

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA



TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO CIRUJANO

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ACUOSO
DE LA SEMILLA DE *Moringa oleifera* (MORINGACEAE)
“MORINGA” SOBRE *Staphylococcus aureus*
METICILINO RESISTENTE COMPARADO CON
OXACILINA *IN VITRO***

AUTOR: ALCANTARA NORIEGA, DANELLI CRISTINA

ASESOR: PILCO CONTRERAS, MARLENY

CO ASESORA: MEJIA DELGADO, ELVA

**Trujillo - Perú
2020**

FIRMAS DEL JURADO, ASESOR Y AUTOR

**EFFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA
SEMILLA DE *Moringa oleifera* (MORINGACEAE) "MORINGA"
SOBRE *Staphylococcus aureus* METICILINO RESISTENTE
COMPARADO CON OXACILINA *IN VITRO***

PRESIDENTE DEL JURADO

SECRETARIO DEL JURADO

VOCAL DEL JURADO

JURADO SUPLENTE

ASESOR DE TESIS

CO-ASESOR DE TESIS

AUTOR DE TESIS

*"Dondequiera que se ama el arte de la medicina se ama también a la humanidad."
- Platón*

DEDICATORIA

A mis padres Danelli Noriega y Andrés Alcántara, por su eterna guía, ejemplo de perseverancia, apoyo incondicional en todo este camino. Sin ellos nada de este gran trabajo sería posible. Gracias por darme esta maravillosa oportunidad de vida. Gracias por darme la vida. ¡Má, lo logramos! Los amo.

A mis hermanas Diana y Lucero por su amor, apoyo y paciencia, gracias por ser mis compañeras en este gran viaje llamado vida.

A mi familia Alcántara Paredes y Noriega Roldán, por el tiempo que nos dedican, por cada palabra de aliento, guía y amor incondicional. Gracias por ser mi ejemplo de superación y dedicación.

A Dios y a la vida, por enseñarme a valorar en todo su esplendor. Agradecida por las experiencias, privilegios y carencias que me han tocado vivir. Todo esto ha sido necesario para convertirme en la persona de valores que soy ahora. Estoy agradecida y feliz por ser la persona que soy; sabiendo que aún falta mucho por aprender.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ *A la Dra. Elva Manuela Mejía Delgado, docente de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Privada Antenor Orrego y responsable del área de microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Trujillo; un agradecimiento especial por todo su aporte durante mi carrera universitaria, desde inicio de la carrera y ahora siendo participe de manera sobresaliente en el trabajo para la obtención de mi título universitario. Gracias por todos su conocimientos y bondad.*
- ❖ *A mi Asesora Dra. Marleny Pilco Contreras y Mg. José Luis Fernández Sosaya, docentes de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Privada Antenor Orrego; por su aporte académico e interés en la realización de este trabajo. Sobre todo por enseñarme e inculcarme el amor por la Medicina Complementaria y Alternativa.*
- ❖ *Al Dr. Arellano Barragán Julio César, docente de la Facultad de Microbiología de la Universidad Nacional de Trujillo; por haberme brindado el material de trabajo necesario, Moringa oleifera, teniendo como única motivación la docencia universitaria y su interés mutuo por la investigación.*
- ❖ *A la Mg. Q.F. Marilú Soto Vásquez, docente de la Facultad de Farmacia y bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo; por su instrucción y aporte en la preparación de las concentraciones del extracto acuoso de semilla de la Moringa oleifera.*
- ❖ *Al Dr. Sergio Chafloque Viteri, docente del Departamento de Estadística de la Universidad Nacional de Trujillo; por su asesoramiento en la parte estadística.*
- ❖ *A todos los docentes de mi casa de estudio, Universidad Privada Antenor Orrego por su guía y enseñanzas en nuestra bella carrera.*

