

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA



TESIS

Actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) y de hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) frente a *Staphylococcus aureus*

TESIS PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE CIRUJANO DENTISTA

AUTORA

Bach. Diana Elizabeth Uriol Plasencia

ASESORA

Dra. María Victoria Espinoza Salcedo

TRUJILLO

2019

DEDICATORIA

A mis padres, Ricardo y Consuelo, por haberme brindado siempre su guía y apoyo incondicional, que han sido mi mayor motivación en el desarrollo de mi carrera profesional y a quienes amo desde lo más profundo de mi ser.

A mi hermano Luis, a quien nunca he dejado de admirar y será siempre mi ejemplo a seguir.

A mi hermana Carol, de manera especial, por toda la paciencia, apoyo y cariño que me dio y por haber estado conmigo en cada momento.

AGRADECIMIENTO

- £ A Dios por permitirme llegar hasta aquí y concederme la salud y fuerza necesaria para siempre seguir adelante.
- £ A mis padres, Ricardo y Consuelo, a mis hermanos y demás familiares a quienes debo infinitamente las gracias por todo el amor, consejos, apoyo y ayuda que me brindaron sin condición en todo el transcurso de mi carrera profesional.
- £ A mi asesora, la Dra. María Espinoza Salcedo, por el tiempo, interés y dedicación que tuvo en cada etapa de la elaboración de este trabajo.
- £ A la Universidad Privada Antenor Orrego, que gracias a su constante innovación y desarrollo de cursos he podido ampliar mi conocimiento y mejorar mis habilidades.
- £ A mis profesores, por los conocimientos y experiencias que impartieron en mí; y que me permitirán desenvolverme sin dificultades en el campo de la estomatología.

RESUMEN

Objetivo: Determinar la actividad antimicrobiana in vitro de los extractos hidroalcohólicos de frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) y de hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) frente a *Staphylococcus aureus*.

Material y métodos: El estudio fue comparativo y experimental; analizando una cepa de *Staphylococcus aureus* con la que se realizaron 15 repeticiones, por cada concentración para cada extracto hidroalcohólico más un control positivo con vancomicina. Con una regla milimetrada se midió el halo de inhibición generado alrededor del disco impregnado con el extracto en las placas Petri con la cepa de *Staphylococcus aureus*. Los datos recolectados se procesaron en el programa SPSS Statistics 22 y se emplearon las pruebas ANOVA y la prueba de comparaciones múltiples de Duncan para el análisis estadístico.

Resultados: No hubo diferencia entre los resultados en las 3 concentraciones del extracto de *Physalis peruviana* L. y no presentó una actividad antimicrobiana significativa en comparación con el control. En cuanto al extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill, según la prueba de Duncan, la actividad antimicrobiana de este a una concentración del 100% (16.00mm) fue significativo ($p < 0.001$) en comparación al efecto producido por vancomicina (16.30mm) contra *Staphylococcus aureus*.

Conclusión: El extracto hidroalcohólico de eucalipto en la concentración del 100% fue el que presentó mayor actividad antimicrobiana contra *S. aureus*.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, *Eucalyptus*, *Physalis*

ABSTRACT

Objective: To determine the *in vitro* antimicrobial activity of hydroalcoholic extracts of aguaymanto fruits (*Physalis peruviana* L.) and eucalyptus leaves (*Eucalyptus globulus* Labill) against *Staphylococcus aureus*.

Material and methods: The study was comparative and experimental; analyzing a strain of *Staphylococcus aureus* with which 15 repetitions were performed, for each concentration for each hydroalcoholic extract plus a positive control with vancomycin. With a millimeter ruler, the inhibition halo generated around the disk impregnated with the extract in the Petri dishes was measured with the *Staphylococcus aureus* strain. The data collected was processed in the SPSS Statistics 22 program and the ANOVA tests and the Duncan multiple comparisons test were used for statistical analysis.

Results: There was no difference between the results in the 3 concentrations of the extract of *Physalis peruviana* L. and did not present a significant antimicrobial activity compared to the control. Regarding the hydroalcoholic extract of *Eucalyptus globulus* Labill, according to the Duncan test, its antimicrobial activity at a concentration of 100% (16.00mm) was significant ($p < 0.001$) compared to the effect produced by vancomycin (16.30mm) against *Staphylococcus aureus*.

Conclusion: The hydroalcoholic extract of eucalyptus at a concentration of 100% was the one with the highest antimicrobial activity against *S. aureus*.

Key words: *Staphylococcus aureus*, *Eucalyptus*, *Physalis*

INDICE

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE	vi
Índice de tablas y gráficos	viii
Índice de imágenes	ix
I. INTRODUCCIÓN	
1.1 Realidad Problemática	1
1.2 Marco Teórico	2
1.3 Antecedentes del estudio	5
1.4 Justificación del estudio	6
1.5 Formulación del problema	7
1.6 Hipótesis	7
1.7 Objetivos	7
1.8 Variables	8
II. METODOLOGÍA	
2.1 Tipo de investigación	9
2.2 Población y muestra	9
2.3 Técnicas e instrumentos de investigación	11
2.4 Diseño de investigación	15
2.5 Procesamiento y análisis de datos	15
2.6 Consideraciones bioéticas	15

III.	RESULTADOS	16
IV.	DISCUSIÓN	23
V.	CONCLUSIONES	26
VI.	RECOMENDACIONES	27
VII.	BIBLIOGRAFIA	28
VIII.	ANEXOS	
	Anexo N° 1 Instrumento de recolección de datos	34
	Anexo N° 2 Autorizaciones de los laboratorios	35
	Anexo N° 3 Constancia de identificación del herbario	37
	Anexo N° 4 Constancia del comité de bioética UPAO	38

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICOS

Actividad antimicrobiana In Vitro de los extractos hidroalcohólicos de Frutos de Aguaymanto (Physalis peruviana L.) en las concentraciones de 40, 70 y 100% y Control Vancomicina frente a Staphylococcus aureus, según halos de Inhibición (mm).

Tabla 1.a _____ **18**

Tabla 1.b _____ **18**

Gráfico N° 1 _____ **19**

Actividad antimicrobiana In Vitro de los extractos hidroalcohólicos de Hojas de Eucalipto (Eucalyptus globulus Labill) en las concentraciones de 40, 70 y 100% y Control Vancomicina frente a Staphylococcus aureus, según halos de Inhibición (mm).

Tabla 2.a _____ **21**

Tabla 2.b _____ **21**

Gráfico N°2 _____ **22**

ÍNDICE DE IMÁGENES

- Imagen 1 (a y b).** Prueba de sensibilidad bacteriana a la cepa de *Staphylococcus aureus*._____ **39**
- Imagen 2.** Preparación de la disolución hidroalcohólica CH₃OH_(ac) al 50%) _____ **39**
- Imagen 3.** Mezcla de la disolución hidroalcohólica con los frutos de *Physalis peruviana* L._____ **40**
- Imagen 4.** Extracción por destilación a reflujo de *Physalis peruviana* L. **40**
- Imagen 5.** Filtración al vacío del extracto hidroalcohólico de *Physalis peruviana* L. _____ **41**
- Imagen 6.** Concentración del extracto hidroalcohólico de *Physalis peruviana* L. _____ **41**
- Imagen 7.** Obtención de los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* L. al 40%, 70% y 100% _____ **41**
- Imagen 8.** Preparación de las hojas de *Eucalyptus globulus* Labill _____ **42**
- Imagen 9.** Pesado de las hojas de *Eucalyptus globulus* Labill _____ **42**
- Imagen 10.** Mezcla de la disolución hidroalcohólica con las hojas de *Eucalyptus globulus* Labill _____ **43**
- Imagen 11.** Extracción por destilación a reflujo de *Eucalyptus globulus* Labill _____ **43**
- Imagen 12.** Filtración al vacío del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill _____ **44**
- Imagen 13.** Concentración del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill _____ **44**
- Imagen 14.** Reactivación de las cepas de *Staphylococcus aureus* _____ **45**

Imagen 15. (a y b) Prueba de sensibilidad bacteriana a la cepa de *Staphylococcus aureus* _____ **45**

Imagen 16 (a y b). Prueba de disco-difusión de los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana L.* y *Eucalyptus globulus Labill* frente a *Staphylococcus aureus* _____ **46**

Imagen 17 (a y b). Medición de los halos producidos por los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana L.* y *Eucalyptus globulus Labill* frente a *Staphylococcus aureus* _____ **46**

I. INTRODUCCION

1.1 Realidad problemática

El mundo en el que vivimos actualmente es uno que evoluciona de forma incesante en cada ámbito o rama del desarrollo humano, una de ellas es la medicina.

