al extracto etanólico de la corteza de *Tynanthus panurensis* (Clavo Huasca), por lo tanto, no presenta actividad antibacteriana a las concentraciones evaluadas.

**Palabras clave:** Actividad antibacteriana, *Tynanthus panurensis*, macrodilución, difusión en agar.

**"ANTIBACTERIAL ACTIVITY IN VITRO OF THE ETHANOLIC EXTRACT OF THE BARK OF *Tynanthus panurensis* (CLAVO HUASCA) AGAINST *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* AND *Pseudomonas aeruginosa*"**

**CLAUDIA KATHERINE CÁRDENAS RIVERA; AUREA LORENA LOPEZ  
ROJAS <sup>(1)</sup>**

**1: Bachiller en Farmacia y Bioquímica; FFBQ-UNAP-IQUITOS**

---

**ABSTRACT**

The objective of this work was to evaluate and determine the in vitro antibacterial activity of the ethanolic extract of the bark of *Tynanthus panurensis* (NAIL HUASCA) against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The vegetal sample was collected from the Experimental Center of Medicinal Plants (Botanical Garden Arboretum) of the Faculty of Agronomic Sciences of the UNAP located in Carretera de Zungarococha; for the evaluation of antibacterial activity in vitro, the disc diffusion method "Kirby-Bauer" and dilution in broth "macrodilution" were used; the antibiotics meropenem, ciprofloxacin, gentamicin and vancomycin were used as positive controls. Results: the in vitro antibacterial activity by the diffusion disc method, at concentrations of 1300 mg / ml, 1500 mg / ml, and 1700 mg / ml of the ethanol extract of the bark of *Tynanthus panurensis*, for *Staphylococcus aureus* was witnessed inhibition halos of 7 mm, 9 mm and 11 mm respectively, while for *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, no halo of inhibition was observed at the mentioned concentrations, classifying them as resistant; in the Macrodilution method, for *Staphylococcus aureus* a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was found in the concentration of 32 mg / ml of the ethanolic extract, while for *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, no one was found (MIC). It is concluded according to the interpretation of the results that the bacteria used are resistant to the ethanolic extract of the bark of *Tynanthus panurensis* (Clavo Huasca), therefore, it does not present antibacterial activity at the concentrations evaluated.

**Key words:** Antibacterial activity, *Tynanthus panurensis*, macrodilution, agar dif

## INTRODUCCIÓN

La Amazonía posee una mega diversidad de plantas que son empleadas con diferentes finalidades por el poblador amazónico. Así, tenemos que algunas sirven directamente para la alimentación, otras son empleadas en la preparación de bebidas espirituosas regionales o en la medicina tradicional; mientras que otras se emplean en la construcción de casas o para elaborar artesanías. Pocas se encuentran cultivadas tradicionalmente y la mayoría en estado silvestre, pero todas ellas aprovechadas en forma natural o extraídas en forma rudimentaria y artesanal. <sup>(1)</sup>

La OMS nos dice que la resistencia a los antibióticos es un suceso en donde un microorganismo al entrar en contacto con un antimicrobiano no padece ningún daño o es más fuerte que antes, y todo esto a consecuencia de la capacidad que tienen estos de neutralizar el efecto de los medicamentos, logrando mutarse o logrando adquirir el gen de resistencia. <sup>(3)</sup>

Los datos epidemiológicos muestran que las cifras con respecto a la prevalencia de las enfermedades infecciosas han aumentado, y esto se debe a la resistencia a los antimicrobianos debido a las adaptaciones microbianas a estos fármacos, la cual se está produciendo en todo el mundo; está afectando la capacidad que los científicos, investigadores, industrias farmacéuticas tienen para tratar o curar enfermedades infecciosas, acabando con muchos avances en los ámbitos de la salud y la medicina. Por tal motivo la OMS viene ejecutando un plan de acción mundial, con el objetivo de retrasar y tratar las diversas enfermedades que existen en el mundo actual, con medicamentos eficaces, seguros y de calidad garantizada, reforzar los conocimientos a través de la investigación. <sup>(2)</sup>

Los metabolitos como los flavonoides, taninos, cumarinas, alcaloides y lactonas, son compuestos bioactivos que pueden ser utilizados para mejorar la vida del ser humano, así mismo, las especies que contienen estos compuestos, bajo un manejo sostenible pueden dar oportunidad a toda la población de probar otros medios más accesibles para contrarrestar las infecciones. Por otro lado, la determinación de estos compuestos hoy en día es muy fácil, utilizando métodos de espectrofotometría. <sup>(2)</sup>

De otro lado, varias especies que se utilizan en la Amazonía son vendidos en mercados de abasto, especialmente en el muy conocido Pasaje Paquito. La Amazonía peruana tiene especies vegetales de reconocida actividad antioxidante; antimicótica y antibacteriana por todo ello surge la necesidad de evaluar científicamente los órganos de las plantas (hojas, tallo, raíz, etc.), debido a que los antibacterianos o antibióticos cobran mucha importancia en la actualidad para prevenir la muy conocida resistencia antimicrobiana, entre ellos el “clavo huasca”, que es vendido como un poderoso afrodisiaco, usado como ingrediente complementario en diversas recetas de ayahuasca para asentar el estómago; no siendo este un alucinógeno. <sup>(2)</sup>

Por los párrafos arriba mencionado fue de menester para nosotros como futuros profesionales Químicos Farmacéuticos realizar esta investigación, puesto que esto pondrá en manifiesto las propiedades de la planta estudiada, y para todo ello la investigación fue estructurada en los siguientes capítulos; CAPÍTULO I: Marco teórico, donde encontraremos toda la información bibliográfica de referencia utilizada en el trabajo, CAPÍTULO II: Hipótesis y las variables operacionales, CAPÍTULO III: Metodología, en el que se explican los equipos, materiales, reactivos y métodos utilizados. Para evaluar la actividad antibacteriana utilizamos el método de difusión en agar según Kirby-Bauer, y macrodilución según la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), CAPÍTULO IV: este capítulo mostrara los resultados obtenidos en los experimentos, CAPÍTULO V: Discusiones, aquí comparamos nuestros resultados con algunos antecedentes encontrados en otros trabajos, y los CAPÍTULO VI y VII: donde se encuentran las Conclusiones y Referencias bibliográficas utilizadas en nuestra investigación.

## CAPITULO I: MARCO TEORICO

### 1.1 ANTECEDENTES

- ✚ **Morales L. et al (2013).** En el estudio realizado con el *Tynanthus panurensis*, desarrollaron el tamizaje fitoquímico, encontrando la presencia de saponinas, con concentraciones altas de fenoles y flavonoides. También desarrollaron pruebas *in vitro* las cuales mostraron que el extracto tiene propiedades antioxidantes que eliminan los radicales libres y reduce la peroxidación lipídica microsómica, la síntesis de ácido úrico y la producción de factor  $\alpha$  de necrosis tumoral. También encontraron propiedades antiinflamatorias de ETP en estudios *in vivo* en un modelo de edema de carragenina en rata, en el que el extracto exhibía una actividad potente. Estos resultados respaldan la idea de que el extracto de corteza de *T. panurensis* podría ser beneficioso para tratar la inflamación y está de acuerdo con uno de los principales usos tradicionales de esta planta. <sup>(4)</sup>
  
- ✚ **Miranda Cruz et al (2012).** Evaluaron la actividad antimicrobiana de extracto etanólico y hexánico de hoja y corteza de cuatro plantas que fueron usadas como medicinales: guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* L.), palo de sangre (*Pterocarpus hayesii* L.), chichimecate (*Tynanthus guatemalensis* L.) y ciruela (*Spondias purpurea* L.). Utilizando la técnica de difusión en agar, obteniendo resultados que dicen que el extracto hexánico de *Tynanthus guatemalensis* L. presentó actividad antimicrobiana en uno de los microorganismos utilizados (*Staphylococcus aureus*). <sup>(5)</sup>
  
- ✚ **Miguel Ruiz A. y Nelly Santillán R. (2012),** Realizaron el estudio fitoquímico de dos plantas *Maytenus macrocarpa* y *Tynanthus panurensis*. determinaron las diferencias macromorfológicas de las hojas y las cortezas de ambas plantas, con el objetivo de evaluar la parte exterior e interpretar apropiadamente la monografía sobre la misma. Prepararon el extracto fluido en las hojas, corteza y raíz, demostrando con el análisis fitoquímico preliminar la presencia de



algunos metabolitos secundarios: fenoles, saponinas, aminoácidos y esteroides. <sup>(6)</sup>

✚ **Dayana Lacerda Custódio et al (2010).** En su investigación describieron la constitución química y la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación a partir de las hojas de *Pimenta pseudocaryophyllus* y *Tynanthus micranthus*. El análisis demostró que el eugenol era el único componente en el aceite esencial de *T. micranthus* (99.9%) y el componente principal en el aceite esencial de *P. Pseudocaryophyllus* (92.59%), que también presentó metileugenol, terpinen-4-ol, o-cymene y (E)-caryophyllene, entre otros. Ambos aceites presentaron actividad antimicrobiana contra bacterias, levaduras y hongos filamentosos probados. La prueba de bioautografía reveló que el eugenol era el componente bioactivo en ambos aceites contra *Cladosporium herbarum*. Estos resultados confirmaron el gran poder que tienen estos aceites esenciales de eugenol no solo como fuente de compuestos de sabor, sino también como agentes antibacterianos en la agricultura y en productos farmacéuticos y en la producción de productos alimenticios. <sup>(7)</sup>

✚ **Cansian et al (2010),** En su estudio farmacológico del *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca), han determinado una actividad alelopática en la germinación y crecimiento del hipocotileo de las semillas de *Lactuca sativa* (lechuga). Algunas fracciones desarrollaron toxicidad frente al crustáceo *Artemia salina* en determinadas concentraciones, además de ejercer actividad antioxidante similar a la rutina. La evaluación antibacteriana de los extractos brutos demostró actividad sobre algunas bacterias y la fracción hidroalcohólica de la hoja presentó actividad frente a la tirosina en 100 µg/ml de concentración. <sup>(8)</sup>

## 1.2 BASES TEORICAS

### 1.2.1 *Tynanthus panurensis* (Clavo Huasca)



**Figura N° 1:** *Tynanthus panurensis*

Fuente: edabea <sup>(1)</sup>

#### 1.2.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

**Tabla N° 1:** Clasificación taxonómica del *Tynanthus panurensis*.

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Tracheophyta</i>
Clase	<i>Spermatopsida</i>
Orden	<i>Lamiales</i>
Familia	<i>Bignoniaceae</i>
Género	<i>Tynanthus</i>
Especie	panurensis
N. científico:	<i>Tynanthus panurensis</i>

Fuente: Miguel Ruiz

### **1.2.1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA.**

Esta planta se caracteriza por que cuenta con 4 floemas en corte transversal, tiene ramas cuadrangulares, cuenta con 2 a 3 hojas folioladas, también tiene folíolos elípticos u oblongo; cuenta con un ápice acuminado o agudo, la base se encuentra truncada o redondeada. Inflorescencia en panículas axilares, brácteas y bracteolas de hasta 1 mm de largo. Las flores tienen un cáliz cupular subtruncado, tiene una corola blanca, crema o amarillenta, bilabiada hasta la mitad, pubescente por fuera. Frutos en forma de capsulas lineales, obtusas en ambos extremos. <sup>(9)</sup>

### **1.2.1.3 USOS FARMACOLÓGICOS**

Los ancestros dicen que la parte utilizada de la planta es el tejido floemático; Muchos pobladores de la ciudad lo siguen incluyendo en el grupo de las “cortezas”, también es utilizado como componente de muchos licores amazónicos, que son endulzados con miel, a los licores que tienen propiedades afrodisiacas (7 Raíces, charapita ardiente, etc.). Es utilizada en la preparación de la ayahuasca o yagé, también lo usan para calmar el vómito y diarrea después de una sesión de ayahuasca. <sup>(9 y 10)</sup>

### **1.2.2 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA**

La OMS nos dice que se entiende por “resistencia a los antimicrobianos” al poder que tiene un determinado microorganismo (bacteria, virus, hongo o parásito) de resistencia a un medicamento antimicrobiano al que antes era sensible. La adquisición de resistencias por parte de numerosos agentes microbianos supone un aumento en la amenaza para la salud pública, que inquieta de sobremanera en todos los países y en muchos sectores económicos. Resulta especialmente alarmante la rápida expansión a nivel mundial de muchos microorganismos que ahora son resistente a los antibióticos utilizados en el tratamiento de infecciones comunes. <sup>(3)</sup>

### 1.2.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

La selección adecuada y uso de un determinado antibacteriano va depender mucho de las características del mismo y en su patrón de susceptibilidad, la persona hospedadora y el fármaco. Para evaluar o determinar la capacidad antibiótica o antimicrobiana existen diferentes tipos de métodos, tales como difusión en agar y macrodilución.