RESUMEN

OBJETIVO: Evaluar si el efecto antibacteriano del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* (Moringaceae) “moringa” sobre cepa de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente es similar al efecto de la oxacilina *in vitro*. **MATERIAL Y MÉTODOS:** Estudio experimental. Doble ciego. Preparación del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* en concentraciones de 30 mg/ml, 60 mg/ml, 90 mg/ml, 120 mg/ml bajo las denominaciones BI, BII, BIII y BIV respectivamente; fueron aplicadas sobre placas inoculadas con *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y como control positivo y negativo se utilizó oxacilina y solución fisiológica (NaCl 0.9%) respectivamente. Se realizó 12 repeticiones para cada concentración a través del método Kirby-Bauer y su clasificación según la Escala de Duraffourd que determinó el efecto inhibitorio. También se halló la Concentración mínima inhibitoria (CMI) correspondiendo al menor nivel de turbidez, fue medido a través de un espectrofotómetro. Estadísticamente se sometió a un análisis de varianza (ANOVA) y prueba de DUNCAN ambas pruebas con nivel de significancia $p < 0.05$. **RESULTADOS:** La medición del nivel de turbidez para hallar CMI dió como resultado 0.027, 0.040, 0.032, 0.024 y 0.024 para BI, BII, BIII, BIV y oxacilina respectivamente. Los promedios de los halos de inhibición para cada concentración son: 17.42 mm para BI; 20.17 mm, BII; 21.00 mm, BIII; 24.92 mm, BIV. Prueba ANOVA muestra diferencia altamente significativa ($p < 0.001$) entre los tratamientos aplicados. **CONCLUSIONES:** El efecto antibacteriano del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* evaluado con la formación de halos de inhibición fue positivo sobre SARM. Existe una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre las concentraciones de los extractos y el control positivo (Oxacilina). La concentración mínima inhibitoria le corresponde a la concentración de 120 mg/ml del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* y al control positivo con oxacilina, demostrando similar efecto inhibitorio en el crecimiento de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

Palabras Clave: Efecto antibacteriano; *Moringa oleifera*; extracto acuoso; *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To assess whether the antibacterial effect of the aqueous extract of *Moringa oleifera* (Moringaceae) "moringa" on a strain of resistant methicillin *Staphylococcus aureus* is similar to the effect of oxacillin in vitro. **MATERIAL AND METHODS:** Experimental study. Double-blind. Preparation of the aqueous extract of *Moringa oleifera* seed in concentrations of 30 mg / ml, 60 mg / ml, 90 mg / ml, 120 mg / ml under the names BI, BII, BIII and BIV respectively; They were applied on plates inoculated with resistant methicillin *Staphylococcus aureus* and oxacillin and physiological solution (NaCl 0.9%) were used as positive and negative control, respectively. 12 repetitions were performed for each concentration through the Kirby-Bauer method and its classification according to the Duraffourd Scale that determined the inhibitory effect. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) corresponding to the lowest level of turbidity was also found, it was measured through a spectrophotometer. Statistically, an analysis of variance (ANOVA) and DUNCAN test were carried out on both tests with a significance level of $p < 0.05$. **RESULTS:** The measurement of the turbidity level to find MIC was as a result 0.027, 0.040, 0.032, 0.024 and 0.024 for BI, BII, BIII, BIV and oxacillin respectively. The averages of the inhibition halos for each concentration are: 17.42 mm for BI; 20.17 mm, BII; 21.00 mm, BIII; 24.92 mm, BIV. ANOVA test shows highly significant difference ($p < 0.001$) between the applied treatments. **CONCLUSIONS:** The antibacterial effect of the aqueous extract of *Moringa oleifera* seed evaluated with the formation of inhibition halos was positive on MRSA. There is a significant difference ($p < 0.05$) between the concentrations of the extracts and the positive control (Oxacillin). The minimum inhibitory concentration corresponds to the concentration of 120 mg / ml of the aqueous extract of the *Moringa oleifera* seed and to the positive control with oxacillin, demonstrating a similar inhibitory effect on the growth of resistant methicillin *Staphylococcus aureus*.

Key Words: Antibacterial effect; *Moringa oleifera*; aqueous extract; Static methicillin resistant *Staphylococcus aureus*.