En medicina, el tratamiento de enfermedades mediante el uso de sustancias antimicrobianas ha tenido un gran avance desde el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming en 1928; sin embargo, debido a la incorrecta administración de estas sustancias hemos conseguido originar resistencia antibiótica en diferentes microorganismos patógenos. Esta resistencia hace que las enfermedades sean cada vez más difíciles y, en ocasiones, imposibles de tratar. También, debido a la mayor duración de la enfermedad y del tratamiento, se prolonga la estancia de los pacientes en hospitalización, predisponiéndolos al desarrollo de nuevas infecciones e incrementando los índices de mortalidad; en cuanto al aspecto socioeconómico, aumentan cada vez más los costos de la atención sanitaria y la carga económica para las familias y la sociedad.^{1,2}

A causa de esta situación, que sigue intensificándose peligrosamente a nivel mundial, la Organización Mundial de la Salud publicó en el año 2017 una lista de microorganismos patógenos para los cuales se necesita con urgencia nuevos antibióticos, esta se divide en tres categorías: Prioridad crítica, elevada y media.³

1.2 Marco Teórico

En las últimas décadas, ha habido una disminución dramática en el número de nuevos antibióticos aprobados por la FDA (Food and Drug Administration).⁴

Como consecuencia se ha comenzado a prestar una notable atención al estudio y análisis de plantas medicinales; y el Perú es uno de los países que posee una amplia biodiversidad de flora, pese a ello las propiedades químicas y farmacológicas, de gran relevancia para el desarrollo y síntesis de nuevos medicamentos, no son lo suficientemente estudiadas lo que limita el reconocimiento de ciertas especies como fitofármacos.⁵

El Centro Nacional de Salud Intercultural (CENSI) presentó en el 2013 un catálogo florístico de alrededor 40 plantas medicinales peruanas, entre las cuales se presentaban el aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) y eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill).⁶

En el Perú existen 7 especies de *Physalis* L., siendo *Physalis peruviana*, de clase dicotiledónea, subclase metaclamídeas, familia *Solanaceae*, conocida comúnmente como aguaymanto o tomatito; una planta nativa de los Andes de Sudamérica que posee un alto contenido nutricional y potencial vitamínico.⁷

Gracias a sus propiedades químicas se le atribuyen múltiples usos medicinales como el alivio de afecciones orofaríngeas, prevención de faringitis, estomatitis, purificación de la sangre en pacientes diabéticos y también para tratar enfermedades renales.⁸

Dentro de su composición se encuentran presentes múltiples withanólidos (lactonas esteroideas) que posee propiedades citotóxicas contra

diferentes tipos de cáncer. Las vitaminas, proteínas, minerales y ácidos (principalmente oleico y linoleico) que contiene, son también relacionados a estas propiedades.⁹

Por otro lado, el *Eucalyptus globulus* Labill, comúnmente llamado eucalipto, es una planta originaria de Australia, la cual pertenece a uno de los principales géneros de la familia Myrtaceae. Presenta 900 especies y subespecies que fueron reclasificadas por Hill and Johnsones (1995) según sus características morfológicas y moleculares.^{10, 11}

Es una planta rica en fitoquímicos que le proporcionan una gran cantidad de propiedades medicinales como cicatrizante, antirreumático, antiviral, antiséptica, antiespasmódica, antiinflamatoria, entre otros.¹²

Estas propiedades se deben a diferentes compuestos químicos presentes en el follaje, el cual contiene altas concentraciones de metabolitos fenólicos secundarios, particularmente taninos. En sus hojas también encontramos la presencia de aceites esenciales que además proveen el característico olor de esta planta.^{13, 14}

Los usos terapéuticos del eucalipto han sido probados en la medicina tradicional china e india. Estudios analizan sus aceites esenciales, comprobando la actividad que tienen contra ciertas bacterias periodontales y cariogénicas específicas. De igual manera se demostró su actividad antibiofilm contra biopelículas de *C. albicans*.¹⁵

Tanto el aguaymanto como el eucalipto tienen dentro de su composición química compuestos fenólicos, los cuales son productos naturales que han demostrado tener propiedades antimicrobianas y antioxidantes, así como también los aceites esenciales, flavonoides y extractos crudos.^{16, 17}

Cuando hablamos de la cavidad bucal, una de las características del hábitat microbiano que siempre debemos considerar es que es un medio dinámico. Estudios previos documentaron cambios directos relacionados con la edad en la microbiota oral, como un aumento en la proporción y la frecuencia de aislamiento de algunas especies bacterianas, principalmente *Staphylococcus aureus*.¹⁸

Esta bacteria anaerobia facultativa, Gram positiva comúnmente genera infecciones oportunistas en individuos con mala salud como en huéspedes inmunocomprometidos o que presentan enfermedades sistémicas de fondo que desequilibran el medio bucal propiciando su aparición y la de más microorganismos como *Pseudomona aeruginosa* y diferentes subespecies de candida.¹⁹

El *S. aureus* se ha convertido en uno de los patógenos bacterianos Gram positivos más notorios gracias a la capacidad que posee para invadir el sistema inmunitario a través de varios factores de virulencia y su rápida adquisición del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos.²⁰

Ha demostrado una versatilidad genómica excepcional. A través de varias décadas se ha adaptado a la diferente terapéutica enviada por la industria farmacéutica.²¹

Se asocia a *S. aureus* con infecciones oportunistas como mucositis estafilocócica, muy común en individuos con cáncer de cabeza y cuello que reciben quimioterapia y/o radioterapia, en general pacientes que presentan hiposalivación.^{22, 23}

Se ha encontrado presente en muestras clínicas de caries dental, en infecciones dentales, particularmente en abscesos; también se ha encontrado gran incidencia de esta bacteria en endocarditis infecciosa.²⁴

1.3 Antecedentes del estudio

Chaves y col. (2018 - Brasil) evaluaron la composición química del aceite esencial de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn (EOEc) y su potencial modificador de la resistencia de las cepas de *Staphylococcus aureus* β -lactamasas y productoras de meticilina a los antibióticos β -lactámicos, entre otras cosas. El EOEc se obtuvo mediante hidrodestilación. Para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) y la modulación de resistencia bacteriana de la EOEc se realizó la prueba de microdilución. Encontraron que el aceite presentó actividad antimicrobiana sobre las cepas de *S. aureus* 29 y MRSA.²⁵

Argote-Vega y col. (2017 - Colombia) realizaron un estudio cuyo objetivo fue evaluar la capacidad antibacteriana de aceites esenciales de eucalipto, limón y mandarina frente a bacterias ATCC *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. La actividad antibacteriana se determinó con la concentración mínima inhibitoria CMI y bactericida CMB, obteniendo que los mejores resultados de inhibición fueron para eucalipto y mandarina frente a la bacteria Gram positiva con una CMI y CMB de 6,8 μ L/mL y para la Gram negativa el aceite esencial de cáscara de mandarina y eucalipto con una CMI y CMB de 13,2 μ L/mL.²⁶

Azuelo y col. (2016 - Ecuador) estudiaron los extractos metanólicos de diferentes ejemplares de las especies vegetales *Lippia citriodora* K (cedrón), *Piper carpunya* Ruiz & Pav (guaviduca); contra cepas de bacterias Gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y Gram negativa (*Escherichia coli* y *P. aeruginosa*), y una cepa del hongo (*Candida albicans*). Obtuvieron como resultado, en cuanto a *S. aureus*, que no presentó sensibilidad frente los extractos de *L. citriodora* y *P. carpunya*.²⁷

Pimentel y col. (2015 – Perú) analizaron la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Origanum vulgare* (orégano), *Tagetes elliptica* (chincho) y del *Tagetes minuta* (huacatay), determinan que *Tagetes elliptica* (chincho) dentro de sus compuestos químicos contiene flavonoides, tienoles y terpenoides, estos principios activos atribuyen su efectividad antibacteriana frente a bacterias gram positivas como *Staphylococcus aureus*.²⁸