#### 1.2.3.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

**Figura N° 2:** Placas con disco de antibióticos.



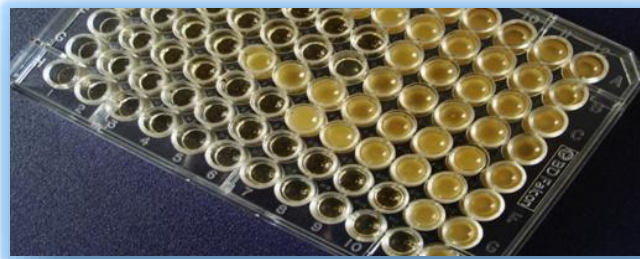
Fuente: Usal <sup>(2)</sup>

Los antibiogramas son reportes de pruebas de susceptibilidad a los agentes antibióticos y se utiliza para microorganismos clínicamente potenciales, cuando la sensibilidad o susceptibilidad no puede ser predicha. Y esta técnica consiste en aplicar un determinada cantidad de antibiótico o antimicrobiana a un reservorio o disco o pastilla, en la superficie del agar adecuado para estas pruebas sobre el cual se distribuyó inóculos bacterianos. Se formará de este modo por difusión, un gradiente de concentración del antibacteriano alrededor del disco o pastilla con el antibiótico, y la sensibilidad de la bacteria estará indicada por el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano. El diámetro obtenido dependerá no solo de la sensibilidad

de la bacteria y la carga del disco, sino también del espesor de la capa de agar, el pH y la composición del medio de cultivo, la capacidad de difusión del compuesto bioactivo utilizado en ese medio, la temperatura, el ambiente de incubación, la velocidad que utiliza la bacteria para duplicarse, el tamaño del inóculo y de la fase de crecimiento de la bacteria. <sup>(11)</sup>

### 1.2.3.2 METODO DE MACRODILUCION

**Figura N° 3:** Microtubos en la prueba antibacteriana por el método de macrodilución



Fuente: Coesant <sup>(3)</sup>

Las pruebas que utilizan medios líquidos han sido muy aplicadas a lo largo del tiempo. Los procedimientos están inmersos en la utilización de tubos seriados con volúmenes de caldos de por lo menos 1ml. La NCCLS publicó un estándar del método en los años 70. En el cual esta técnica fue llamada macrodilución en caldo. Esta miniaturización simple de la técnica se conoció como macrodilución en caldo. <sup>(12)</sup>

Y este método consiste en utilizar tubos seriados que contengan volúmenes pequeños de un determinado medio de cultivo líquido el cual se le combina con microorganismos para luego añadir el antibiótico o antimicrobiano. Normalmente se prepara la serie de tubos con 1ml de caldo MH (Muller Hinton) enriquecido con  $Ca^{++}$  y  $Mg^{++}$  estéril sin antimicrobiano. Luego se agrega de 1 a 2ml aproximadamente del antibiótico al primer tubo de la serie de diluciones. En cada uno de los tubos restantes se añade 0.5 a 1ml de caldo MH. Con pipeta estéril se transfiere 1ml del primer tubo al segundo, y ahí sucesivamente hasta llegar al penúltimo tubo de la

serie, el último tubo no recibe la solución de antibiótico, puesto que lo utilizaremos como control de crecimiento. “Las concentraciones finales de antibióticos en esta prueba son iguales a la mitad de la serie inicial de dilución, debido al agregado de una concentración igual de inóculo en el caldo”. Se prepara un inóculo bacteriano que contenga  $10^5$  a  $10^6$  UFC/ml ajustando la turbidez de un caldo de cultivo al estándar de McFarland y diluyendo luego a 1:200 en caldo. Luego se añade 1ml del inóculo bacteriano a los tubos seriados que contengan el caldo y el antibiótico. Incubar los tubos a  $35^{\circ}\text{C}$  entre 18- 22 horas.  
(12)

## 1.2.4 CEPAS DE ESTUDIO

### 1.2.4.1 Staphylococcus aureus

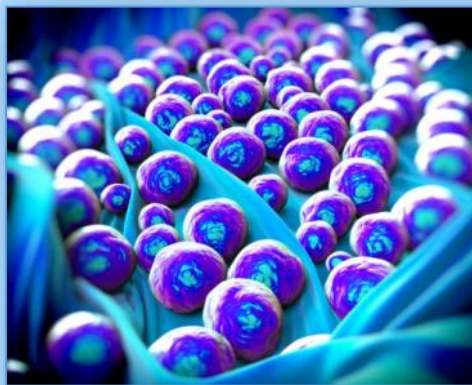


Figura N° 4: *Staphylococcus aureus*

Fuente: Bluemix <sup>(4)</sup>

*Staphylococcus aureus* es un agente etiológico de muchas patologías existentes en la actualidad, tales como infecciones al tejido blando y a la piel, endocarditis, infección del sistema nervioso central y del tracto genitourinario. <sup>(13)</sup>

Por su propagación y en función de los procedimientos médicos y uso de antimicrobianos, se confiere una importante y especial énfasis al aislamiento y su estudio epidemiológico de *S. aureus*, considerando su rol primordial en las infecciones nosocomiales. <sup>(14)</sup>

El aumento de la prevalencia de *staphylococcus aureus* resistente envuelve, un grave problema terapéutico. Estos microorganismos con sus extensos patrones de resistencia, que incluyen agentes antibacterianos de diversos grupos, han incitado la búsqueda de tratamientos alternativos en los últimos años. <sup>(14)</sup>

## ✚ CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

**Tabla N° 2: Clasificación Taxonómica del *Staphylococcus aureus*.**

Dominio:	Bacteria
Filo:	Firmicutes
Clase:	Bacilli
Orden:	Bacillales
Familia:	Staphylococcaceae
Género:	<i>Staphylococcus</i>
Especie:	<i>S. aureus</i>

Fuente: Hurtado

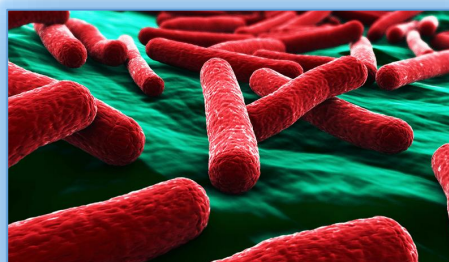
## ✚ CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

El género *Staphylococcus* está caracterizado por ser cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ , asociados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. <sup>(15)</sup>

Muy pocas cepas producen una cápsula o capa de baba que aumenta la virulencia del microorganismo. El *S. aureus* es una bacteria gram positiva, pero las células viejas y los fagocitados se tiñen como Gramnegativos <sup>(16)</sup>.

#### 1.2.4.2 *Escherichia coli*

**Figura N° 5: *Escherichia coli*.**



Fuente: Medline <sup>(5)</sup>

*Escherichia coli* está incluida a un grupo de bacterias presentes en el intestino del hombre y animales, siendo, la gran mayoría, inocuas en ellos. Sin embargo, hay algunas cepas de este microorganismo que producen toxinas, que pueden dañar el sistema gastrointestinal del ser humano. <sup>(17)</sup>

*Escherichia coli* es una bacteria gram negativa, aerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, genero *Escherichia*, que tiene características especiales como fermentar la lactosa, no degradan citrato, etc. Este microorganismo vive y se coloniza en el intestino del hombre horas después del nacimiento y es considerada un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea. Para evaluar la pertenencia a algún grupo patógeno, “Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 176 antígenos somáticos (O), 112 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno “O” es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular”. <sup>(17)</sup>

La presencia de este microorganismo en el ambiente, agua y alimentos, y considerando que forma parte de la flora normal del hombre, es considerado un gran indicador de contaminación fecal. <sup>(18)</sup>



## ✚ CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Escherichia coli*

Tabla N° 3: Clasificación taxonómica de *Escherichia coli*.

Reino:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Enterobacteriales
Familia:	Enterobacteriaceae
Género:	Escherichia
Especie:	E. coli

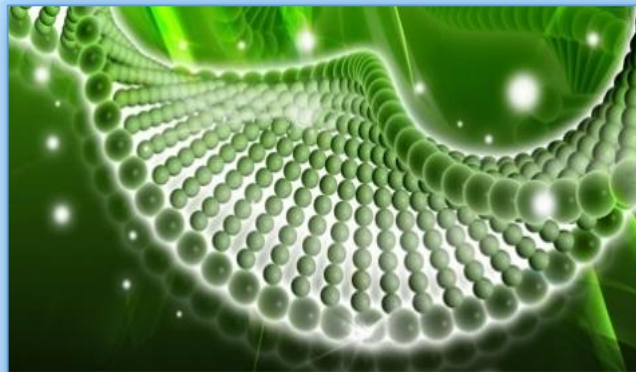
Fuente: Escherich (6)

## ✚ CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

*Escherichia coli* (*E. coli*) es una de las bacterias que está implicada en muchos estudios realizados por el ser humano, se trata de una bacteria unicelular, bacilo Gram negativo, que no forma esporas, tiene buena movilidad gracias a sus flagelos, miden 0.5  $\mu$  de ancho por 3  $\mu$  de largo, tienden a ser catalasa positiva, oxidasa positiva, y reducen los nitratos a nitritos, en general indol positivos y descarboxilan la lisina, ureasa negativa e incapaz de crecer en medio con citrato como única fuente de carbono y energía, pero sí en caldo acetato.. (18)

### 1.2.4.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Figura N° 6: *Pseudomonas aeruginosa*.



Fuente: Infectosos <sup>(7)</sup>

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram-negativa perteneciente a proteobacterias, la misma a la que pertenece *E. coli* que es la bacteria más estudiada a nivel molecular. La *aislación de estos microorganismos* puede ser de muestras de aguas contaminadas, suelos contaminados, así como de plantas, animales y hasta el ser humano. Estas cepas para el hombre son potencialmente patógenas. Este microorganismo tiene la capacidad de utilizar diferentes compuestos orgánicos para colonizarse, tiene una gran capacidad que le permite colonizar nichos en el cual los nutrientes son escasos, a diferencia de otras bacterias. Se ha reportado el aislamiento de *P. aeruginosa* de ambientes tan inhóspitos como son el combustible de avión, soluciones de clorhexidina y el jabón. <sup>(19)</sup>

La importancia que le da el hombre a *P. aeruginosa* no solo radica en la presencia de alguna patología causada por esta bacteria, si no que este microorganismo puede ser muy eficaz en el tratamiento de la contaminación ambiental. Diariamente el ser humano se encuentra en contacto con *P. aeruginosa*, ya que se halla en menores cantidades en los alimentos y en algunos artículos de limpieza. De hecho, se obtienen aislamientos de este microorganismo a partir de entre el 2 y el 8% de las heces de

personas sanas, lo que hace que el contacto sea diario con este microorganismo, pero solo puede ser una amenaza para el organismo en condiciones especiales. <sup>(19)</sup>

En pacientes quemados, en terapia intensiva y con cáncer, este microorganismo representa un problema demasiado importante en la salud en estos centros hospitalarios. Ya que este microorganismo al infectar al paciente produce muchos compuestos tóxicos, que interrumpen en el funcionamiento del sistema inmunitario del hombre. Y esto empeora, por la dificultad del tratamiento, ya que *P. aeruginosa* es muy resistente a diferentes antibióticos comerciales. <sup>(19)</sup>

#### ✚ CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE *Pseudomonas aeruginosa*

Reino:	Bacteria
Filo:	Proteobacteria
Clase:	Gammaproteobacteria
Orden:	Pseudomonadales
Familia:	Pseudomonadaceae
Género:	Pseudomonas
Especie:	<i>P. aeruginosa</i>

Fuente: Migula

#### ✚ CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS

*Pseudomonas aeruginosa* en algunos medios de cultivos tiene una características que hace que la persona que está determinando la presencia de este microorganismo se confunda; por ejemplo en medio agar Cetrimida, es un bacilo curvo o recto, aislado o en pareja o cadenas cortas, Gramnegativa (-); esta bacteria tiene motilidad positiva gracias a su único flagelo <sup>(24)</sup>.