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	9
I.1	MARCO TEÓRICO	9
I.2	PROBLEMA	16
I.3	HIPÓTESIS	16
I.4	OBJETIVOS	17
II.	MATERIALES Y MÉTODOS	18
II.1	DISEÑO DE ESTUDIO	18
II.2	POBLACIÓN	18
II.3	MUESTRA Y MUESTREO	18
II.4	TAMAÑO MUESTRAL	19
II.5	DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES	20
II.6	DEFINICIÓN CONCEPTUAL DE VARIABLES	21
II.7	MÉTODOS, TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS	22
II.8	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS	29
II.9	ASPECTOS ÉTICOS	30
III.	RESULTADOS	31
IV.	DISCUSIÓN	37
V.	CONCLUSIONES	43
VI.	RECOMENDACIONES	44
VII.	LIMITACIONES	44
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
IX.	ANEXOS	48

I. INTRODUCCIÓN:

I.1 MARCO TEÓRICO

Los datos actualizados acerca de las infecciones bacterianas y la resistencia antibiótica son de características alarmantes; ya que ambas se encuentran en crescendo de manera conjunta, siendo hoy en día una problemática global. Secundario a esto, se asocia el aumento de la baja susceptibilidad a los antibióticos y con ello la acentuación de infecciones bacterianas "no tratables", convirtiendo la búsqueda de nuevas estrategias para combatir infecciones en una urgencia. Si nos remontamos en la historia, el uso de antibióticos inicio en el descubrimiento de la penicilina en el año 1928, desde entonces se expandió su uso. Cuando hablamos de resistencia antibiótica tenemos como ejemplo al *Staphylococcus aureus*, quien desarrolló resistencia a la penicilina al poco tiempo de su aparición, dicha resistencia se ha mostrado evasiva progresivamente a las diferentes alternativas que se planteaban. (1) (2) (3) (4).

La resistencia a los antibióticos tiene como causa principal al uso indiscriminado e irracional de estos fármacos. En la actualidad, el problema se ha agudizado por la no inversión en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos. El desarrollo de estos productos tienen un elevado costo debido a que conlleva varios años concluir y realizar los ensayos clínicos correspondientes. (1).

Se estima un valor de 2 millones de infecciones y 23 000 muertes en Estados Unidos por año, debido a los organismos resistentes a los antibióticos (ORAs) así lo afirma los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) de EE.UU. (3) (4).

En 2015, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció estrategias globales para contener y combatir las infecciones resistentes a los antibióticos, los cuales consisten en: Educar sobre la resistencia antimicrobiana, desarrollar y utilizar pruebas para identificación y caracterización de los microorganismos resistentes, implementar la colaboración internacional con objetivo de mejorar la capacidad de prevención; por lo tanto recibir más apoyo para realizar actualizaciones basada en investigación básica y aplicada, siendo pilares para el desarrollo de nuevos antibióticos vacunas y otras terapias. (1) (4).

El concepto de farmacorresistencia consiste en el proceso de cambios a travasar por los diferentes microorganismos hasta lograr que un medicamento sea ineficiente sobre él. (1).

La multirresistencia es causada por la capacidad de adquisición de material genético foráneo como genes de resistencia o mutación durante su replicación genómica en respuesta a los agente nocivos que atentan contra estos microorganismos. En el estudio realizado por María Pérez et al hace resalte del alto porcentaje de resistencia desarrollado por *Staphylococcus aureus* y

Escherichia coli, responsables de una variedad de enfermedades por su alto nivel de virulencia. (4) (5) (6) (7) (8).

Rocha et al en el 2015 realizan un estudio donde se expone la realidad en el Perú, estudio donde se contrasta la epidemiología de once países de América. Las estadísticas de la prevalencia en el Perú data los siguientes resultados: Presencia de 54% de *Escherichia coli* y 70% *Klebsiella pneumoniae* β -lactamasas positivo de espectro extendido; *Enterococcus sp.* resistentes a vancomicina, 16%; y 79%, *S. aureus* metilino resistente (SARM) (4). Según los resultados de la evaluación de resistencia antibiótica se aprecia que *Staphylococcus aureus* metilino resistente es quien tiene un porcentaje predominante sobre los demás microorganismos, razón por la cual es el patógeno de elección para esta investigación.

El *Staphylococcus aureus* es probablemente uno de los más versátiles microorganismos patógenos, siendo patógena más del 30% de su especie. Su patogenia es dada por su capacidad invasora, permitiéndole colonizar, invadir y evadir la respuesta del hospedero; otro mecanismo de desarrollar enfermedad es mediante el uso de toxinas. Es capaz de prolongar su supervivencia persistiendo en estado inactivo en diversos tejidos por largo periodo. También posee una alta tasa de colonización en pacientes inmunocomprometidos. (9)(10).