Mota y col. (2015 – Brasil) evaluaron la actividad antimicrobiana in vitro de los aceites esenciales *Eucalyptus globulus* y de las sustancias de xilitol y papaína contra *Pseudomonas aeruginosa*; *Samonella sp.*; *Staphylococcus aureus*; *Proteus vulgaris*; *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Utilizaron la prueba de difusión en agar y midieron el diámetro de la zona de inhibición para la evaluación de la actividad antimicrobiana resultando en que el aceite esencial de *Eucalyptus globulus* presentó una alta inhibición en comparación con el control (clorhexidina 0.5%) frente a *S. aureus*, concluyendo que los aceites esenciales de dicha planta es una alternativa viable como agente germicida.²⁹

1.4 Justificación del estudio

Con el fin de poder desarrollar, en un futuro, fórmulas terapéuticas que puedan ser utilizadas en formas farmacéuticas de origen natural y accesibles para la población en general. Además, de estudiar la susceptibilidad antimicrobiana de *S. aureus*, que se encuentra dentro de la lista de microorganismos patógenos que necesitan nuevos antibióticos debido a la resistencia que están desarrollando, frente a extractos hidroalcohólicos en diferentes concentraciones de las plantas mencionadas.

Asimismo, proveer información actualizada en cuanto a eficacia de extractos de plantas medicinales sobre microorganismos, el cual es de un gran interés científico por la variedad de compuestos químicos con diferentes propiedades y bioactividad que presentan.

Por lo expuesto la presente investigación tiene como propósito estudiar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) y de hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) frente a *Staphylococcus aureus* e identificar la concentración con mayor actividad antimicrobiana.

1.5 Formulación del problema

¿Presentan actividad antimicrobiana *in vitro* los extractos hidroalcohólicos de frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) y de hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) frente a *Staphylococcus aureus*?

1.6 Hipótesis

Hipótesis alterna (H₁):

Los extractos hidroalcohólicos de frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) y de hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) sí presentan actividad antimicrobiana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus*.

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo general

Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) y de hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) frente a *Staphylococcus aureus*.

1.7.2 Objetivos específicos

- Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) a las concentraciones de 40%, 70% y 100% frente a *Staphylococcus aureus*.
- Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* de los extractos hidroalcohólicos de hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) a las concentraciones de 40%, 70% y 100% frente a *Staphylococcus aureus*.

1.8 Variables

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable		Escala de medición
			Según su naturaleza	Según su función	
Concentración del extracto hidroalcohólico	Unidad que expresa la concentración de una disolución ³⁰	Volumen de extracto hidroalcohólico de aguaymanto y eucalipto por 100 mL de disolución Indicador: <ul style="list-style-type: none"> • 40% • 70% • 100% 	Cuantitativa	Independiente	Ordinal

<p>Actividad antimicrobiana</p>	<p>Capacidad de detener el crecimiento o eliminar microorganismos patógenos.³¹</p>	<p>Diámetro de los halos alrededor de los discos de difusión en el antibiograma Indicador: mm</p>	<p>Cuantitativa</p>	<p>Dependiente</p>	<p>De razón</p>
--	---	---	---------------------	--------------------	-----------------

II. METODOLOGÍA

2.1 Tipo de investigación

2.1.1 De acuerdo al fin que se persigue: Aplicada

2.1.2 De acuerdo al diseño de contrastación: Experimental

2.2 Población y muestra

2.2.1 Características Generales

Fue constituida por el total de aplicaciones de los extractos hidroalcohólicos de aguaymanto y eucalipto en agar Mueller Hinton con la cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus*.

a. Criterios de inclusión

- Cultivos de *Staphylococcus aureus* cuya pureza fue verificada mediante coloración Gram.
- Cultivos de *Staphylococcus aureus* a los que se les aplicó de manera estéril discos con extractos hidroalcohólicos de aguaymanto a las concentraciones de 40%, 70% y 100%.
- Cultivos de *Staphylococcus aureus* a los que se les aplicó de manera estéril discos con extractos hidroalcohólicos de eucalipto a las concentraciones de 40%, 70% y 100%.

b. Criterios de exclusión

- Contaminación de la cepa de *Staphylococcus aureus* antes del sembrado en agar nutritivo.
- Contaminación del agar nutritivo en el que sembrará la cepa de *Staphylococcus aureus*.

c. Criterios de eliminación

- Contaminación de la muestra de extractos hidroalcohólicos de aguaymanto durante el período de conservación.
- Contaminación de la muestra de extractos hidroalcohólicos de eucalipto durante el período de conservación.
- Contaminación del agar nutritivo durante el período de incubación.
- Deterioro del agar nutritivo durante la conservación o los procedimientos que no permita su medición posterior.

2.2.2 Tamaño muestral

Debido al interés de comparar las medias de dos o más grupos de estudio para variable cuantitativa; y habiéndose realizado una prueba piloto de 8 repeticiones para cada grupo, el tamaño muestral se calculará con la siguiente fórmula estadística:

$$n = \frac{(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 (S_1^2 + S_2)^2}{(\bar{X} - \bar{X}_2)^2}$$

Siendo n = número de repeticiones a analizar.

$Z_{\alpha/2} = 1.96$ para $\alpha = 0.05$, para una confianza del 95%

$Z_{\beta} = 0.84$ para $\beta = 0.20$, para una potencia del 80%

$\bar{X}_1 = 12.5$ mm, halo de inhibición – eucalipto 100%

$S_1 = 1.60$ mm

$\bar{X}_2 = 10.75$ mm, halo de inhibición – aguaymanto 100%

$S_2 = 0.89$ mm

De estas desviaciones estándar se tomó la mayor para obtener mayor muestra.

$$n = \frac{(1.96 + 0.84)^2 (1.6)^2}{(12.5 - 10.75)^2} = 13.1072$$

$n = 13$

Siendo 13 el mínimo número de repeticiones, para el presente estudio, se decidió hacer 15 repeticiones para cada concentración de cada extracto con la cepa de *S. aureus* con la que contaba el laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca.

$n = 15$

2.3 Técnicas e instrumentos de investigación

2.3.1 Método de recolección de datos

Observacional

2.3.2 Instrumento de recolección de datos

Se utilizó una ficha de recolección de datos elaborada específicamente para la presente investigación. (Anexo N° 1)

2.3.3 Procedimiento de recolección de datos

- **Autorización de la ejecución del proyecto**

Se solicitó la autorización correspondiente a los lugares en los que se realizó la presente investigación (laboratorio de química de la UNC y laboratorio de microbiología de la UNC).

(Anexo N° 2)

- **Identificación de las muestras:**

Tanto los frutos de aguaymanto como las hojas de eucalipto, ambas muestras fueron identificadas taxonómicamente por el especialista del Herbario de la Universidad Nacional de Cajamarca. (Anexo N° 3)

- **Preparación de los extractos hidroalcohólicos a aplicar:**

Tanto los frutos de aguaymanto como las hojas de eucalipto fueron sometidos a una extracción por destilación a reflujo, utilizando como solvente una disolución hidroalcohólica ($\text{CH}_3\text{OH}_{(\text{ac})}$ al 50%) y preparados a tres diferentes concentraciones: 40%, 70% y 100%.

Para el aguaymanto, en una balanza electrónica se pesaron aproximadamente 100g de sus frutos que luego fueron añadidos a una solución de 250ml de $\text{CH}_3\text{OH}_{(\text{ac})}$ al 50% en un balón de dos bocas colocado sobre un agitador magnético el cual mezcló por 5 horas ambos elementos.

Para el eucalipto se realizó el mismo procedimiento con 50g de hojas de eucalipto mezcladas con 500ml de $\text{CH}_3\text{OH}_{(\text{ac})}$ al 50%.

Durante la extracción se controló el tiempo (5 horas) y la temperatura de la mezcla (no mayor 40°C) para prevenir la alteración de los compuestos químicos del aguaymanto y eucalipto.

Después de la extracción se filtró al vacío para obtener el extracto hidroalcohólico de aguaymanto y el de eucalipto.