Tiene el poder de formar biofilm, tiene un suave aroma a frutas y es la bacteria que comúnmente causa infecciones hospitalarias, especialmente en heridas, quemaduras; cuando se muestran cepas mucoides hay una alta mortalidad en casos de fibrosis quística <sup>(19)</sup>.

### 1.3 DEFINICIÓN DE TERMINOS

- ✚ **ANTIMICROBIANO:** Cualquier sustancia natural, semi-sintética o de origen sintético que inhibe el metabolismo y/o el crecimiento de un microorganismo y puede matarlo.
- ✚ **ESTÁNDAR DE MCFARLAND:** El Estándar 0,5 de McFarland corresponde a aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  CFU/mL. Es usado cuando se ajustan suspensiones del inóculo para pruebas de susceptibilidad.
- ✚ **EXTRACTO ETANOLICO:** Es el resultado de la maceración de la planta con un solvente (Etanol).
- ✚ **SCREAM FITOQUIMICO:** Son las pruebas que se realiza a los extractos de plantas biológicamente activas, para encontrar o demostrar que tipos de compuestos beneficiosos para la salud tienen.

## CAPÍTULO II: HIPÓTESIS Y VARIABLES

### 2.1 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

- ✚ El extracto etanólico de la corteza de *Tynanthus panurensis* (CLAVO HUASCA) tiene actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 por los métodos de difusión en agar y macrodilución.

## 2.2 VARIABLES Y SU OPERACIONALIZACIÓN TIPO Y DISEÑO

Variable Independiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Índices	Escala de Medición	Tipo de Variable
<b>Extracto etanólico de <i>Tynanthus panurensis</i> (Clavo huasca).</b>	Producto obtenido mediante el método de extracción con etanol, de la corteza de la liana de <i>Tynanthus panurensis</i> (Clavo huasca)	Obtención del extracto etanólico de <i>Tynanthus panurensis</i> (Clavo huasca).	Extracto etanólico de <i>Tynanthus panurensis</i> : Concentración baja: 18 mg/mL Concentración media: 24 mg/mL Concentración alta: 30 mg/mL	Presencia de metabolitos secundarios	Ensayos: Drangendorff Burchardart Bontrager Baljet Fehling Espuma Cloruro férrico Ninhidrina Shinoda Kedde	Cualitativo

Variable Dependiente	Definición Conceptual	Definición Operacional	Indicador	Índices	Escala de Medición	Tipo de Variable
<b>Actividad antibacteriana</b>	Capacidad de matar /destruir/inactivar bacterias, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena.	Consiste en cuantificar la inhibición del crecimiento bacteriano producido en el extracto etanólico en estudio, utilizando discos de sensibilidad con antibacterianos.	Halo de inhibición que se produce en los cultivos inoculados con, <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , utilizando discos de sensibilidad con antibacterianos.	Sensible: Esta categoría implica que una infección dada por la cepa en estudio puede ser tratada con la dosis de extracto recomendado para el tipo de infección y la especie infectante.	S	Cuantitativa
				Intermedia: Esta categoría incluye cepas que puedan ser inhibidas por concentraciones de extracto más elevado.		
			Resistente: Las cepas resistentes no son inhibidas por las concentraciones séricas normalmente alcanzadas a dosis habituales.	R		
			Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del Extracto etanólico de <i>Tynanthus panurensis</i> (Clavo huasca) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Grado de turbidez 10 <sup>2</sup> y 10 <sup>6</sup> ufc/ml	UFC/ml.	Cualitativa

## CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

### 3.1 MÉTODO Y DISEÑO DE ESTUDIO

El método a emplearse fue experimental-descriptivo.

- Es **experimental**, porque es de tipo longitudinal, analítico y de nivel investigativo “explicativo” (considera una relación de causa - efecto). Se refiere a la manipulación deliberada de una o más variables independientes para analizar las consecuencias de esa manipulación sobre una o más variables dependientes, dentro de una situación de control para el investigador.
- Es **descriptivo**, porque el análisis es estadístico univariado porque solo describe o estima parámetros en la población de estudio a partir de una muestra.

#### **Diseño para la actividad antibacteriana.**

Se aplicó un diseño factorial completamente aleatorizado con dos variables o factores, de los cuales F1 tiene tres niveles y F2 tiene un nivel. Cada uno de los tratamientos tuvo tres repeticiones. Los extractos fueron de la corteza de la planta.

F1 = Concentración de Extracto

- A = Concentración baja ( 1300 mg/ml)
- B = Concentración media (1500mg/ml)
- C = Concentración alta (1700 mg/ml)

F2 = Extractos y compuestos.

- A = Etanólico

Por lo tanto se tuvo el siguiente diseño:

3 x 1= 3 tratamientos x 3 repeticiones = 9

Experimentos para cada método para evaluar la actividad antibacteriana del extracto.



## 3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

### 3.2.1 POBLACIÓN VEGETAL

Nuestra población fue la planta *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca); las cuales fueron recolectadas del Centro Experimental de Plantas Medicinales (Jardín Botánico Arborem) de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la UNAP ubicado en la Carretera de Zungarococha (3°50'14.6"S 73°22'09.9 Ciudad Universitaria), del distrito de San Juan Bautista, provincia de Maynas, del departamento de Loreto.

✚ **Muestra Vegetal:** Como muestra se utilizó 2 kilogramos de la corteza de *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca).

### 3.2.2 POBLACIÓN MICROBIOLÓGICA

✚ **Muestra microbiológica:**

Las muestras microbiológicas estuvieron conformadas por las bacterias:

- ✓ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- ✓ *Escherichia coli* ATCC 25922.
- ✓ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

### 3.2.3 CONTROLES POSITIVOS:

Los controles a utilizar fueron los antibióticos: Gentamicina, ciprofloxacino, meropenem, y vancomicina procedentes del Laboratorio BIODISC (Lima-Peru).

### 3.2.4 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- ✚ Se utilizó solamente las plantas adultas de *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca).
- ✚ Se utilizaron las plantas de *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca) que estuvieron identificados taxonómicamente por un profesional botánico.
- ✚ Las bacterias que utilizamos (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853),

fueron caracterizadas bioquímica y morfológicamente, y solo se utilizó las bacterias que se encuentran en fase de crecimiento logarítmico.

### 3.2.5 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- ✚ Se excluyó las plantas pequeñas en el experimento.
- ✚ No se utilizaron las cepas, después de la fase logarítmica de crecimiento.

### 3.3 DISEÑO DE MUESTRAL

- ✚ Se obtuvo el extracto etanólico de la corteza de *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca) para posteriormente realizar el tamizaje fitoquímico.
- ✚ Se evaluó la actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 por los métodos de difusión en agar y macrodilución.

### 3.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

La parte experimental del proyecto se desarrolló en los laboratorios instalados en la Planta Piloto de la Facultad de Industrias Alimentarias de la UNAP, contando para ello, la infraestructura y equipos necesarios para la extracción, secado y aislamiento de los productos.

#### 3.4.1 INFRAESTRUCTURA

- ✚ Laboratorio de Ingeniería de alimentos – FIA – UNAP.
- ✚ Laboratorio de Microbiología de Alimentos – FIA – UNAP.
- ✚ Biblioteca Especializada de la Facultad de Farmacia y Bioquímica – UNAP.
- ✚ Biblioteca Central de la UNAP.

### 3.4.2 EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

#### 3.4.2.1 EQUIPOS

EQUIPO			
N°	EQUIPOS	MARCA	PROCEDENCIA
01	BALANZA ANALÍTICA MAX= 320 G	SARTORIUS	ALEMANIA
02	VORTEX	MCR	-
03	CAMPANA EXTRACTORA	C4	COLOMBIA
04	ROTAVAPOR	BÜCHI	ALEMANA
05	ESTUFA DE AIRE CALIENTE	HOT AIR OVEN	TAIWAN
06	AUTOCLAVE	GEMMY	-
07	CÁMARA DE FLUJO LAMINAR VERTICAL	NUAIRE	-
08	COCINA ELÉCTRICA	FINEZZA	-
09	INCUBADORA	MEMMERT	-
10	REGLA VERNIER	PRETUL	-
11	REFRIGERADOR	MABE	-
12	BALANZA DE PLATILLOS CAPAC. 1 Kg	-	-
13	BOMBA DE VACÍO	THERMO SCIENTIFIC	ALEMANA

#### 3.4.2.2 MATERIALES DE VIDRIO

MATERIALES DE VIDRIO				
N°	MATERIALES	MARCA	MODELO	PROCEDENCIA
1	PROBETAS 10 ML, 100 ML, 250 ML	BRAND	-	ALEMANA
2	PIPETA VOLUMÉTRICAS 1 ML	MC	-	ALEMANA
3	EMBUDOS	KIMAX	-	USA
4	MATRAZ ERLLENMEYER	NORMAX	-	PORTUGAL
5	FIOLAS 10 ML COLOR AMBAR	KYNTTEL	-	ALEMANA
6	PLACAS PETRI	-	-	ALEMANA
7	TUBOS DE ENSAYO DE 5 Y 10 ML	KIMAX	-	USA
8	VASOS DE PRECIPITADO DE 5, 10, 50 Y 100 ML	MARIENFELD	-	ALEMANA
9	ESPÁTULAS DE DRIGALSKY	-	-	-

### 3.4.2.3 MATERIALES DE METAL, PLASTICO, DE BIOSEGURIDAD Y OTROS MATERIALES

MATERIALES DE PLASTICO Y METAL				
N°	MATERIALES	MARCA	MODELO	PROCEDENCIA
10	MICROTUBOS DE 1,5 ML	ISOLAB	-	ALEMANA
11	TIPS PARA MICROPIPETAS DE 100 Y 500 µl	-	-	-
12	MICROPIPETAS 100, 500 Y 1000 µl	DragonLab	11120618	EEUU
13	CUBETA DE CUARZO UV-VISIBLE 1,5 ml	LOT.	-	ALEMANA
14	BURETAS CON AGUA DESTILADA	-	-	-
15	GRADILLAS PARA MICROTUBOS	-	-	-
16	vGRADILLA METÁLICA	-	-	-
17	PINZA ESTÉRIL	-	-	-
18	CUCHILLO MEDIANO	-	-	-
19	ASA DE KOLLE	-	-	-