Actualmente la adaptación genómica generada a través de la transferencia horizontal de información a partir de otras especies bacterianas; genera que *Staphylococcus aureus* presente cúmulos de genes de enterotoxinas, exotoxinas o genes determinantes de resistencia antimicrobiana; principalmente el gen identificado es el gen *mec A*, quien está encargado de la meticilino resistencia. Es importante el *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM) por la capacidad de sus cepas extrahospitalarias de provocar enfermedad en personas inmunocompetentes. Existen datos documentados haciendo referencia que en la última década han existido brotes epidémicos de infecciones extrahospitalarias causadas por SARM, ocurridos de similar magnitud tanto en zonas rurales como urbanas. Los factores de riesgos encontrados han sido condiciones insalubres, material contaminado, contacto con personas infectadas y lesiones cutáneas. La mayor parte de las infecciones por SARM extrahospitalarias son en piel y tejidos blandos. En Perú la prevalencia de cepas SARM en pacientes hospitalizados es de 70%. (9)(10).

Por otro lado tenemos nuestra otra variable en estudio la *Moringa oleifera*; es decir los productos de origen vegetal, quienes cuentan con una línea de tiempo basada en su utilización con diferentes etapas según la popularidad de sus usos y propiedades. En la actualidad la interacción de la medicina científica y tradicional es una realidad. La aplicación de la medicina complementaria y alternativa ha incrementado en países en vías de desarrollo como resultado de estudios preclínicos y clínicos realizados por la OMS, quien proporciona una base científica de la efectividad de muchas plantas utilizadas en la medicina

popular para tratar infecciones u otras patologías, a la par se promueve mayor investigación en este tipo de trabajos. (2) (11) (12) (13).

La Fitoterapia es la ciencia responsable del estudio de productos de origen vegetal para utilidad terapéutica y puede verse involucrada en la prevención, atenuación o tal vez en la curación de alguna patología. Las drogas vegetales y sus diferentes derivados son la base fundamental de los medicamentos fitoterapéuticos. Tres conceptos básicos establecidos por la OMS son: a. Planta medicinal es cualquier planta que contenga en sus partes sustancias útiles para fines terapéuticos o precursores de la semisíntesis químico-farmacéutica, b. Droga vegetal es parte de la planta medicinal utilizable en terapias, c. Principio activo es sustancia con actividad farmacológica. (6) (11).

En este estudio se eligió la planta de especie *Moringa oleifera* popularmente llamado “moringa” o “árbol milagroso” por sus múltiples usos y propiedades debido a su alta variedad de fitoquímicos presentes en cada una de sus partes. *Moringa oleifera* es una de las trece especies identificadas de la familia *Moringaceae*, género *Moringa*, de origen en la zona de los Himalayas, nativa de la India. En la actualidad tiene una amplia distribución en América, África, Europa, Oceanía y Asia, demostrando su gran capacidad de adaptación por su crecimiento en regiones tropicales, subtropicales y semiáridas del mundo. Se caracteriza por sus hojas pinnadas y su vaina larga y leñosa que al madurar se

abre en tres valvas, donde se contienen las semillas con sus características tres alas. (14) (15) (16) (17) (18).

Los beneficios de la *Moringa oleifera* en la salud reportados son su uso en alimentación animal y humana por su valor nutritivo, es decir alto contenido de vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales; también se menciona actividad antimicrobiana, prevención de cáncer, actividad antioxidante, actividad antiinflamatoria, actividad hipoglucemiante y antihipertensiva. (5) (15) (18) (19). En este trabajo nos enfocaremos en su actividad antimicrobiana.

Velasquez-Zavala et al identificó los principales fitoquímicos en la diversas partes de la planta, algunos son: Taninos, saponinas, polifenoles, glucósidos fenólicos, esteroides, ácidos grasos, alcaloides; entre los metabolitos minoritarios: pterigospermina o bencil isotiocianato, glucosinolatos, dipéptidos (acetato de aurantiamida). Dichos fitoquímicos son responsables de las propiedades anteriormente mencionadas. (18).