Posteriormente se colocó ambos extractos en la estufa a una temperatura promedio de 60°C hasta conseguir una mayor concentración de ambos extractos.

- **Para la reactivación de cultivos de *S. aureus*:**

Se inoculó una porción del cultivo en preservación en caldo BHI para su reactivación y se incubó por 18 horas. A partir de los tubos turbios se sembró por estriado en placas con agar sangre, e incubó por otras 18 horas en aerobiosis, luego se verificó la pureza de los cultivos mediante coloración Gram.

Luego se realizó una prueba de sensibilidad bacteriana contra cefoxitina, oxacilina y vancomicina, obteniendo que la cepa a estudiar era resistente a oxacilina. Imagen 15. (a y b)

- **Antibiograma por método de disco-difusión³²**

A partir de las colonias aisladas en medios no selectivos, se prepararon suspensiones en solución salina fisiológica estéril (SSFE) ajustadas a la escala de concentración del tubo 0.5 de Mac Farland.

Se sumergieron hisopos estériles en la suspensión bacteriana e inocularon en el agar Mueller Hinton contenido en placa Petri, dejándolos luego secar a temperatura ambiente.

Se colocaron los discos impregnados con 10 μ L de los extractos hidroalcohólicos tanto de aguaymanto como de eucalipto en la placa Petri que corresponda.

Los discos impregnados con las diferentes concentraciones del extracto estuvieron a una distancia no menor de 3 cm uno del otro.

A las 48 horas se realizó la medición del diámetro de los halos con una regla milimetrada y luego estas fueron analizadas siguiendo la escala de Duraffourd, la cual es utilizada para determinar el efecto inhibitorio in vitro, según diámetro de inhibición.

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

2.4 Diseño de investigación

Número de mediciones	Número de grupos a estudiar	Tiempo en el que ocurrió el fenómeno a estudiar	Forma de recolectar los datos	Posibilidad de intervención del investigador
Transversal	Comparativo	Prospectivo	Prolectivo	Experimental

2.5 Procesamiento y análisis de datos

Los datos recolectados fueron procesados de manera automatizada en el programa estadístico SPSS Statistics 22.0 (IBM, Armonk, NY, USA), para obtener los valores absolutos, promedio, desviación estándar y gráficos mostrando los resultados de acuerdo a los objetivos planteados.

El análisis estadístico se realizó mediante la prueba ANOVA, siendo complementado con una prueba de comparaciones múltiples usando Duncan; y posteriormente representar los datos en un gráfico de medias.

La significancia estadística considerada fue de 5% ($P < 0.05$).

2.6 Consideraciones bioéticas

El presente trabajo se realizó considerando las siguientes normas:

- ✓ Declaración de Helsinki ³³
- ✓ Ley General de Salud N° 26842 ³⁴
- ✓ Comité de Bioética UPAO (Anexo N° 4)

III. RESULTADOS

El presente estudio fue de tipo experimental “in vitro”, que se realizó en los ambientes del Laboratorio de Microbiología y del laboratorio de Química de la Universidad Nacional de Cajamarca.

Se tuvo como objetivo determinar si existe un efecto antimicrobiano de los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* L. (aguaymanto) y de *Eucalyptus globulus* Labill (eucalipto) frente a la bacteria *Staphylococcus aureus*.

3.1 Extracto hidroalcohólico de *Physalis peruviana* L. (aguaymanto)

En el análisis descriptivo se pueden apreciar diferencias entre los valores de las desviaciones estándar de cada concentración al 40%, 70% y 100% (0.00, 0.00, 0.26 respectivamente) y del control (2.35). Luego, a través del análisis de varianza (ANOVA) se mostró que entre estos grupos existe una diferencia significativa ($p < 0.001$). Tabla N° 1

Posterior al análisis de ANOVA se ejecutó la prueba de Duncan. Esta prueba determinó 2 grupos; en el primer grupo se ubicó la concentración al 100% (6.07mm), al 70% (6.00mm) y al 40% (6.00); en el segundo grupo solo se incluyó al grupo control (16.30mm). Tabla N°2

Según los resultados obtenidos se establece que el extracto hidroalcohólico de *Physalis peruviana* L. en sus tres diferentes concentraciones no poseen un efecto antimicrobiano significativo en comparación con el grupo control que se realizó con vancomicina.

En el gráfico de medias realizado, se observó una notable diferencia entre el efecto del extracto de aguaymanto en sus 3 concentraciones en comparación con el grupo control. Gráfico N° 1.

Actividad antimicrobiana In Vitro de los extractos hidroalcohólicos de Frutos de Aguaymanto (Physalis peruviana L.) en las concentraciones de 40, 70 y 100% y Control Vancomicina frente a Staphylococcus aureus, según halos de Inhibición (mm).

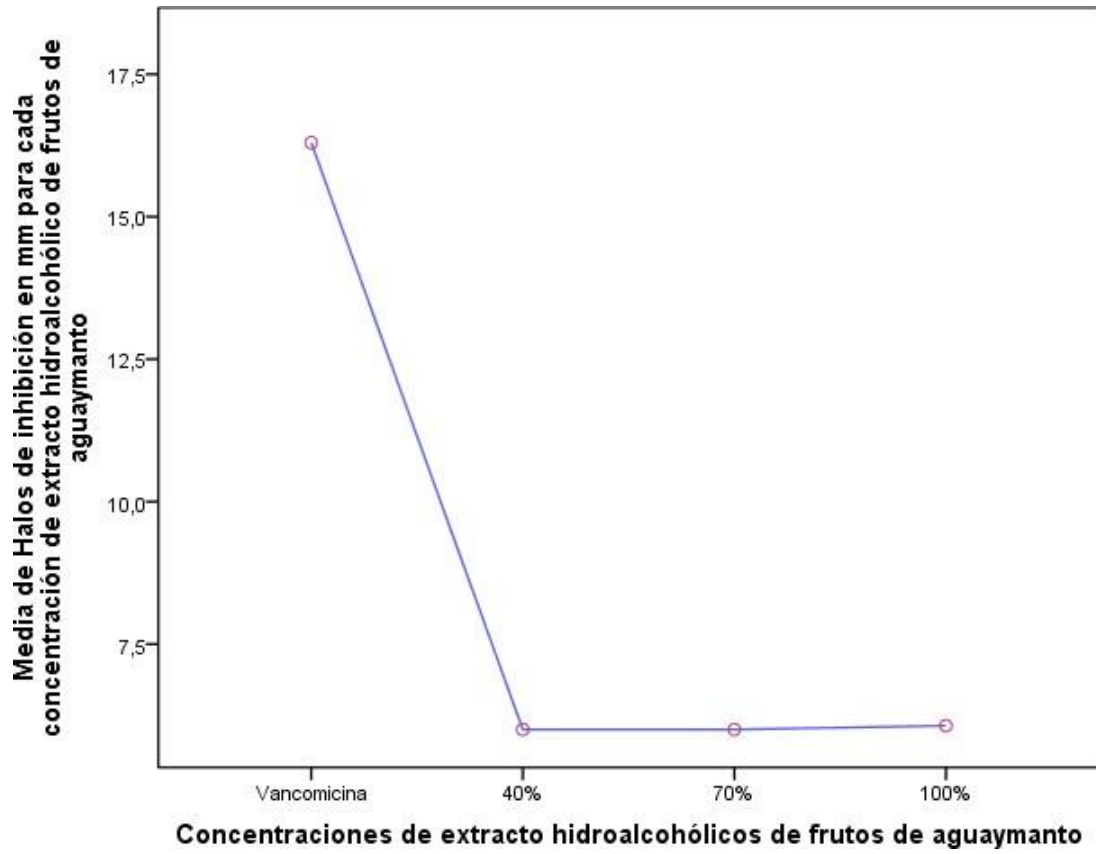
<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>Entre grupos</i>	1188.41	3	396.14	283.20	0.0000
<i>Dentro de grupos</i>	78.33	56	1.40		
<i>Total</i>	1266.75	59			

Tabla 1.a

<i>Concentraciones de extracto hidroalcohólicos de frutos de Aguaymanto</i>	<i>ni</i>	<i>Grupos para alfa = 0.05</i>	
		<i>G1</i>	<i>G2</i>
<i>40%</i>	15	6.00	
<i>70%</i>	15	6.00	
<i>100%</i>	15	6.07	
<i>Vancomicina</i>	15		16.30

Tabla 1.b

Gráfico N°1



3.2 Extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill (eucalipto)

Se pudo apreciar cierta diferencia entre los valores de las desviaciones estándar de las concentraciones al 40%, 70% y 100% (0.83, 2.03, 0.76 respectivamente) y del control (2.35). Seguidamente, al realizarse la prueba de ANOVA se corroboró que existía una diferencia significativa entre los grupos ($p < 0.001$). Tabla N°3

Con el fin de hallar en dónde se encuentra la diferencia se realizó la prueba de DUNCAN. Tabla N° 4

Con ello se determina que el extracto hidroalcohólico de eucalipto a una concentración del 100% tiene un efecto antimicrobiano similar al de vancomicina frente a esta cepa de *S. aureus*.