### 3.4.2.4 MATERIALES DE BIOSEGURIDAD

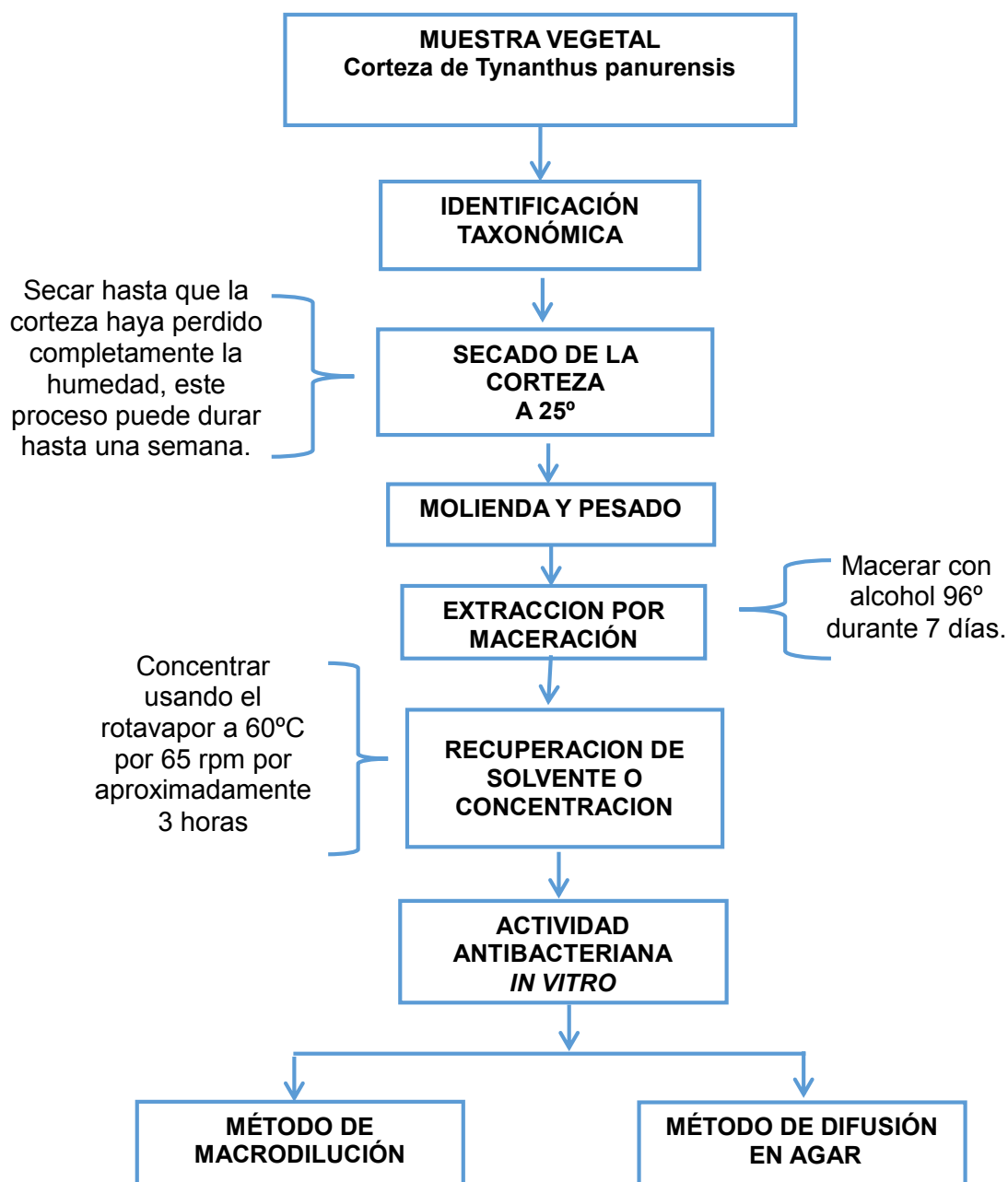
MATERIALES DE BIOSEGURIDAD				
20	MANDILES MEDIC	-	-	
21	MASCARILLA N° 78	FAMILY DOCTOR	-	
22	LENTE DE PROTECCION	-	-	
23	GUANTES QUIRURGICOS ESTERILES DESCARTABLES	-	-	
OTROS MATERIALES				
24	ESCOBILLA LAVA TUBOS	-	-	
25	ALGODÓN	-	-	
26	DETERGENTE	-	-	
27	LEGIA	-	-	
28	GUANTES PARA LAVAR	-	-	
29	PAPEL ALUMINIO	-	-	
30	PAPEL DE DESPACHO	-	-	
31	PAPEL TOALLA	-	-	
32	PARAFILM	-	-	
33	PLUMON MARCADOR	-	-	

### 3.4.2.5 MEDIOS DE CULTIVO Y REACTIVOS

N°	REACTIVO/MEDIO DE CULTIVO	PUREZA	MARCA
01	ETANOL AR	96°C	LOBACHEMIE
02	CLORURO DE SODIO	0.9%	BRAUN
03	McFARLAND	-	-
04	AGAR MULLER HINTON	-	MERCK
05	AGAR NUTRITIVO	-	MERCK
06	AGAR TRIPTACASA DE SOYA (TSA)	-	
07	CALDO MULLER HINTON (MH)	-	OXOID
08	CALDO NUTRITIVO	-	MERCK
09	GENTAMICINA	-	BIODISC
10	CIPROFLOXACINO	-	BIODISC
11	MEROPENEM	-	BIODISC

### 3.4.3 PROCEDIMIENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

#### 3.4.3.1 FLUJOGRAMA DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA CORTEZA DE *Tynanthus panurensis* (CLAVO HUASCA) Y DE LA EVALUACION DE SU ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.



FUENTE: MANUAL DE FITOQUIMICA. (21)

### 3.4.3.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ETANOLICO

- ✚ **Materia prima:** Es la población vegetal que se utilizó para realizar el extracto etanólico. La cual se procedió a cortarla y extraer la corteza y dejarla secar a temperatura ambiente por 7 días aproximadamente. <sup>(21)</sup>
- ✚ **Pesado:** Consistió en pesar la muestra ya secada para obtener datos exactos de rendimiento. <sup>(21)</sup>
- ✚ **Maceración:** La muestra ya pesada se le adicionó etanol al 96 % hasta enrazar en un recipiente de vidrio, dejando macerar por 5 a 7 días. <sup>(21)</sup>
- ✚ **Concentración:** El disolvente fue removido a 60°C, -750 mbar de presión reducida en un rotavapor a 65 rpm, se completó la eliminación del disolvente residual secado a temperatura ambiente y exenta de luz. <sup>(21)</sup>
- ✚ **Envasado:** Un vez que se obtuvo el extracto etanólico seco, se colocó en envases de vidrio con tapa hermética. <sup>(21)</sup>

### 3.4.3.3 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

La actividad antibacteriana se determinó utilizando Difusión por Disco y el método de dilución en caldo. Se empleó la metodología por difusión, la referida habitualmente como el método de "Kirby-Bauer". Las tablas de interpretación fueron tomadas de las normas M2 – A7 del National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) <sup>(11)</sup>.

Las pruebas que utilizan medios líquidos han sido muy aplicadas a lo largo del tiempo. Los procedimientos están inmersos en la utilización de tubos seriados con volúmenes de caldos de por lo menos 1ml. La NCCLS publicó un estándar del método en los años 70. En el cual esta técnica fue llamada macrodilución en caldo. Esta miniaturización simple de la técnica se conoció como macrodilución en caldo. <sup>(11)</sup>

### **3.4.3.3.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR**

#### **A) DILUCION DEL EXTRACTO**

Para la dilución del extracto etanólico de la corteza del *Tynanthus panurencis* (Clavo Huasca), se procedió a pesar 0.65, 0.75 y 0.85 gramos del extracto en microtubos de tipo spondorf completamente estériles, y se añadió 0.5 ml de una mezcla de etanol/agua estériles en un concentraciones 1:1, luego se llevó al vortex hasta homogenizar completamente la dilución, llegando a obtener concentraciones del extracto de 1300, 1500, y 1700 mg/ml, siguiendo el procedimiento, se procedió con ayuda de una micropipeta, a impregnar 20ul del extracto ya diluido en discos de papel whatman estériles. <sup>(11)</sup>

#### **B) PREPARACIÓN DE LOS CONTROLES**

Para las pruebas realizadas, se utilizaron discos con los antibióticos gentamicina 10 µg/ml, ciprofloxacino 5 µg/ml, meropenem 10 µg/ml, y vancomicina 30 ug/ml, como control positivo; para el control negativo se utilizó la solución etanol/agua utilizada en la dilución del extracto. <sup>(11)</sup>

#### **C) ACTIVACIÓN DE CULTIVOS EN AGAR**

Con ayuda de una asa bacteriológica se procedió a activar las cepas bacteriana en congelación de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, tomando una asada de ellas, la cual inoculamos en tubos con caldo nutritivo, y se procedió a incubar a temperatura entre 35 – 37 °C durante 18 a 24 horas, pasado el tiempo de incubación se realizó el aislamiento de colonias utilizando Agar Muller Hinton. <sup>(11)</sup>



## D) PREPARACIÓN DEL INÓCULO

De las placas de agar Muller Hinton con colonias aisladas individuales, se procedió a seleccionar de 3 a 4 colonias, las cuales con una asa de siembra bacteriológica fueron transferidas a tubos que contienen 5 ml de cloruro de sodio al 0.9% comparando visualmente se llegó a la turbidez del estándar 0,5 de la escala de McFarland, pudiendo decir que la suspensión preparada contiene aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.<sup>(11)</sup>

## E) INOCULACIÓN DE LAS PLACAS

Figura N° 7: Placa Petri con el inóculo bacteriano.



Esparcido del inóculo bacteriano sobre la superficie del agar

Fuente: Microbiologia\_equipos <sup>(8)</sup>

Alrededor de los 15 minutos posteriores al ajuste de la turbidez del inóculo bacteriano, se procedió con ayuda de una micropipeta esteril a tomar 0.1 ml del inóculo bacteriano y verterlos en la placa con agar Muller Hinton previamente preparadas, con ayuda de una espátula de drigalsky se procedió a esparcir el inóculo por toda la placa Petri, dejando reposar unos 3 a 5 minutos para quitar el exceso de humedad.

## **F) APLICACIÓN DE LOS DISCOS**

Se aplicó los discos impregnados con el extracto en la superficie del medio de cultivo, con la ayuda de una pinza estéril, y asegurándose que el disco este en completo contacto con el agar. Se trató de distribuir los disco uniformemente, de modo de modo que se encontraron en una distancia de 25 mm uno del otro, es recomendable que a la hora de colocar los disco en el agar estos no superen la cantidad de 12 discos en placas de 150 mm y no más de 6 disco en placas de 10 mm, para evitar de esta manera que los halos de inhibición de cada disco choquen entre sí. Tener en cuenta que los discos una vez que tomo contacto con la superficie del agar no deben ser removidos, debido a la difusión rápida de los antibióticos o compuestos bioactivos que pueda haber en los discos. <sup>(11)</sup>

## **G) INCUBACIÓN**

Una vez aplicado los discos se dejó reposar por 15 minutos aproximadamente, luego lo invertimos e incubamos a 35°C durante 18 – 24 horas. <sup>(11)</sup>

## **H) LECTURA DE LAS PLACAS E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**

Pasado el tiempo de incubación se procedió a medir las zonas de inhibición incluyendo el diámetro del disco, utilizamos una regla vernier. Con ayuda de una muy buena fuente de luz se iluminó la parte posterior de la placa Petri, en un fondo negro, para mejorar la lectura. <sup>(11)</sup>

## I) PROCEDIMIENTOS DE RECATEGORIZACIÓN

- ✚ Para los principales antibióticos, los valores críticos de las concentraciones bajas (c) y altas (C) y de sus diámetros correspondientes (d, D), permiten la categorización según los siguientes criterios:

Categorías	Concentración inhibitoria mínima (mg/L)	Diámetro del halo de inhibición (mm)
S	$CIM \leq c$	$DHI \geq D$
R	$CIM > C$	$DHI < d$
I	$c < CIM \leq C$	$d \leq DHI < D$

Fuente: Instituto Nacional de Salud.