En este estudio se trabaja con la semilla de *Moringa oleifera* por ser la parte de la planta con mayor cantidad de compuestos con actividad antibacteriana; entre ellos tenemos el isotiocianato de bencilo, seguido de taninos, polifenoles (quercetina, flavonoides), glucósido fenólico (niazirina) y (-)-Catequina. Su actividad bacteriostática es debida a la inhibición de enzimas esenciales, acción que provoca daño en la membrana por ende pérdida de su integridad. El

principal responsable de este funcionamiento es el isotiocianato de bencilo, el cual mostró actividad bactericida contra algunas cepas patógenas donde se incluyen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.* y *Legionella sp.* resistente a antibióticos. (5) (15) (16) (18) (19).

Los beneficios de este árbol pueden aprovecharse en la presentación de planta fresca, seca o a través de la obtención de extractos por ejemplo extracto de tipo acuoso, etanólico o utilizando éter; pueden obtenerse de cualquier parte de la planta. La actividad biológica de los extractos se ve potenciada gracias al sinergismo existente entre los fitoquímicos presentes. (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27).

En el Perú la introducción de este árbol ha sido exitosa; pero actualmente sólo se aprovecha sus propiedades nutricionales para tratar reducir la desnutrición infantil, la producción de papel, purificador del agua, aceite de uso humano y/o biodiésel. (28).

Considero que la incorporación y promoción de la Medicina Complementaria y Alternativa, aplicada de manera adecuada con las investigaciones necesarias, nos brindará diversas alternativas o tratamientos adyuvantes, los cuales ayudarán a combatir en gran medida con los problemas de resistencia antibiótica en el Perú; por ende se debe promover estudios de investigación para tener una mayor base de datos.

I.2 PROBLEMA

¿Tiene el extracto acuoso de la semilla de la *Moringa oleifera* (Moringaceae) similar efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente comparado con oxacilina *in vitro*?

I.3 HIPÓTESIS

Ho: El extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* (Moringaceae) no tiene similar efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente comparado con oxacilina *in vitro*.

Ha: El extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* (Moringaceae) tiene similar efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente comparado con oxacilina *in vitro*.

I.4 OBJETIVOS

A. GENERAL:

Evaluar si el efecto antibacteriano del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* (Moringaceae) sobre *Staphylococcus aureus* metilino resistente es similar comparado con oxacilina *in vitro*.

B. ESPECÍFICOS:

1. Determinar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* (Moringaceae) sobre *Staphylococcus aureus* metilino resistente *in vitro*.
2. Demostrar la concentración mínima inhibitoria comparando cuatro concentraciones del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* (Moringaceae) sobre *Staphylococcus aureus* metilino resistente.
3. Comparar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* (Moringaceae) sobre *Staphylococcus aureus* metilino resistente con oxacilina *in vitro*.

II. MATERIAL Y MÉTODO

2.1 Diseño de estudio

Experimental *in vitro*. Doble ciego.

2.2 Población

2.2.1 Población universo

Staphylococcus aureus meticilino resistente (SARM).

2.2.2 Población estudio

Conjunto de placas de Petri inoculadas con *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

2.3 Muestra y muestreo

2.3.1 Unidad de análisis

Placa de Petri con medio de cultivo Agar Muller Hinton inoculado con *Staphylococcus aureus* meticilino resistente más extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera*.

2.3.2 Unidad de muestreo

Halo de inhibición en placa de Petri formado por *Staphylococcus aureus* meticilino resistente con extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera*.

2.4 Tamaño muestral

Se utilizó fórmula estadística que ayudó hallar el número de repeticiones necesarias para tener validez experimental. (29) (30) (31).

$$N = \frac{(Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 2S^2}{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)^2}$$

Dónde:

N: Número de repeticiones a realizar en investigaciones

$Z_{\alpha/2}$: 1.96 que es un coeficiente de confianza del 95% o para un $\alpha = 0,05$

Z_{β} : 0.84 que es un coeficiente en la distribución normal para una potencia de prueba del 80% o para un $\beta = 0,20$.

$S = 0.8 (\bar{x}_1 - \bar{x}_2)$; valor dado por no haber estudios similares previos.

Reemplazando:

$$N = (1.96 + 0.84)^2 2(0.64) = 12 \text{ repeticiones}$$

Entonces la muestra estuvo conformada por 12 repeticiones por cada concentración del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* elaborado; a la vez se tuvo un control positivo y negativo, con oxacilina y suero salino fisiológico (NaCl 0.9%) respectivamente.