En el gráfico de medias se vuelve a recalcar la similitud del efecto antimicrobiano entre estos dos grupos. Gráfico N° 2

Actividad antimicrobiana In Vitro de los extractos hidroalcohólicos de Hojas de Eucalipto (Eucalyptus globulus Labill) en las concentraciones de 40, 70 y 100% y Control Vancomicina frente a Staphylococcus aureus, según halos de Inhibición (mm).

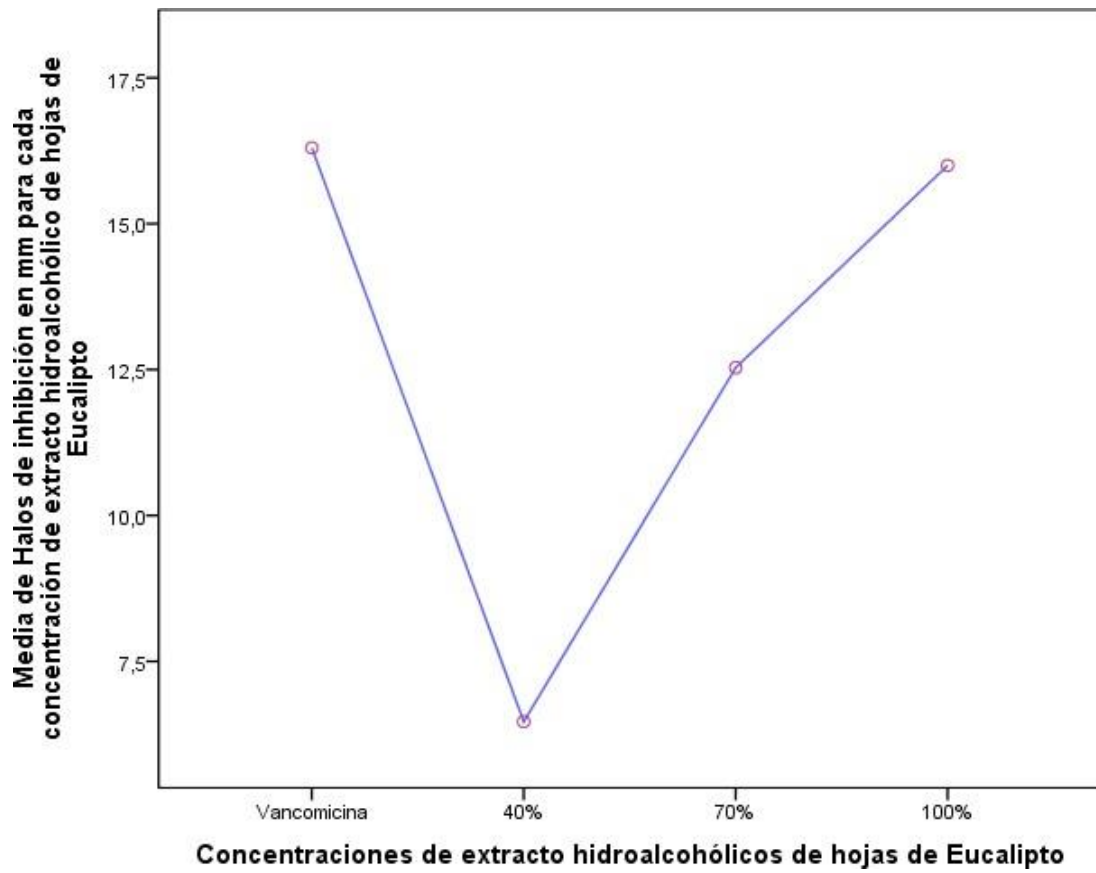
<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>gl</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
<i>Entre grupos</i>	940.05	3	313.35	114.79	0.0000
<i>Dentro de grupos</i>	152.87	56	2.73		
<i>Total</i>	1092.91	59			

Tabla 2.a

<i>Concentraciones de extracto hidroalcohólicos de hojas de Eucalipto</i>	<i>ni</i>	<i>Grupos para alfa = 0.05</i>		
		<i>G1</i>	<i>G2</i>	<i>G3</i>
<i>40%</i>	15	6.47		
<i>70%</i>	15		12.53	
<i>100%</i>	15			16.00
<i>Vancomicina</i>	15			16.30

Tabla 2.b

Gráfico N° 2



IV. DISCUSIÓN

Desde tiempos antiguos se han evaluado y utilizado a las plantas como una fuente natural terapéutica contra el dolor, inflamación e incluso infecciones; sin embargo en la actualidad las investigaciones realizadas han aumentado considerablemente con el propósito de hallar nuevos compuestos químicos en extractos y aceites esenciales que puedan contrarrestar a los microorganismos patógenos que han adquirido resistencia antibiótica; algunos de los cuales pueden presentarse en la cavidad oral tal como lo es el *Staphylococcus aureus*, especialmente en individuos susceptibles a infecciones, inmunológicamente comprometidos, sometidos a tratamientos de radio o quimioterapia y otros casos ya mencionados anteriormente y a los que es también de vital importancia prestarles la debida atención y estudio.

Por lo mencionado; este estudio se realizó bajo condiciones *in vitro* para poder determinar la actividad antimicrobiana de dos extractos hidroalcohólicos de dos plantas conocidas mundialmente por presentar propiedades medicinales y nutricionales destacables. Por otra parte se conoce a la vancomicina como un antibiótico glucopéptido utilizado en infecciones graves debido a su gran efecto bactericida al inhibir la síntesis de la pared celular bacteriana en bacterias Gram +, por estas características fue el control positivo ideal para este estudio.

A pesar las limitaciones que presentó esta investigación como el no contar con discos estandarizados para la prueba de disco difusión, lo que restringió la cantidad de extracto que se colocó en cada disco (de 30 μ L a 10 μ L por disco); lo cual pudo haber afectado el nivel de actividad antimicrobiana de los extractos, se demostró que ambos tenían un efecto antimicrobiano frente a *S. aureus*.

Los resultados que Chaves y col.²⁵ obtuvieron con el aceite esencial de *Eucalyptus camaldulensis* Dehn (EOEc) obtenido mediante una extracción por hidrodestilación aplicado sobre cepas de *S. aureus* meticilino resistentes concuerdan con los resultados del presente estudio, a pesar de que son diferentes subespecies de eucalipto, este presentó actividad antimicrobiana que se comprobó con el resultado de la concentración inhibitoria mínima en el primer estudio y con el método de discodifusión en este estudio; por lo tanto los compuestos químicos del *Eucalyptus sp.* sí poseen propiedades antimicrobianas frente a *S. aureus*.

Al igual que Chaves y col.²⁵, con las investigaciones que realizaron Argote-Vega y col.²⁶ y Mota y col.²⁹ sobre el aceite esencial de eucalipto entre otras plantas, se corroboran los resultados hallados por este estudio, ya que se encontró que *S. aureus* era sensible al aceite esencial de eucalipto (CMI y CMB de 6,8 µL/mL) y también presentó una alta inhibición en comparación con el control (clorhexidina 0.5%), respectivamente para cada estudio. Siendo además la misma especie de eucalipto la que se utilizó en la investigación de Mota y col.²⁹

Los mencionados estudios utilizaron el aceite esencial de *Eucalyptus sp.*, sin embargo los métodos de extracción de aceites esenciales aunque pueden ser sencillos tienen rendimientos bajos, requieren también de grandes cantidades del elemento del cual se va a obtener el extracto y el equipo necesario para una extracción satisfactoria suele ser muy sofisticado y costo.³⁵ Pese a ello los resultados obtenidos nos muestran que los compuestos químicos de *Eucalyptus sp.* sí poseen propiedades antimicrobianas frente a *S. aureus* y que esas propiedades se mantienen independientemente al método de extracción, ya que al haber realizado un extracto hidroalcohólico de eucalipto utilizando el método de destilación a reflujo, este igualmente presentó una actividad antimicrobiana frente a *S. aureus* como se pudo observar en los resultados.