- ✚ Por otra parte, la lectura interpretativa del antibiograma, fundada en el conocimiento de los antibiogramas –Son los patrones genéticos de resistencia o sensibilidad de cada bacteria- de sensibilidad y resistencia, permite recategorizar un resultado inicialmente S en I o R debido al riesgo del fracaso terapéutico. Esta lectura interpretativa requiere la identificación correcta de la bacteria y una correcta realización del antibiograma. <sup>(11)</sup>

### 3.4.3.3.2 METODO DE MACRODILUCIÓN

#### A) DILUCION DEL EXTRACTO

Para la dilución del extracto etanólico de la corteza del *Tynanthus panurencis* (Clavo Huasca), se procedió a pesar 0.64 gramos del extracto en un microtubo de tipo spondorf completamente estéril, y se le diluyó en 1 ml de una mezcla de etanol/agua estéril en concentraciones 1:1, luego se llevó al vortex hasta homogenizar completamente la dilución, alcanzando de este modo una concentración de 640 mg/ml (solución madre o stok). Por consiguiente se sacó 0.1 ml de la solución stock para ser añadido al microtubo N° 01 que contenía 0.9 ml de caldo Muller Hinton; del tubo N° 01 se sacó 0.5 ml para ser añadido al tubo N° 02, se realizó

este paso sucesivamente hasta llegar al tubo N° 08; y desde este mismo tubo se sacó 0.5 ml que fue desechado. <sup>(12)</sup>

Después de realizar todo el proceso de preparación de las diluciones con el extracto se añadió a todos los tubos 0.5 ml de la suspensión bacteriana, llegando a un volumen final de 1 ml en cada tubo, y las concentraciones estuvieron comprendidas entre los rango 32 mg/ml a 0.25 mg/ml. <sup>(12)</sup>

## **B) PREPARACION DEL INÓCULO**

Guiándonos en la prueba anterior se procedió a preparar el inóculo, donde de las placas de agar Muller Hinton con colonias aisladas individuales, se procedió a seleccionar de tres a 4 colonias, las cuales con una asa de siembra bacteriológica fueron transferidas a tubos que contienen 5 ml de cloruro de sodio al 0.9% comparando visualmente se llegó a la turbidez del estándar 0,5 de la escala de McFarland, pudiendo decir que la suspensión preparada contiene aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL de los microorganismos en estudio <sup>(14)</sup>, luego se procedió a realizar la dilución del extracto llegando a una concentración aproximadamente de  $5 \times 10^5$  UFC/ml de microorganismos en cada microtubo. La aplicación de la suspensión bacteriana se debe realizar entre los 10 a 15 minutos una vez preparada, evitando de esta manera que los microorganismos se repliquen. <sup>(12)</sup>

### **C) PREPARACIÓN DE CONTROLES**

Como controles positivos para esta prueba se utilizó los antibióticos Gentamicina (FARMAINDUSTRIA) en concentraciones 160 mg/2 ml, Ciprofloxacino (NIRLIFE) 200mg/100ml, Meropenem (PHARMAGEN) 500mg/10 ml, vancomicina (FARMAINDUSTRIA) 500 mg/10 ml, las cuales se prepararon diluyéndolos con agua estéril hasta llegar a una concentración madre o stock de 10240 ug/ml, a excepción del antibiótico ciprofloxacino que ya viene diluido en concentración de 200mg/100ml la cual fue nuestra solución stock; para la dilución de meropenem, y vancomicina se realizó la reconstitución de las ampollas en polvo agregando 10 ml de agua estéril, obteniendo de esta manera una concentración de 500mg en 10 ml, para llegar a la concentración madre o stock de 10240ug/ml, se sustrajo de la ampolla reconstituida 1ml (50mg/ml) y se añadió a un matraz estéril, luego se agregó 4.88 ml de agua esterilizada llegando de esta forma a nuestra solución stock; para el antibiótico gentamicina, de la ampolla que contiene 160mg/2ml se sustrajo 0.64ml y se enrasó con agua estéril en un matraz de erlenmeyer hasta llegar a 5 ml de volumen, llegando a nuestra concentración madre o stock. <sup>(12)</sup>

De las soluciones madre se sacaron 0.1 ml y se le añadió al tubo N° 01 que contenía 0.9 ml de caldo Mueller Hinton, del tubo N° 01 se sacó 0.5 ml para ser añadido al Tubo N° 02, y así consecutivamente hasta llegar al tubo N° 09, desde este mismo tubo se desechó 0.5ml del volumen total; después de este proceso se añadió a todos los tubos 0.5 ml de la suspensión bacteriana, las concentraciones estuvieron comprendidas entre los rangos de 512 µg/ml a 25 µg/ml. <sup>(12)</sup>

### **D) COLOCACIÓN DEL INÓCULO EN LOS TUBOS CON CALDOS**

Se agregó 0.5 ml del inóculo estandarizado a cada tubo de dilución del extracto y de controles, y se homogenizó la mezcla. <sup>(12)</sup>

## **E) INCUBACIÓN**

El tiempo de incubación para la mayoría de los microorganismos fue de 16 a 20 horas, para la técnica de macrodilución. <sup>(12)</sup>

## **F) LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LA CMI**

La CMI corresponde a la mínima concentración utilizada del antibiótico o muestra en estudio, donde no se observó crecimiento bacteriano (turbidez). La CMI se expresó en  $\mu\text{g/ml}$ . <sup>(12)</sup>

### **3.4.4 PROCESAMIENTO Y ANALISIS DE DATOS**

Para el procesamiento de los datos obtenidos se utilizó el programa Microsoft Excel 2010, con el cual logramos, obtener los cuadros de frecuencia, mediana, desviación estándar, gráficos (barras, y gráficos).

## CAPÍTULO IV: RESULTADOS

### 4.1.1 RESULTADOS

#### 4.1.1.1 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO VEGETAL.

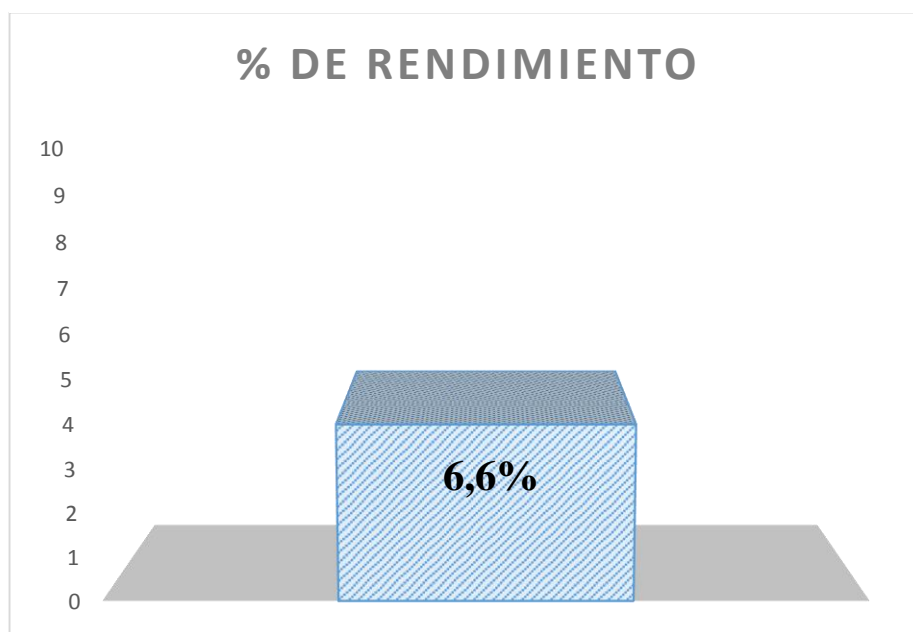
##### 4.1.1.1.1 DETERMINACIÓN DEL RENDIMIENTO DEL EXTRACTO DE *Tynanthus panurensis* (Clavo Huasca).

**Tabla N° 4:** Rendimiento del extracto etanólico de las hojas de *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca).

PARTE DE LA PLANTA	CANTIDAD DE MUESTRA VEGETAL	CANTIDAD DE MUESTRA SECA PARA MACERACIÓN	CANTIDAD OBTENIDA DE EXTRACTO ETANÓLICO	PORCENTAJE DE RENDIMIENTO
HOJA	2000g	1000g	66g	6.6 %

En la Tabla N°4 observamos que se utilizó 2000 gramos de muestra vegetal utilizada para obtener el extracto etanólico; así mismo, de 1000 gramos de muestra seca macerada en alcohol 96%, se obtuvo 66 gramos de extracto etanólico, obteniendo un rendimiento del 6.6%.

**Grafico N° 1:** Porcentaje de rendimiento del extracto etanólico del *Tynanthus panurensis*.



#### 4.1.1.1.1 DETERMINACIÓN DE METABOLITOS DEL EXTRACTO DE *Tynanthus panurensis* (Clavo Huasca).

**Tabla N° 5:** Marcha Fitoquímica del extracto etanólico de la corteza de *tynanthus panurensis* (Clavo huasca).

Compuestos	Extracto
Alcaloide	+
Saponinas	-
Esteroides	-
Triterpenos	-
Taninos	++
Fenoles	-
Flavonoides	+++
Quinonas	-
Lactona	+
Aminas y aminoácidos	-
Cumarinas fija	+
Cumarinas volátiles	-

(+++): Abundante; (++): Moderado; (+): Leve; (0): Ausente.

Teniendo en cuenta los resultados del tamizaje fitoquímico de la Tabla N° 5, se puede afirmar que el extracto de la corteza de *tynanthus panurensis* (Clavo huasca) presenta abundante concentración de flavonoides, media concentración de taninos, y poca concentración de alcaloides, lactonas y cumarinas.



**4.1.1.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA CORTEZA DE *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca).**

**4.1.1.2.1 MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR**

**Tabla N° 6:** Actividad antibacteriana del extracto etanólico de la corteza de *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca) frente a *Escherichia coli*, *Pseudomons aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

BACTERIA	EXTRACTO (1300 mg/ml)		EXTRACTO (1500 mg/ml)		EXTRACTO (1700 mg/ml)	
	DIÁMETRO mm	RESULTADO	DIÁMETRO mm	RESULTADO	DIÁMETRO mm	RESULTADO
<i>Escherichia coli</i>	0 ± 0	RESISTENTE	0 ± 0	RESISTENTE	0 ± 0	RESISTENTE
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	0 ± 0	RESISTENTE	0 ± 0	RESISTENTE	0 ± 0	RESISTENTE
<i>Staphylococcus aureus</i>	7 ± 0.4	RESISTENTE	9 ± 0	RESISTENTE	11 ± 0.0	RESISTENTE

\* Esquema de los Diámetros de la Zona de Inhibición:

Resistente: < 12 mm

Intermedio: 13 a 14 mm

Sensible: > 15 mm

Fuente: Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud del Perú. 2002. "Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana Por el método de disco difusión" <sup>(14)</sup>

La tabla N° 6 nos muestra que el extracto etanólico de la corteza de *Tynanthus panurensis* (Clavo Huasca) a concentraciones de 1300 mg/ml, 1500 mg/ml, 1700 mg/ml frente a *Escherichia coli*, y *Pseudomonas aeruginosa*, no presento ningún halo de inhibición, diciendo de este modo que las bacterias estudias son resistente al extracto.

Con respecto a *Staphylococcus aureus*, se encontraron halos de inhibición de 7, 9, y 11 mm, a concentraciones de 1300, 1500, y 1700 mg/ml respectivamente, reportando según la bibliografía utilizada que *Staphylococcus aureus* es resistente al extracto etanólico de *Tynanthus panurencias* (Clavo huasca).