2.6 Definición conceptual de variables :

a. Efecto antibacteriano *in vitro*

Capacidad de inhibir la producción o causar la muerte de un agente bacteriano en condiciones experimentales.(26)

b. Extracto acuoso

Preparación en agua que contiene el principio activo de una planta o parte de una planta.

c. Extracto acuoso de la semilla de la *Moringa oleifera*

Preparación en agua destilada de la semilla de *Moringa oleifera* contiene los principios activos. En cuatro concentraciones 30 mg/ml, 60 mg/ml, 90 mg/ml y 120 mg/ml, es decir al 3%, 6%, 9% y 12% respectivamente.

d. Halo de Inhibición

Zona alrededor del disco donde una sustancia antibacteriana es capaz de impedir el crecimiento de la bacteria al cabo de 18 a 24 horas de incubación. Se midieron los diámetros de estos halos según la Escala de Duraffourd.

e. Escala de Duraffourd

Escala utilizada para determinar el efecto inhibitorio *in vitro* según el diámetro del halo de inhibición.

2.7 Métodos, técnicas y procedimientos:

1) Se solicitó aprobación del proyecto de tesis a cargo del Comité de Investigación de la Escuela Profesional de Medicina Humana y del Comité de Bioética de la Universidad Privada Antenor Orrego.

2) Se realizó la recolección, identificación y determinación taxonómica:

- Se recolectó la especie en huerto familiar ubicado Mz E Lote 15 - Las Lomas sector II distrito de Huanchaco, provincia de Trujillo, región La Libertad, Perú (Altitud 21 mts, 8°05'22.6"S 79°06'51.9"W) Fecha: 26 Septiembre 2018.

- Se realizó la identificación y determinación taxonómica de la especie de la planta, *Moringa oleifera* (Moringaceae), en el Herbarium Truxillense (HUT) de la Universidad Nacional de Trujillo.

3) Obtención de la muestra:

Se recolectaron las semillas dentro de sus vainas leñosas maduras, se salvaguardaron en una caja de cartón. Luego de extraerlas de sus vainas, se pesaron y se obtuvo 770 gramos de semillas de *M. oleifera* fresca.

4) Preparación de la muestra

a. Selección: El material vegetal recolectado fue transportado al laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, donde se seleccionaron las semillas que estaban en buenas condiciones y se eliminaron aquellas semillas que presentaban ataques de hongos. Restando 750 g para el trabajo.

b. Lavado: Se procedió a lavar el material vegetal con agua destilada, seguido de una desinfección, utilizando hipoclorito de sodio al 0.5%. Posteriormente, se realizó un enjuague con agua destilada estéril, esto es para retirar los residuos de hipoclorito.

c. Secado: Luego de ser lavadas las semillas fueron colocadas en papel Kraft, y se las llevó a la estufa de circulación de aire a 40 °C durante 48 horas para su respectivo secado. El peso seco obtenido fue 726 gramos.

d. Molienda y Tamizaje: Se procedió a moler las semillas desecadas con molino hasta obtener polvo grueso y luego se pasó a través de tamiz de # 20 para homogeneizar el tamaño de partículas. Muestra obtenida luego del tamizaje fue de 337 gramos.

5) Método de preparación del extracto acuoso:

La preparación del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* se realizó por el método de extracción directa por reflujo, el cual consiste en un circuito cerrado continuo. Hicimos uso de sus dos sistemas necesarios; el sistema de calentamiento logrado a través de una hornilla eléctrica portátil y el sistema de refrigerado aplicado por un circuito de agua continuo; estos sistemas fueron puestos en contacto con el balón de vidrio utilizado que contenía la mezcla para extracción. Para la preparación de la mezcla se pesó solo 100 g de los 337 gramos de semillas en polvo, el resto de la muestra se reservó; luego colocadas dentro de un balón de vidrio de 2 litros de capacidad. Donde añadimos 500 ml de agua destilada. Se mezcló adecuadamente, posteriormente se llevó a reflujo por 2 horas. Transcurrido el tiempo, se procedió a filtrar el extracto utilizando la filtración al vacío con papel de filtro Whatman N° 1.