Por otro lado, Pimentel y col.²⁸ estudiaron extractos etanólicos de diferentes plantas y al analizar sus principios activos encontraron que sí pueden poseer cierta efectividad antibacteriana frente a bacterias Gram positivos como lo es *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, Azuero y col.²⁷ evaluaron los extractos metanólicos de diferentes ejemplares de especies vegetales, cabe recalcar que entre ellas no se incluía el eucalipto ni el aguaymanto, y las enfrentaron contra cepas de *Staphylococcus aureus*, además de otras bacterias Gram negativas, obteniendo que *S. aureus* no presentó sensibilidad frente los extractos de las especies vegetales que utilizaron. Estos dos estudios efectuaron la extracción de estos componentes químicos de las plantas que estudiaron en cada caso, utilizando un alcohol como medio; la discrepancia puede deberse a que los componentes químicos de las plantas eran diferentes, no siendo la razón el método de extracción. En comparación a la presente investigación en la que se utilizó un extracto hidroalcohólico, es decir que se utilizó un alcohol (metanol) diluido con agua destilada como medio para la obtención del extracto y que al momento del análisis de la actividad antimicrobiana que presentaban se observó que el extracto hidroalcohólico de eucalipto sí presentó una actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, pero no el extracto hidroalcohólico de aguaymanto; este hecho confirma que la discrepancia puede deberse a los componentes químicos y/o principios activos de cada extracto.

V. CONCLUSIONES

- El extracto hidroalcohólico de aguaymanto no presentó una actividad antimicrobiana significativa, en cambio el de eucalipto sí presentó una acción antibacteriana significativa frente a *S. aureus*.
- La concentración al 100% del extracto hidroalcohólico de aguaymanto no presentó una actividad antimicrobiana significativa contra *S. aureus* en comparación a las concentraciones de 40% y 70% ni al control de vancomicina.
- El extracto hidroalcohólico de eucalipto a una concentración al 100% fue más eficaz que las concentraciones al 40% y 70% y fue también comparable a la acción antimicrobiana producida por la vancomicina.

VI. RECOMENDACIONES

- La realización de más trabajos de investigación sobre el tema con el fin de estandarizar la efectividad de un extracto hidroalcohólico de aguaymanto y eucalipto según el diámetro del halo en la técnica de disco-difusión.
- El uso de diferentes cepas clínicas en las que se prueben los extractos hidroalcohólicos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. OMS (2018). Resistencia a los antibióticos. [online] Who.int. Available at: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos> [Accessed 27 Apr. 2019].
2. Fernández, Y., Cardosa, E., Reyes, R., Rubio, D. and Martínez, D. (2015). Utilización de terapéutica antimicrobiana en enfermedades infecciosas. *Rev Inf Cient*, [online] 92(4), pp.930-944. Available at: <https://dialnet.unirioja.es/descarga/articulo/6027513.pdf> [Accessed 25 Apr. 2019].
3. OMS (2017). *La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*. [online] Who.int. Available at: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed> [Accessed 22 Apr. 2019].
4. Hossan, M., Jindal, H., Maisha, S., Samudi Raju, C., Devi Sekaran, S., Nissapatorn, V., Kaharudin, F., Su Yi, L., Khoo, T., Rahmatullah, M. and Wiart, C. (2018). Antibacterial effects of 18 medicinal plants used by the Khyang tribe in Bangladesh. *Pharmaceutical Biology*, [online] 56(1), pp.201-208. Available at: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13880209.2018.1446030> [Accessed 13 May 2019].
5. Gallegos-Zurita Maritza. Las plantas medicinales: principal alternativa para el cuidado de la salud, en la población rural de Babahoyo, Ecuador. *An. Fac. med.* [Internet]. 2016 Oct [Accessed 2019 May 02] ; 77(4): 327-332. Available at: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832016000400002&lng=es
6. Santiváñez, R. and Cabrera, J. (2013). Catálogo florístico de plantas medicinales peruanas. *Instituto Nacional de Salud*, [online] (1), pp.3, 36. Available at:

https://bvs.ins.gob.pe/insprint/CENSI/catalogo_floristico_plantas_medicinales.pdf [Accessed 21 Apr. 2019].

7. Leiva S, Zapata M, Gayoso G, Chang L. Frutas silvestres con potencial vitamínico de los Andes Centrales de América. *ArnaldoA* [Internet]. 2013 [cited 20 May 2019];20(2):316-336. Available from: <http://journal.upao.edu.pe/Arnaldoa/article/viewFile/126/122>
8. Lock, O., Pérez, E., Viliar, M., Flores, D. and Rojas, R. (2019). Bioactive Compounds from Plants Used in Peruvian Traditional Medicine. *Natural Product Communications*, [online] 11(3), pp.315-37. Available at: https://www.researchgate.net/publication/301583788_Bioactive_Compounds_from_Plants_Used_in_Peruvian_Traditional_Medicine [Accessed 29 Apr. 2019].
9. BioPatPerú (2015). Aguaymanto. *Comisión Nacional contra la Biopiratería*, [online] (1), pp.2-3. Available at: https://www.indecopi.gob.pe/documents/20182/143803/Boletin_N1_Aguaymanto.pdf [Accessed 23 Apr. 2019].
10. Barbosa L, Filomeno C, Teixeira R. Chemical Variability and Biological Activities of Eucalyptus spp. Essential Oils. *Molecules* [Internet]. 2016 [cited 24 April 2019];21(12):1671. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27941612>
11. Gottardi D, Bukvicki D, Prasad S, Tyagi A. Beneficial Effects of Spices in Food Preservation and Safety. *Frontiers in Microbiology* [Internet]. 2016 [cited 28 April 2019];7(1):1-7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5030248/pdf/fmicb-07-01394.pdf>
12. Agricultor E. Eucalipto, propiedades medicinales y beneficios para la salud [Internet]. *ECOagricultor*. 2019 [cited 20 May 2019]. Available from: <https://www.ecoagricultor.com/medicinal-eucalipto/>
13. Marsh K, Kulheim C, Blomberg S, Thornhill A, Miller J, Wallis I et al. Genus-wide variation in foliar polyphenolics in eucalypts. *Phytochemistry* [Internet]. 2017 [cited 27 April 2019];144:197-207. Available from:

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28957714>

14. Nwabor O, Vongkamjan K, Voravuthikunchai S. Antioxidant Properties and Antibacterial Effects of Eucalyptus camaldulensis Ethanolic Leaf Extract on Biofilm Formation, Motility, Hemolysin Production, and Cell Membrane of the Foodborne Pathogen *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogens and Disease* [Internet]. 2019 [cited 27 April 2019];:1-6. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30998111>
15. Kouidhi, B., Al Qurashi, Y. and Chaieb, K. (2015). Drug resistance of bacterial dental biofilm and the potential use of natural compounds as alternative for prevention and treatment. *Microbial Pathogenesis*, [online] 80, pp.39-49. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25708507> [Accessed 19 May 2019].
16. Jurado B, Aparcana I, Villarreal L, Ramos E, Calixto M, Hurtado P et al. Evaluación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de los frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) de diferentes lugares del Perú. *Rev Soc Quím Perú* [Internet]. 2016 [cited 20 May 2019];82(3):272-279. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v82n3/a03v82n3.pdf>
17. Muñoz A, Alvarado-Ortiz C, Blanco T, Castañeda B, Ruiz J, Alvarado Á. Determinación de compuestos fenólicos, flavonoides totales y capacidad antioxidante en mieles peruanas de diferentes fuentes florales. *Rev Soc Quím Perú* [Internet]. 2014 [cited 20 May 2019];80(4):287-297. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rsqp/v80n4/a08v80n4.pdf>
18. Garbacz K, Jarzembowski T, Kwapisz E, Daca A, Witkowski J. Do the oral *Staphylococcus aureus* strains from denture wearers have a greater pathogenicity potential?. *Journal of Oral Microbiology* [Internet]. 2018 [cited 26 April 2019];11(1):1536193. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6225501/>
19. Soni P, Singh R, Kumar L. Opportunistic Microorganisms in Oral Cavity