**Tabla N° 7:** Actividad antibacteriana de los controles positivos meropenem 10 µg, ciprofloxacino 5 µg, gentamicina 10 µg y vancomicina 30 µg frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

BACTERIA	MEROPENEM 10 µg		CIPROFLOXACINO 5 µg		GENTAMICINA 10 µg		VANCOMICINA 30 µg	
	DIÁMETRO mm	RESULTADO	DIÁMETRO mm	RESULTADO	DIÁMETRO mm	RESULTADO	DIÁMETRO mm	RESULTADO
<i>Escherichia coli</i>	23.0 ± 0.0	SENSIBLE	22.0 ± 0.0	SENSIBLE	22.0 ± 0.6	SENSIBLE	0	RESISTENTE
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25.3 ± 0.6	SENSIBLE	31 ± 0.4	SENSIBLE	16 ± 0.6	SENSIBLE	0	RESISTENTE
<i>Staphylococcus aureus</i>	28 ± 0.6	SENSIBLE	34 ± 0.0	SENSIBLE	22 ± 0.4	SENSIBLE	20 ± 0.6	SENSIBLE

\* Esquema de los Diámetros de la Zona de Inhibición:

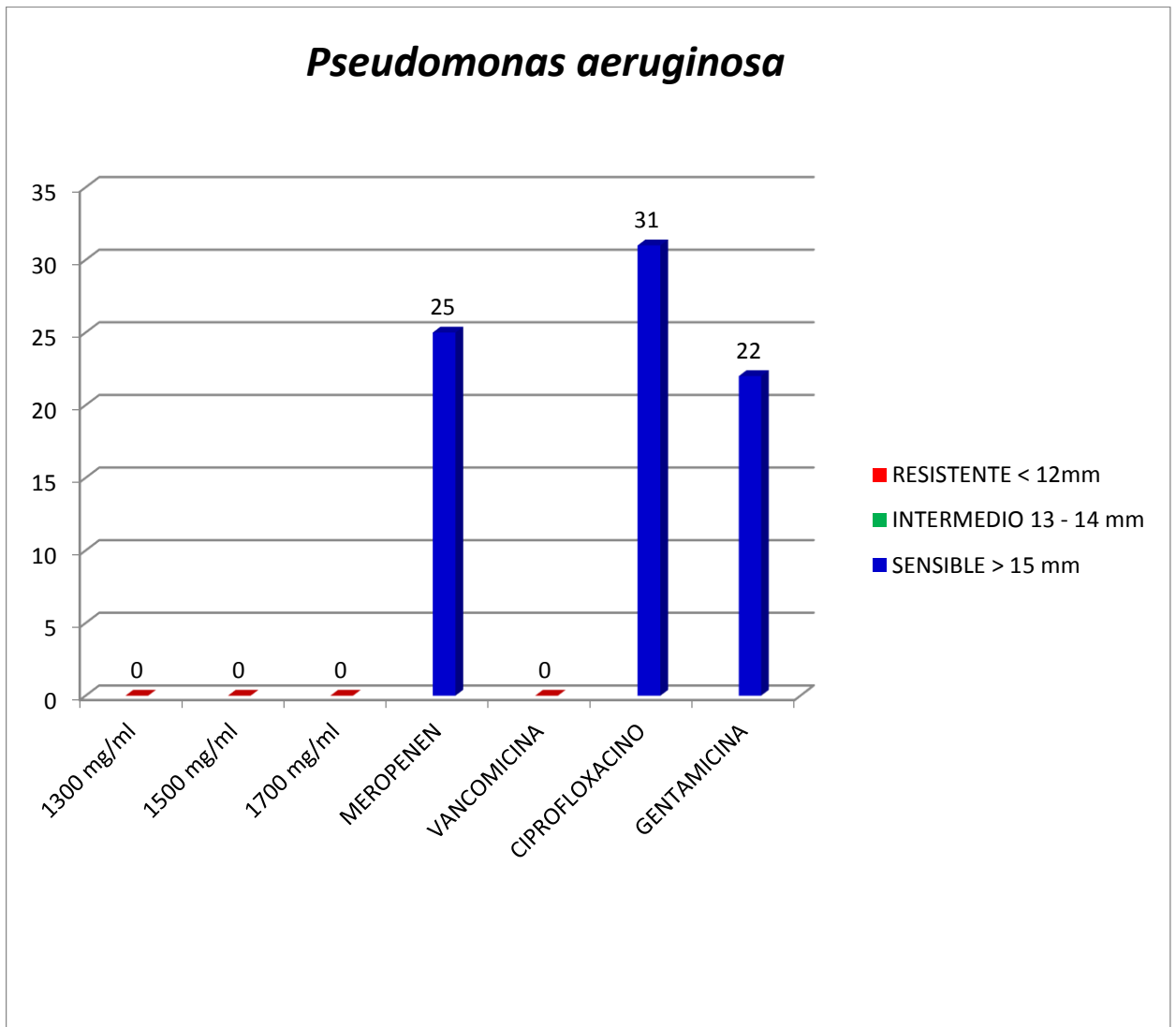
Resistente: < 12 mm  
 Intermedio: 13 a 14 mm  
 Sensible: > 15 mm

Fuente: Instituto Nacional de Salud, Ministerio de Salud del Perú. 2002. “Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana Por el método de disco difusión.”<sup>(11)</sup>

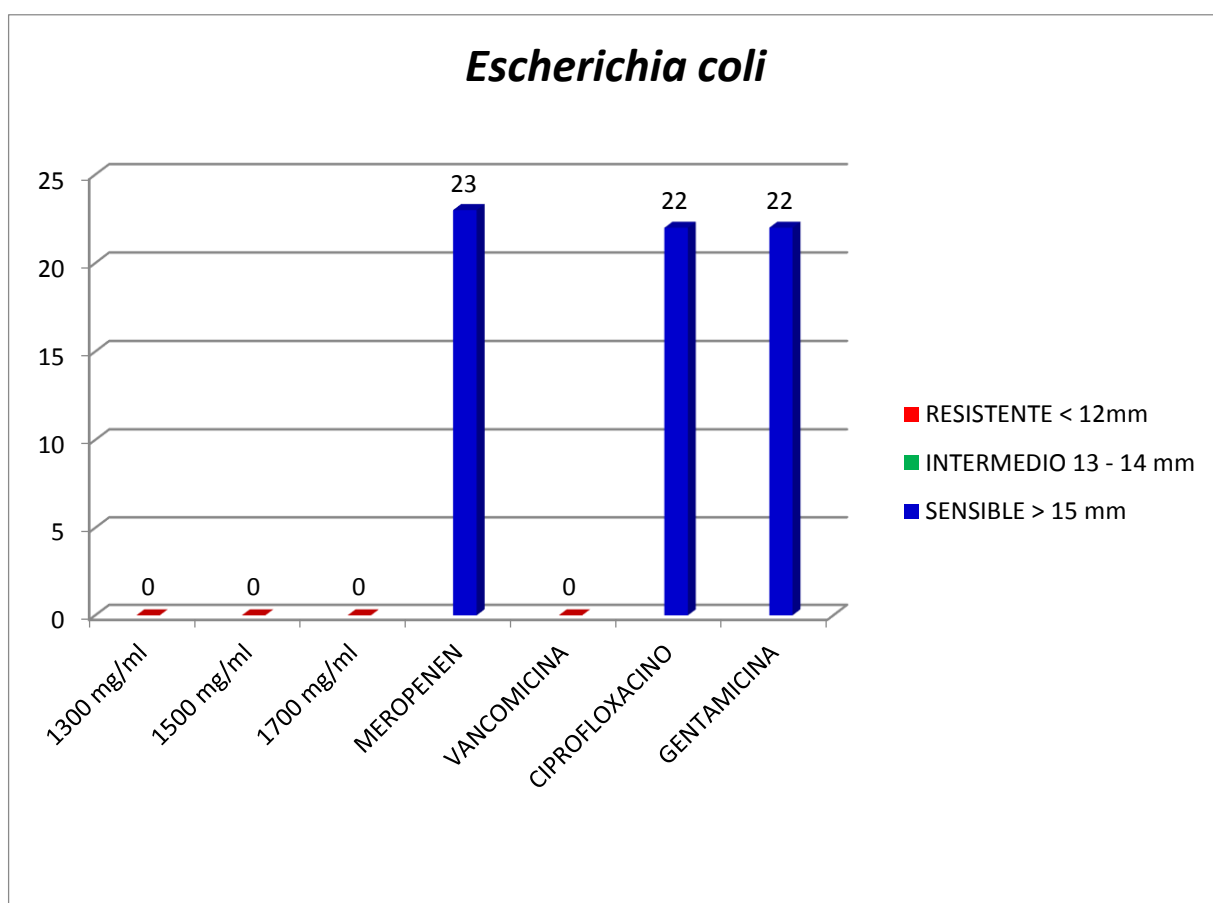
En la TABLA N° 7 observamos que los controles positivos meropenem, ciprofloxacino, y gentamicina frente a *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, tuvieron halos de inhibición con actividad antibacteriana Sensible, a excepción del antibiótico vancomicina, quien tuvo actividad antimicrobiana resistente frente a *Escherichia coli*, y *Pseudomona aeruginosa*, y sensible para *Staphylococcus aureus*.

En los gráficos siguientes observamos la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la corteza de *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca) y de los controles positivos meropenem 10 µg, ciprofloxacino 5 µg, gentamicina 10 µg y vancomicina 30 µg, frente a las cepas bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*:

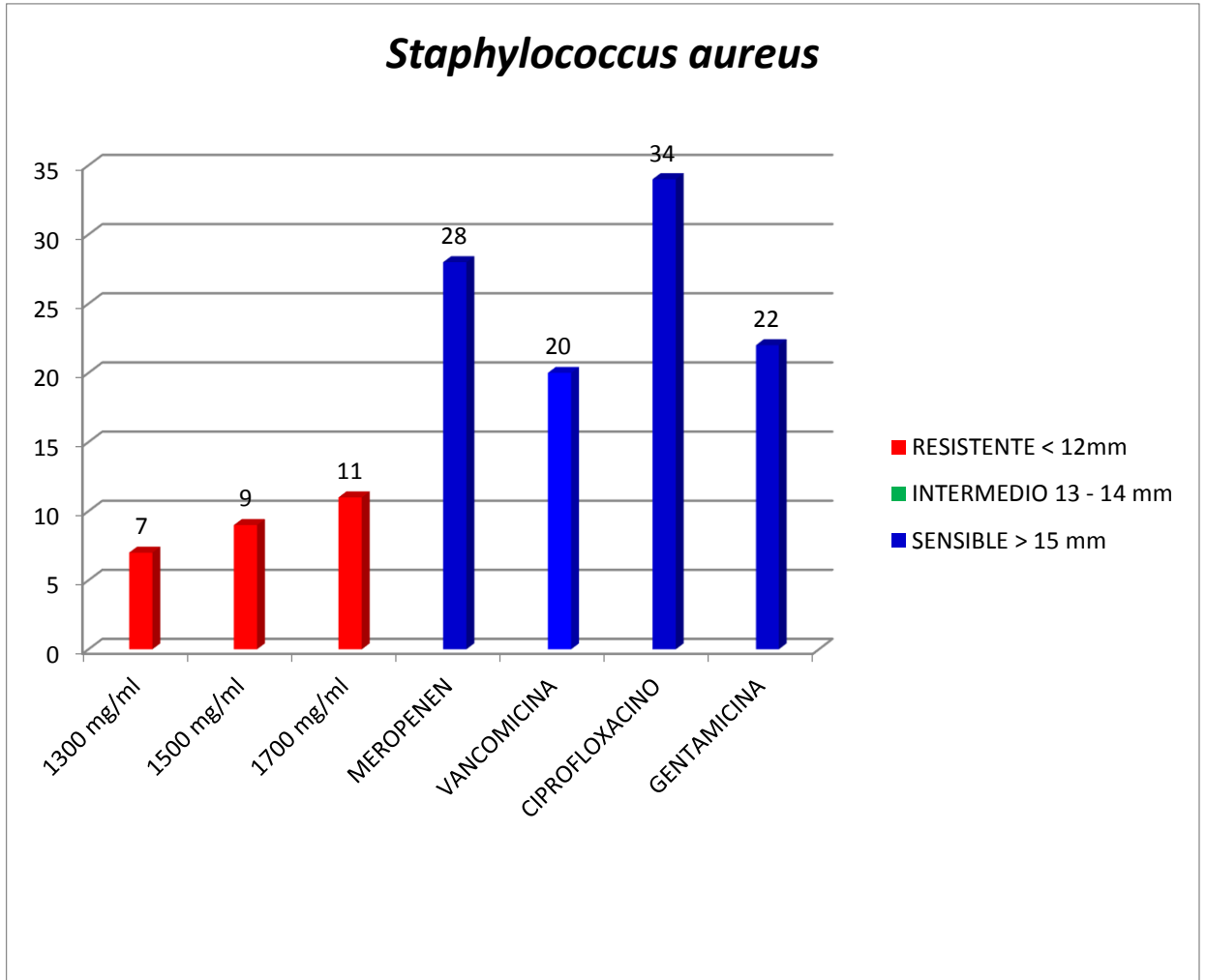
**Grafico N° 2:** Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca) frente a *Pseudomonas aeruginosa* según diámetro de la zona de inhibición.