A continuación se llevó el extracto obtenido a un rotavapor para lograr concentrar la muestra, se obtuvo un extracto blando. Este resultado fue llevado a secar a la estufa de circulación de aire a 40 °C hasta obtener el extracto seco. A partir del extracto seco se preparó las concentraciones de 30 mg/ml, 60 mg/ml, 90 mg/ml y 120 mg/ml disueltos en agua destilada; es decir a la concentración porcentual de 3%, 6%, 9% y 12% respectivamente. Todos los extractos concentrados fueron esterilizados

mediante filtración utilizando membranas de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.45 μm (Millipore).

Finalmente, las cuatro concentraciones del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* fueron almacenados en frascos de vidrio de color ámbar esterilizados previamente en autoclave y puestos en refrigeración (4-8°C) hasta su posterior utilización.

6) Obtención del patógeno:

Staphylococcus aureus meticilino resistente fue brindado por el cepario de Microbiología en la Universidad Nacional de Trujillo.

7) Preparación del inóculo:

La bacteria se diluyó en solución salina hasta llegar a la obtención de una concentración semejante al tubo 0.5 de la Escala de MacFarland.

8) Obtención del control positivo y control negativo:

- Para control positivo se utilizó el antibiótico oxacilina, se obtuvo a través de su compra en una farmacia local al azar. En la presentación de un frasco de vidrio conteniendo polvo para solución inyectable, en la concentración de 1 gramo (g) del laboratorio Vitalis. La oxacilina fue diluida en 5 ml de solución fisiológica (NaCl 0.9%) para su posterior utilización. Entonces la concentración total obtenida fue 1 g/5 ml,

expresado porcentualmente es una concentración al 20% equivalente a 200 mg/ml, de esta concentración se utilizó 50 microlitros (uL) volumen elegido para la aplicación en las placas de Petri y 1.6 mililitros (ml) en el tubo de ensayo.

- Para control negativo se utilizó solución salina o suero fisiológico (NaCl 0.9%), brindada por el laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de Trujillo.

9) Evaluación del efecto antibacteriano:

a. El *Staphylococcus aureus* meticilino resistente (SARM) se sometió al método de discos de Kirby y Bauer con diferentes concentraciones del extracto acuoso de *Moringa oleifera* de 30 mg/ml, 60 mg/ml, 90 mg/ml, 120 mg/ml o en su equivalente porcentual de 3%, 6%, 9% y 12% respectivamente. Comparado con un control positivo con oxacilina de 200 mg/ml o 20% y el control negativo con solución salina al 0.09%.

b. El Agar Muller Hinton se preparó 24 horas de su utilización y fue colocado durante este periodo en la incubadora para verificar el no crecimiento de otras bacterias. Posterior a su verificación se realizó 3 hoyos en cada placa de Petri con un sacabocado esterilizado, este método se repitió en 4 placas para cada concentración; es decir se obtuvieron 12 repeticiones por cada concentración y para el control

positivo y negativo se realizó 1 hoyo para cada uno en su respectiva placa de Petri. Todo esto se hizo a una distancia de 15 cm del mechero encendido, al igual que el trabajo siguiente.

c. Se impregnó un hisopo estéril con la cepa preparada, luego se procedió al sembrado en las placas Petri preparadas con sus hoyos. Se realizaron tres barridos por toda la superficie del Agar, para obtener una siembra uniforme. Las placas inoculadas con nuestra bacteria en estudio, con sus respectivas tapas, son colocadas en posición inversa y llevadas a la estufa, para una incubación de veinte minutos a 37°C, antes de la aplicación del extracto correspondiente.

d. Aplicación del método Doble ciego:

- La selección de las placas de Petri para cada aplicación fue al azar. Se vertió 50 microlitros (uL) de las concentraciones de 30 mg/ml, 60 mg/ml, 90 mg/ml, 120 mg/ml o en su equivalente porcentual de 3%, 6%, 9% y 12% respectivamente, del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* y también 50 uL de la concentración de oxacilina 200 mg/ml es decir al 20% y solución salina al 0.9%, utilizando una micropipeta con puntas esterilizadas en el autoclave en las 24 horas previas. Las placas de Petri fueron rotuladas con las denominaciones “BI, BII, BIII, BIV” y los grupos control con su respectiva denominación. Posteriormente las placas se invirtieron de posición y se incubaron en un

horno fabricante Precision modelo Thelco 6 a una temperatura de 37° C durante 24 horas. Este procedimiento fue realizado por personal técnico del área de Microbiología, ajeno al trabajo, para asegurar el método doble ciego.