- According to Treatment Status in Head and Neck Cancer Patients. *Journal Of Clinical And Diagnostic Research* [Internet]. 2017 [cited 27 April 2019];11(9):14-17. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5713726/>
20. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *MicrobiolMol Biol Rev.* 2010;74(3):417–33.
 21. Luján D. Staphylococcus aureus resistente a meticilina asociado a la comunidad: aspectos epidemiológicos y moleculares. *An Fac med* [Internet]. 2013 [cited 19 May 2019];74(1):57-62. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v74n1/a11v74n1.pdf>
 22. Almståhl A, Finizia C, Carlén A, Fagerberg-Mohlin B, Alstad T. Mucosal microflora in head and neck cancer patients. *International Journal of Dental Hygiene* [Internet]. 2018 [cited 26 April 2019];16(4):459-466. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29766652>
 23. Yamashita K, Ohara M, Kojima T, Nishimura R, Ogawa T, Hino T et al. Prevalence of drug-resistant opportunistic microorganisms in oral cavity after treatment for oral cancer. *Journal of Oral Science* [Internet]. 2013 [cited 22 May 2019];55(2):145-155. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23748454>
 24. Vellappally S, Divakar D, Al Kheraif A, Ramakrishnaiah R, Alqahtani A, Dalati M et al. Occurrence of vancomycin-resistant Staphylococcus aureus in the oral cavity of patients with dental caries. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* [Internet]. 2017 [cited 24 May 2019];64(3):343-351. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28889756>
 25. Chaves T, Pinheiro R, Melo E, Soares M, Souza J, Andrade T et al. Essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn potentiates β -lactam activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* resistant strains. *Industrial Crops and Products* [Internet]. 2018 [cited 25 April 2019];112:70-74. Available from: https://www.researchgate.net/publication/320987125_Essential_oil_of_Eu

calyptus_camaldulensis_Dehn_potentiates_b-lactam_activity_against_Staphylococcus_aureus_and_Escherichia_coli_resistant_strains

26. Argote-Vega E, Suarez-Montenegro Z, Tobar-Delgado M, Perez-Alvarez J, Hurtado-Benavides A, Delgado-Ospina J. Evaluación de la capacidad inhibitoria de aceites esenciales en Staphylococcus aureus y Escherichia coli [Internet]. Scielo.org.co. 2017 [cited 28 April 2019]. Available from: <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v15nspe2/1692-3561-bsaa-15-spe2-00052.pdf>
27. Azuero, A., Jaramillo Jaramillo, C., San Martin, D. and D'Armas Regnault, H. (2016). Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador / Analysis of antimicrobial effect of twelve medicinal plants of ancient use in Ecuador. *Ciencia Unemi*, [online] 9(20), p.11. Available at: <http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/342> [Accessed 26 Apr. 2019].
28. Pimentel E, Castillo D, Quintana M, Maurtua D, Villegas L, Díaz C. Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en la tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. *Rev Estomatol Herediana* [Internet]. 2015 [cited 28 April 2019];25(3):268-277. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/reh/v25n4/a04v25n4.pdf>
29. Mota V, Turrini R, Poveda V. Antimicrobial activity of Eucalyptus globulus oil, xylitol and papain: a pilot study. *Revista da Escola de Enfermagem da USP* [Internet]. 2015 [cited 27 May 2019];49(2):0216-0220. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/reeusp/v49n2/0080-6234-reeusp-49-02-0216.pdf>
30. Educativo, P. (2016). Concentración en disoluciones. [online] Portaleducativo.net. Available at: <https://www.portaleducativo.net/segundo-medio/52/concentracion-en-disoluciones> [Accessed 16 May 2019].

31. OMS. Los microorganismos y los antimicrobianos [Internet]. Organización Mundial de la Salud. 2019 [cited 20 April 2019]. Available from: https://www.who.int/drugresistance/Microbes_and_Antimicrobials/es/
32. Ministerio de Salud del Perú (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. [online] Ins.gob.pe. Available at: <http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf> [Accessed 23 May 2019].
33. WMA. WMA - The World Medical Association-Declaración de Helsinki de la AMM – Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos [Internet]. Wma.net. 2017 [cited 29 April 2019]. Available from: <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>
34. Congreso de la República del Perú. Ley General de Salud - Ley N° 26842. Lima; 2019 p. 6,17.
35. Peredo-Luna H, Palou-García E, Lopez-Malo A. Aceites esenciales: Métodos de extracción. Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos [Internet]. 2009;3(1):24-32. Available from: [https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3\(1\)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf](https://www.udlap.mx/WP/tsia/files/No3-Vol-1/TSIA-3(1)-Peredo-Luna-et-al-2009.pdf)

VIII. ANEXOS

ANEXO N° 1

Instrumento de recolección de datos

- Cuadro de medición de los halos inhibitorios expresada en milímetros (mm) para evaluar la susceptibilidad del extracto hidroalcohólico de *Physalis peruviana* L.

N° de cultivo	Concentración del extracto hidroalcohólico de <i>Physalis peruviana</i> L.			Control positivo (vancomicina)
	40%	70%	100%	

- Cuadro de medición de los halos inhibitorios expresada en milímetros (mm) para evaluar la susceptibilidad del extracto hidroalcohólico de *Eucalyptus globulus* Labill.

N° de cultivo	Concentración del extracto hidroalcohólico de <i>Eucalyptus globulus</i> Labill			Control Positivo (vancomicina)
	40%	70%	100%	

ANEXO N° 2

Autorización de los laboratorios de Química y Microbiología de la Universidad Nacional de Cajamarca



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

"Norte de la Universidad Peruana"

AUTORIZACIÓN

El que suscribe, jefe del laboratorio de Química Ambiental del Departamento Académico de Química, por medio de la presente concede la autorización para que la Srta. **DIANA ELIZABETH URIOL PLASENCIA** pueda hacer uso de las instalaciones, materiales y equipos del laboratorio de Química Ambiental con la finalidad de realizar las pruebas experimentales relacionadas con su tesis.

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

Cajamarca, 8 de mayo de 2019

Una firma manuscrita en tinta azul que parece decir 'David Ricardo Uriol Valverde'.

MCs. Ing° DAVID RICARDO URIOL VALVERDE



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

Licenciada con Resolución del Consejo Directivo N°080-2018-SUNEDU/CD

"Norte de la Universidad Peruana"

AUTORIZACIÓN

El que suscribe, Responsable del laboratorio de Microbiología del Departamento Académico de Ciencias Biológicas, por medio de la presente concede la autorización para que la Srta. **DIANA ELIZABETH URIOL PLASENCIA**, estudiante de la EAP de Estomatología de la Universidad Privada Antenor Orrego de Trujillo, pueda hacer uso de las instalaciones, materiales y equipos del laboratorio de Microbiología, con la finalidad de realizar las pruebas experimentales relacionadas con su tesis.

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

Cajamarca, 6 de mayo de 2019



Dr. Marco Rivera Jacinto

Responsable del Laboratorio de Microbiología

ANEXO N° 3

Constancia de identificación del Herbarium CPUN



HERBARIUM CPUN
"ISIDORO SÁNCHEZ VEGA"
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

CONSTANCIA

El que suscribe;

Director del Herbario CPUN "Isidoro Sánchez Vega", hace constar; que después de haber comparado y analizado las dos (2) muestras botánicas procedentes del valle de Cajamarca, (distrito, provincia y departamento del mismo nombre); hace constar que corresponde, taxonómicamente a las especies que a continuación detallamos:

Muestra 1:

Especie: *Eucalyptus globulus* Labill.
Familia: Myrtaceae
Orden: Myrtales
N. V. : "eucalipto"

Muestra 2:

Especie: *Physalis peruviana* L.
Familia: Solanaceae
Orden: Solanales
N. V. : "aguaymanto", "tomatillo", "tomatillo silvestre"

La muestra fue colectada por la estudiante de la escuela académico profesional de Estomatología Diana Elizabeth Uriol Plasencia, identificada en este Herbario.