**Grafico N° 3:** Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca) frente a *Escherichia coli* según diámetro de la zona de inhibición.



**Grafico N° 4:** Actividad antibacteriana y Categorización del extracto etanólico de hojas de *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca) frente a *Staphylococcus aureus* según diámetro de la zona de inhibición.



#### 4.1.1.2.2 MÉTODO DE MACRODILUCIÓN

##### 4.1.1.2.2.1 CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

**Tabla N° 8:** Actividad antibacteriana del extracto etanólico de la corteza de *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca) según Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aureginosa*.

BACTERIA EN ESTUDIO	DILUCIÓN POR TUBO	CMI	RESULTADO (*)
<i>Staphylococcus aureus</i>	C1	32 mg/ml	INACTIVO
<i>Escherichia coli</i>	-	-	INACTIVO
<i>Pseudomonas aureginosa</i>	-	-	INACTIVO

\* Actividad antimicrobiana / Valor de CMI

Inactivo : > 16 mg/ml

Poco Activo : 6 - 15 mg/ml.

Moderadamente activo : 1- 5 mg/ml.

Buena Actividad : < 1 mg/ml.

Fuente: Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana IMET – ESSALUD 2007.

En la **Tabla N° 8**, se muestran los resultados de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la corteza de *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca), donde se observa que frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, tuvo una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) Inactivo puesto que se pudo apreciar turbidez (crecimiento bacteriano) en todas las diluciones realizadas, a excepción de *Staphylococcus aureus* que mostró un CMI en la concentración 32mg/ml dando como resultado Inactivo.

## CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

### 5.1 DISCUSIÓN

- ✚ Al realizarse el tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de la corteza de *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca), se encontró abundante concentración de flavonoides; media concentración de taninos, y poca concentración de alcaloides, lactonas y cumarinas. Morales L. et al (2013), en su investigación al realizar la marcha fitoquímica, encontraron la presencia de saponinas, en concentraciones altas fenoles y flavonoides. También desarrollaron pruebas *in vitro* las cuales mostro que el extracto tiene propiedades antioxidantes que eliminan los radicales libres, como propiedades antiinflamatorias. Por otro lado Miguel Ruiz A. y Nelly Santillán R. (2012), también realizaron el tamizaje fitoquimico de las especies *Maytenus macrocarpa* y *Tynanthus panurensis*, prepararon el extracto fluido en las hojas, corteza y raíz, demostrando la presencia de algunos metabolitos secundarios como fenoles, saponinas, y esteroides, validando nuestros resultados, y al mismo tiempo estos resultados respaldan la idea de nuestros ancestros de que el extracto de la corteza de *T. panurensis* podría ser beneficioso para tratar algunas enfermedades.
- ✚ La investigación nos muestra que el extracto etanólico de la corteza de *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca) a concentración de 1300 mg/ml, 1500 mg/ml, y 1700mg/ml frente a *Escherichia coli*, y *Pseudomonas aeruginosa*, no se pudo apreciar algún halo de inhibición, diciendo de este modo que son resistentes al extracto en



estudio; con respecto a *Staphylococcus aureus* tuvo diámetros de inhibición de 7, 9 y 11 mm respectivamente para cada concentración realizada, con actividad antibacteriana resistente respectivamente; También se utilizó como controles positivos los antibióticos meropenem 10 µg, ciprofloxacino 5 µg, gentamicina 10 µg y vancomicina 30 µg. En tanto Cansian *et al* (2010), en su estudio farmacológico del *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca), han determinado la actividad antibacteriana de los extractos brutos demostrando actividad sobre algunas bacterias. Por otra parte el trabajo presentado por Miranda Cruz *et al* (2012), en donde evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos etanólico y hexánico de hoja y corteza de cuatro plantas utilizadas como medicinales: guayaba agria (*Psidium friedrichsthalianum* L.), palo de sangre (*Pterocarpus hayesii* L.), chichimecate (*Tynanthus guatemalensis* L.) y ciruela (*Spondias purpurea* L.), por el método de difusión en agar, donde obtuvieron resultados que indican que el extracto hexánico de *Tynanthus guatemalensis* L. presento actividad antimicrobiana frente a *staphylococcus aureus*, y *salmonella thyphimurium*. Por otro lado Dayana Lacerda *et al* (2010), En su investigación describieron la composición química y la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales obtenidos por hidrodestilación a partir de las hojas de Pimenta *pseudocaryophyllus* y *Tynanthus micranthus*. El análisis demostró que el eugenol era el único componente en el aceite esencial de *T. micranthus* (99.9%) y el componente principal en el aceite esencial de *P. Pseudocaryophyllus* (92.59%), que también

presentó metileugenol, terpinen-4-ol, o-cymene y (E) -caryophyllene, entre otros. Ambos aceites presentaron actividad antimicrobiana contra bacterias, levaduras y hongos filamentosos probados.

- ✚ La investigación también nos muestra la evaluación de la actividad antibacteriana del extracto etanólico la corteza de *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca) según Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de macrodilución en la que frente a *Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*, no se pudo determinar una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), puesto que hubo crecimiento en todas las concentraciones evaluadas, dándola como Inactiva. Mientras que, frente a ***Staphylococcus aureus***, tuvo una CMI de 32 mg/ml (C1), dando como resultado Inactiva.

## CAPITULO VI: CONCLUSIONES

### 6.1 CONCLUSIONES

- ✚ Mediante el tamizaje fitoquímico del extracto de la corteza de *tynanthus panurensis* (Clavo huasca) presenta abundante concentración de flavonoides, media concentración de taninos, y poca concentración de alcaloides, lactonas y cumarinas.
- ✚ A través del método de kirby *bauer* se evaluó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la corteza de *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca) a concentraciones de 1300, 1500, y 1700 mg/ml frente a *Escherichia coli*, y *Pseudomonas aeruginosa*, no se reportaron diámetros de inhibición, diciendo de esta manera que las bacterias estudiadas son resistentes al extracto etanólico, con respecto a *Staphylococcus aureus* que hubo diámetros de inhibición de 7, 9 y 11 mm para cada concentración respectivamente, diciendo así que la actividad antibacteriana es resistente respectivamente.
- ✚ La actividad antibacteriana del extracto etanólico de la corteza de *Tynanthus panurensis* (Clavo huasca) según la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) según rango de lectura, encontrándose en el ensayo de macrodilución una concentración de 32 mg/ml, por lo que el extracto etanólico demostró ser Inactivo frente a *Staphylococcus aureus*; Frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aureginosa* no se encontró una CMI, por lo que el efecto del extracto etanólico demostró ser Inactivo ante estas cepas.

## CAPITULO VII: RECOMENDACIONES

### 7.1 RECOMENDACIONES

- ✚ Realizar ensayos, con métodos diferentes a los que se aplicaron en este trabajo.
  
- ✚ Realizar pruebas subiendo las concentraciones del extracto, así mismo, realizar el fraccionamiento del extracto etanólico, para separar los metabolitos y encontrar cuál de estos causa la actividad antibacteriana.
  
- ✚ Seguir investigando la planta en estudio, para encontrar las diferentes acciones que tiene en beneficio de la salud.
  
- ✚ Fomentar la investigación de más especies vegetales, con el fin de buscar alguna alternativa a la medicina convencional a través de los compuestos bioactivos que estas plantas poseen, y al mismo tiempo darle ese valor agregado a nuestra flora silvestre.

## CAPITULO VIII: FUENTES DE INFORMACIÓN

### 6.1 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

#### 6.1.2 BIBLIOGRAFÍA

- 1) Lock O. Investigación Fitoquímica. Métodos En El Estudio De Productos Naturales. Fondo Editorial Pontificia Universidad Católica Del Perú. 3da.Ed. Lima-Perú. 2016. 300 P.
- 2) García Lujan Concepción, Tesis Titulada “Actividad Antibacteriana De Extractos Vegetales En Cepas Hospitalarias De *Staphylococcus Aureus* Con Resistencia Multiple”; Mexico.Diciembre 2016.
- 3) Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos, Nota descriptiva, Enero 2017.
- 4) Morales L, Acero N, Galán A, Perez-García C, Alguacil Lf, Y Muñoz-Mingarro D. Propiedades Bioactivas De *Tynanthus Panurensis* (Bureau) Extracto De Corteza De Sanwith, El "Clavo Huasca" Amazónico. Departamento De Ciencias Farmacéuticas Y De Los Alimentos, Universidad Ceu-San Pablo. Madrid, España. 2013.
- 5) Edith Miranda Cruz, Judith Espinosa Moreno , Dora Centurión Hidalgo , José Rodolfo Velázquez Martínez Y Maricela De Jesús Alor Chávez. Boletín Latinoamericano Y Del Caribe De Plantas Medicinales Y Aromáticas, Vol. 11, Núm. 4, Julio-Agosto, 2012, Pp. 354-361 Universidad De Santiago De Chile Santiago, Chile.
- 6) Miguel Antonio Ruiz Añape Y Nelly Santillán Ruiz. Tesis: Características Farmacognósticas De Las Especies Amazónicas *Maytenus Macrocarpa* (R. & P.) Briq., Y *Tynanthus Panurensis* (Sur.) Sandw. Iquitos. 2012.

- 7) Dayana Lacerda Custódio, Rafaela Pinheiro Burgo, Bárbara Moriel, Aneli De Melo Barbosa, Maria Ines Rezende, Juliana Feijó De Souza Daniel, Jurandir Pereira Pinto, Edmilson Bianchini Y Terezinha De Jesus Faria. Actividad Antimicrobiana De Los Aceites Esenciales De Pimenta Pseudocaryophyllus Y *Tynanthus Micranthus*. Brazilian Archives Of Biology And Technology. Diciembre. 2010.
- 8) Cansian Colombi Fernanda, Merino Zortéa Francis José, Amaral Langaro Vera Lucia, Salvador Alonso Rafael, Campos Mazuredi Patricia, Montrucchio Prehs Deise, Miguel Gomes Obdulio, Miguel Dallarmi Marillis. Aphodisiac Properties Of *Tynanthus Micranthus* Coor & Mello Ex. Schum In Male Mice. Afr. J. Pharm. Pharmacol. 2014; 8: 1200- 1204.
- 9) Kember Mejia-Elsa Rengifo. Plantas Medicinales De Uso Popular En La Amazonia Peruana. Proyecto Araucaria Amazonas- Nauta (Iiap- 2000).
- 10) Álvarez A. Et Al. Productos Naturales Con Fines Terapéuticos Comercializados En Venezuela Retel. Revista De Toxicología En Línea; 2008.
- 11) Instituto Nacional De Salud, Ministerio De Salud Del Perú. Manual De Procedimientos Para La Prueba De Sensibilidad Antimicrobiana Por El Método De Disco Difusión Serie De Normas Técnicas N° 30, 1:67. Lima – Perú. 2002.
- 12) National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A. Villanova. (1997).
- 13) Waldvogel F A. *Staphylococcus Aureus*. (Including Staphylococcal Toxic Shock) Mandell, Douglas & Bennett's Principles And Practice Of

- Infectious Diseases. Mandell G L, Bennett J E, Dolin R, Eds. Fifth Ed 2000, Churchill Livingstone, Philadelphia, Chapter 183: 2069-81.
- 14) Emori T G, Gaines R P. An Overview Of Nosocomial Infections, Including The Role Of The Microbiology Laboratory. Clin Microbiol Rev 1993; 6: 428-42.
  - 15) Kloss We, Schleir Kh, Goirtz F. The Genus Staphylococcus. In: Balows A, Truper Hg, Woekin M, Eds. The Prokaryotes, 2nd Ed. New York, Spring-Verlag; 1992.
  - 16) Richardson, Ar; Libby Sj, Fang Fc. «A Nitric Oxide-Inducible Lactate Dehydrogenase Enables Staphylococcus Aureus To Resist Innate Immunity» (En Inglés). Science 319 (5870): Pp. 1672-6. Pmid: . Marzo, 2008.
  - 17) Eslava C, Mateo J, Cravioto A. Cepas De Escherichia Coli Relacionadas Con La Diarrea. En: Diagnóstico De Laboratorio De Infecciones Gastrointestinales. Giono S, Escobar A, Valdespino JI. Secretaria De Salud. México, 1994: 251.
  - 18) Guadalupe Rodríguez-Angeles. Principales Características Y Diagnóstico De Los Grupos Patógenos De Escherichia Coli. 464 Salud Pública De México / Vol.44, No.5, Septiembre-Octubre De 2002.
  - 19) G. Soberón-Chávez. 2001. *Pseudomonas Aeruginosa*. En: Microbios En Línea, Capítulo 3. Martínez Romero E. Y Martínez Romero J. (Eds). Dgsca, Unam, [Http:// Wwww.Microbiologia.Org.Mx/Microbiosenlinea/](http://www.Microbiologia.Org.Mx/Microbiosenlinea/)
  - 20) Merino, L. A. (2007), "Pseudomonas Aeruginosa: Una Bacteria Con Personalidades Múltiples". Rev. Argent. Microbiol., Ciudad Autónoma De Buenos Aires, V. 39, N. 3, Sept. Disponible En

<[http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-75412007000300004&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412007000300004&lng=es&nrm=iso)>. Accedido En 21 Abr. 2015.