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

Cajamarca, 27 de mayo de 2019




M.Sc. Gustavo Iberico Vela
DIRECTOR HERBARIO CPUN "I.S.V."

ANEXO N° 4

Resolución del Comité de Bioética UPAO



UPAO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN
COMITÉ DE BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN

"AÑO DE LA LUCHA CONTRA LA CORRUPCIÓN Y LA IMPUNIDAD"

Trujillo, 18 de Octubre de 2019

RESOLUCIÓN PRESIDENCIAL COMITÉ DE BIOÉTICA N° 091-2019-UPAO

VISTO, y;

CONSIDERANDO

Que, mediante escrito de fecha 18 de octubre de 2019, la estudiante Diana Elizabeth Uriol Plasencia, solicita que se le brinde conformidad a su proyecto de investigación, de acuerdo a lo establecido en el Reglamento del Comité de Bioética en Investigación;

Que, por Resolución Rectoral N° 3335-2016-R-UPAO, de fecha 07 de julio de 2016, se aprobó el Reglamento del Comité de Bioética, que se encuentra publicado en la página web de la Universidad, con el objeto de su aplicación obligatoria en las investigaciones que comprometan a seres humanos y otros seres vivos dentro de los estudios que sean patrocinados por la UPAO y sean conducidos por algún docente o investigador de las Facultades, Escuelas de Posgrado, Centros de investigación y Establecimiento de Salud administrados por la UPAO;

Que, por Resolución de Decanato N° 1847-2019-FMEHU-UPAO se autorizó la inscripción del proyecto de tesis titulado "Actividad antimicrobiana in vitro de los extractos hidroalcohólicos de frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) y de hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) frente a *Staphylococcus aureus*", por reunir las características y requisitos reglamentarios declarándola expedita para la realización del trabajo correspondiente;

Que, luego de la evaluación formulada al expediente, el Comité considera que el proyecto no contraviene las disposiciones del Reglamento de Bioética, por lo tanto es procedente su aprobación;

Estando a las razones expuestas y de conformidad con el Reglamento de Bioética de Investigación;

SE RESUELVE:

Primero: APROBAR el proyecto de investigación titulado "Actividad antimicrobiana in vitro de los extractos hidroalcohólicos de frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) y de hojas de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) frente a *Staphylococcus aureus*", presentado por la estudiante Diana Elizabeth Uriol Plasencia.

Segundo: Dese cuenta al Vicerrectorado de Investigación con la presente resolución.

REGÍSTRESE, COMUNÍQUESE Y ARCHÍVESE.

Dr. VÍCTOR HUGO CHANDUVÍ CORNEJO
PRESIDENTE

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO
www.upao.edu.pe

Av América Sur 3145 Monsenate Trujillo - Perú
Telf: (+51)(044) 604444 anexo 124
Fax: 262900

IMÁGENES

Imagen 1. *Pesado de los frutos de Physalis peruviana L.*



Imagen 2. *Preparación de la disolución hidroalcohólica ($\text{CH}_3\text{OH}_{(ac)}$ al 50%)*



Imagen 3. Mezcla de la disolución hidroalcohólica con los frutos de *Physalis peruviana* L.



Imagen 4. Extracción por destilación a reflujo de *Physalis peruviana* L.



Imagen 5. *Filtración al vacío del extracto hidroalcohólico de Physalis peruviana L.*



Imagen 6. *Concentración del extracto hidroalcohólico de Physalis peruviana L.*



Imagen 7. *Obtención de los extractos hidroalcohólicos de Physalis peruviana L. al 40%, 70% y 100%*



Imagen 8. *Preparación de las hojas de Eucalyptus globulus Labill*



Imagen 9. *Pesado de las hojas de Eucalyptus globulus Labill*



Imagen 10. Mezcla de la disolución hidroalcohólica con las hojas de *Eucalyptus globulus* Labill



Imagen 11. Extracción por destilación a reflujo de *Eucalyptus globulus* Labill



Imagen 12. *Filtración al vacío del extracto hidroalcohólico de Eucalyptus globulus Labill*



Imagen 13. *Concentración del extracto hidroalcohólico de Eucalyptus globulus Labill*



Imagen 14. *Reactivación de las cepas de Staphylococcus aureus*



Imagen 15. (a y b) *Prueba de sensibilidad bacteriana a la cepa de Staphylococcus aureus*

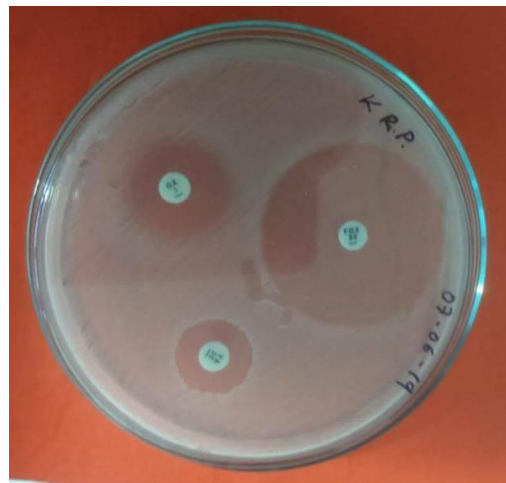
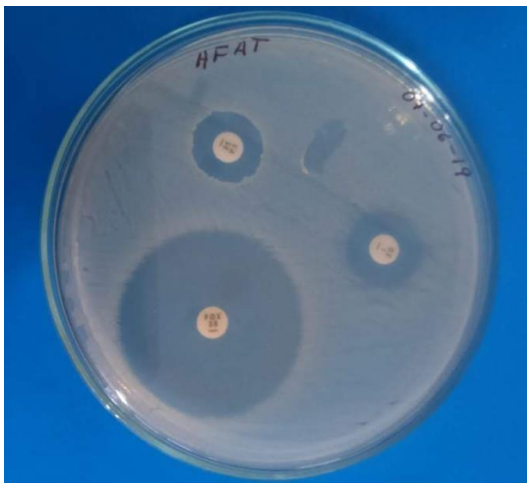


Imagen 16 (a y b). Prueba de disco-difusión de los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* L. y *Eucalyptus globulus* Labill frente a *Staphylococcus aureus*

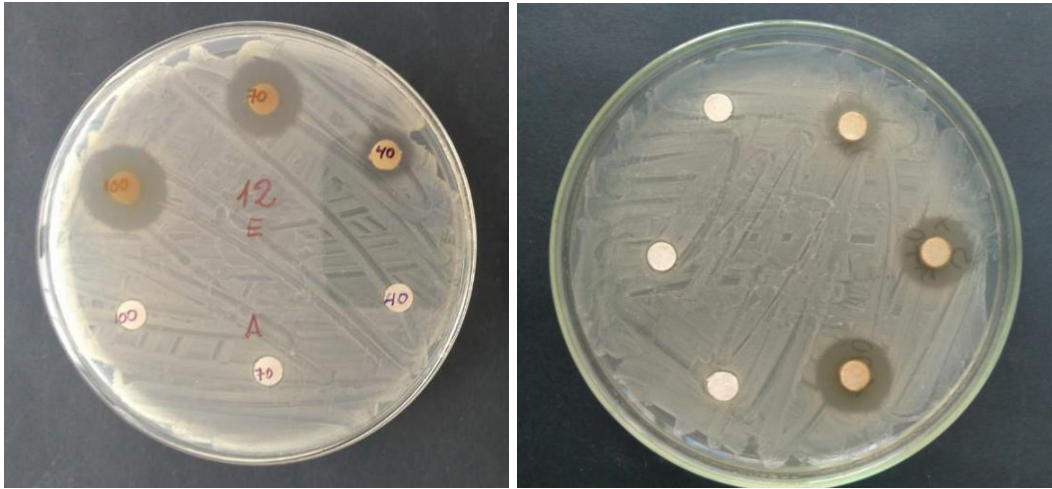


Imagen 17 (a y b). Medición de los halos producidos por los extractos hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* L. y *Eucalyptus globulus* Labill frente a *Staphylococcus aureus*