- 21) Díaz F, Gaitán R, Gómez H. Manual De Fitoquímica. Metodos De Extracción. Departamento De Farmacia, Universidad De Cartagena. Cartagena: Editorial Universitaria; 2004. P. 3-30.



### 6.1.3 WEBGRAFÍA

- 1) [https://www.edabea.com/287-large\\_default/clavo-huasca-80-grs.jpg](https://www.edabea.com/287-large_default/clavo-huasca-80-grs.jpg)
- 2) [http://campus.usal.es/~micromed/Practicas\\_odontologia/unidades/labv/LabMicro/Antibiograma.html](http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/LabMicro/Antibiograma.html)
- 3) <http://coesant-seimc.org/documents.html>
- 4) [https://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus\\_aureus](https://es.wikipedia.org/wiki/Staphylococcus_aureus).
- 5) [https://es.wikipedia.org/wiki/Escherichia\\_coli](https://es.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli)
- 6) <http://www.infectosos.com/2015/10/infecciones-cutaneas-por-pseudomonas.html>
- 7) [https://es.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas\\_aeruginosa](https://es.wikipedia.org/wiki/Pseudomonas_aeruginosa)
- 8) <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.pe/2014/10/tecnicas-y-metodos-de-estriado-en-caja.html>

# **ANEXOS**

**Anexo N° 1:** *Tynanthus panurensis*.



**Anexo N° 2:** Obtención de la Corteza de *Tynanthus panurensis*.



**Anexo N° 3: Pesado de la corteza de *Tynanthus panurensis*.**



**Anexo N° 4: Macerado de la corteza de *Tynanthus panurensis*.**



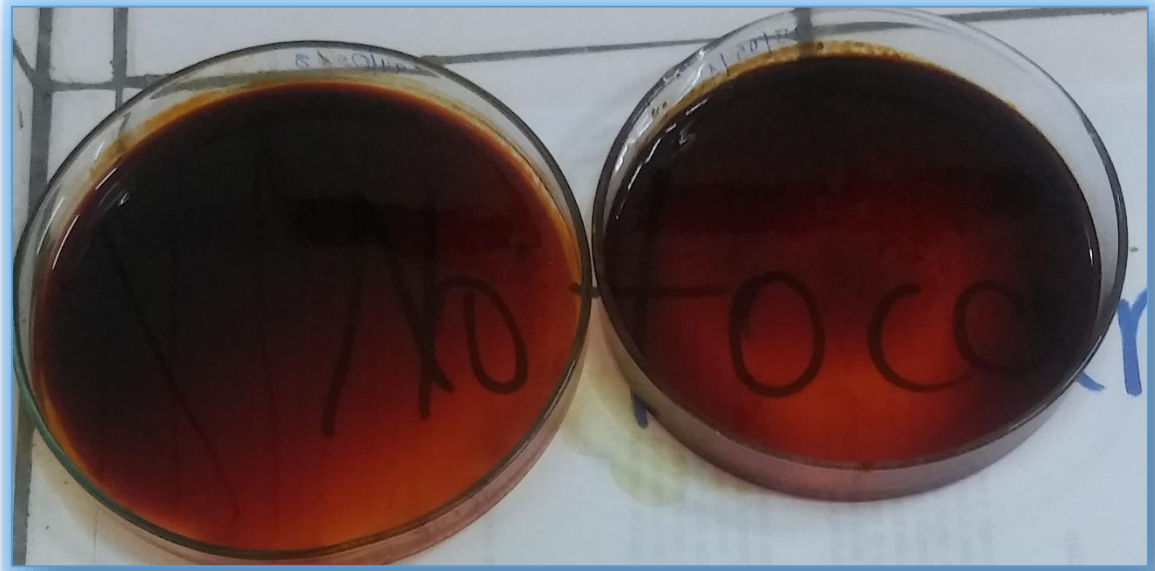
**Anexo N° 5:** Filtrado del macerado de la corteza de *Tynanthus panurensis*



**Anexo N° 6:** Recuperación de solvente utilizado en la maceración de la corteza de *Tynanthus panurensis* por arrastre a vapor.



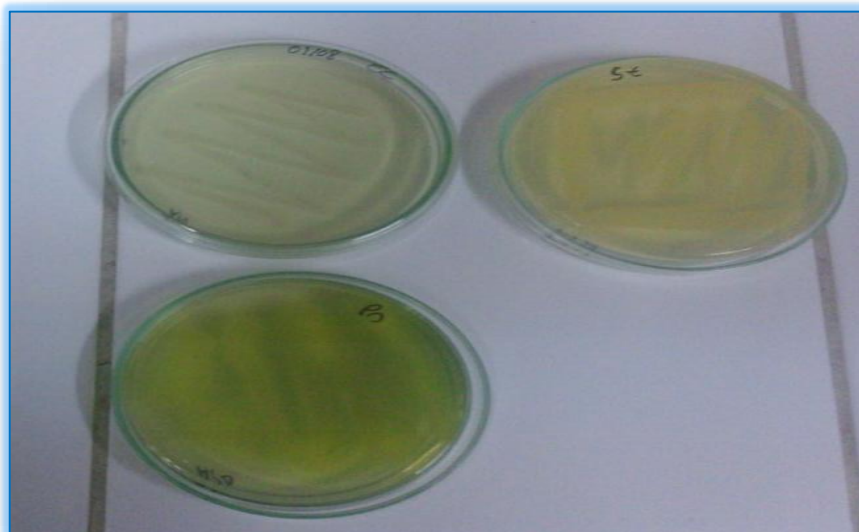
**Anexo N° 7:** Extracto etanólico de la corteza de *Tynanthus panurensis*.



**Anexo N° 8:** Materiales utilizados en el proyecto



### Anexo N° 9: Activación de las bacterias



**Anexo N° 10:** Impregnación de los discos con el extracto etanólico para la prueba de sensibilidad por el método de difusión en disco.



**Anexo N° 11: Preparación del inóculo bacteriano.**

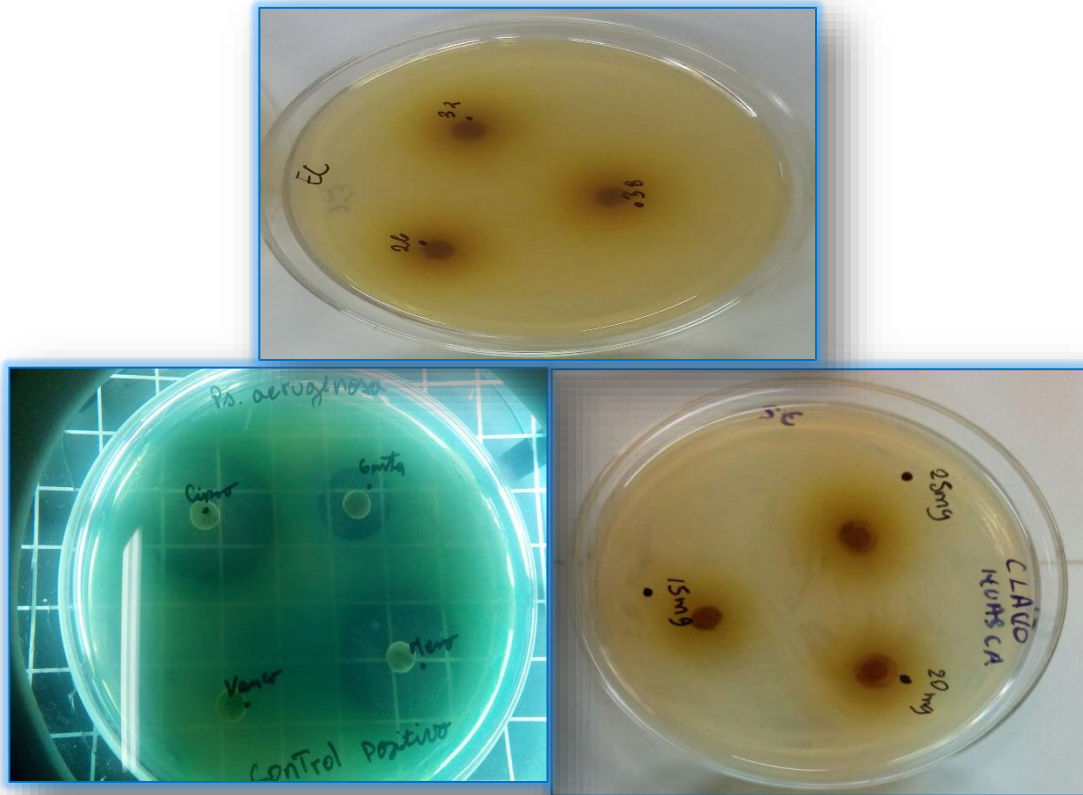




**Anexo N° 12:** Aplicación del inoculo y de los discos impregnados con el extracto de *Tynathus panurensis*



**Anexo N° 13:** Resultados de los ensayos realizados, por el método de difusión en agar.



**Anexo N° 14:** Resultados de los ensayos realizados por el método de macrodilución.



## Anexo N° 15: Descripción botánica de la muestra vegetal en estudio



Herbarium Amazonense - AMAZ  
Centro de Investigación de Recursos  
Naturales de la Amazonia - CIRNA

INSTITUCIÓN CIENTÍFICA NACIONAL DEPOSITARIA DE MATERIAL BIOLÓGICO  
CÓDIGO DE AUTORIZACIÓN AUT-ICND-2017-005

### CONSTANCIA

LA COORDINADORA DEL HERBARIUM AMAZONENSE, AMAZ-CIRNA, DE LA UNIVERSIDAD  
NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA

#### HACE CONSTAR:

Que, la muestra botánica presentado por el Dr. **Alenguer Gerónimo Alva Arévalo**, pertenece al proyecto titulado: **Actividad Antioxidante y Antimicrobiano de la especie *Tynanthus panurensis* (Bureau) Sandwith**, "clavo huasca", y fue verificado y determinado por este Herbarium Amazonense-AMAZ, CIRNA-UNAP, que a continuación se indica:

N°	Código	Familia	Especies	Nombre Común
1	022406	BIGNONACEAE	<i>Tynanthus panurensis</i> (Bureau) Sandwith	"clavo huasca"

Se expide la presente constancia al interesado, para los fines que estime conveniente.

Iquitos, 10 de Setiembre del 2018

Atentamente,

Blga. MERI N. AREVALO GARCIA  
Coordinadora AMAZ-CIRNA-UNAP