- Lectura de resultados: Se realizó a las 24 horas posteriores. Utilizando una regla graduada sobre el reverso de la placa, anotando los datos bajo las denominación “BI, BII, BIII, BIV”; se midió cada diámetro de los halos de inhibición utilizando la unidad de medida “milímetro” (mm). Datos obtenidos fueron comparados y clasificados basándose en la escala de Duraffourd. Este procedimiento específicamente fue realizado por mi persona por motivos de desconocimiento del significado de cada denominación asignada.

10) Se halló la concentración mínima inhibitoria (CMI):

- Se preparó cinco tubos de ensayo para el microorganismo. Cuatro tubos uno por cada una de las concentraciones experimentales de 30 mg/ml, 60 mg/ml, 90 mg/ml, 120 mg/ml y el quinto tubo para el control positivo con oxacilina 200 mg/ml; en cada uno de los tubos se les añadió el volumen de 1.6 mL de todas las concentraciones mencionadas; luego se realizó la inoculación de 0.4 mL de la bacteria diluida en concentraciones semejantes al tubo 0.5 de la escala de Mcfarland. Se obtuvieron 2 mL por cada preparación, luego fueron incubados en estufa

a 37°C durante 24 horas. Todos los tubos fueron rotulados por personal técnico del área de Microbiología, quien se encargó del rotulado de las placas de Petri.

- Lectura de resultados: Hicimos uso del espectrofotómetro para cuantificar el nivel de turbidez, a través midiendo la absorbancia. La CMI es la muestra con menor nivel turbidez. Esta medición se realizó en el laboratorio de la Facultad de Industrias Alimentarias de la Universidad Privada Antenor Orrego, el cual fue supervisado por personal técnico encargado de dicha área.

11) Estadística:

Los resultados fueron entregados al estadístico bajo las denominación asignadas, no se le hizo mención el significado de cada denominación, para mantener el doble ciego y evitar un conflicto de interés; por ende las tablas y gráficos entregados por él mantienen las denominaciones utilizadas durante el trabajo.

2.8 Plan de análisis de datos

Los datos obtenidos en la lectura de resultados fueron ordenados en Excel 2013, los cuales fueron analizados con el programa SPSS versión 22. Para determinar el efecto antibacteriano se utilizaron los diámetros de los halos de inhibición a través de promedios correspondientes de cada concentración del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* y hallando sus medidas de dispersión, entonces se determinó su comparación mediante la prueba ANOVA de un diseño completamente al azar (aleatorio); posteriormente se hizo una prueba de comparaciones múltiples donde utilizamos la prueba DUNCAN, ambas pruebas con un nivel de significancia de $p < 0,05$. La CMI se analizó mediante la tabla de datos correspondientes y conclusiones de acuerdo ellos.

2.9 Aspectos éticos

El proyecto de investigación fue presentado para evaluación, consejos y aprobación por comité de Investigación y el comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la UPAO.

Se revisó la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, cumpliendo sus códigos, no comprometiendo ni poniendo en riesgo la vida de personas y el medio ambiente.(32).

III. RESULTADOS

Se realizaron 12 repeticiones por cada diferente concentración de 30 mg/ml, 60 mg/ml, 90 mg/ml, 120 mg/ml; por ende 12 medidas de halos de inhibición para cada concentración de extracto acuoso de semilla de *Moringa oleifera*. Cada concentración recibió una denominación para poder asegurar el doble ciego y evitar conflictos de interés las cuales fueron BI, BII, BIII y BIV.

A la lectura de los halos de inhibición de las placas inoculadas posterior a 24 horas de incubación, se obtuvo como promedios los valores de 17.42 mm para BI ; 20.17 mm, BII; 21.00 mm, BIII; 24.92 mm, BIV y el valor único de 35.00 mm para el control positivo con oxacilina; para el control negativo con suero fisiológico al 0.9% se obtuvo 0.0 mm del halo de inhibición, por lo que no se aprecia en las tablas estadísticas.

Los resultados obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico de varianza del cual se obtuvieron las siguientes tablas adjuntas, donde podemos interpretar:

En la Tabla N°1 se observan los promedios de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, siendo el mayor promedio el valor de 35.00 mm correspondiente al control positivo con oxacilina, seguido del promedio de 24.92 mm correspondiente a la

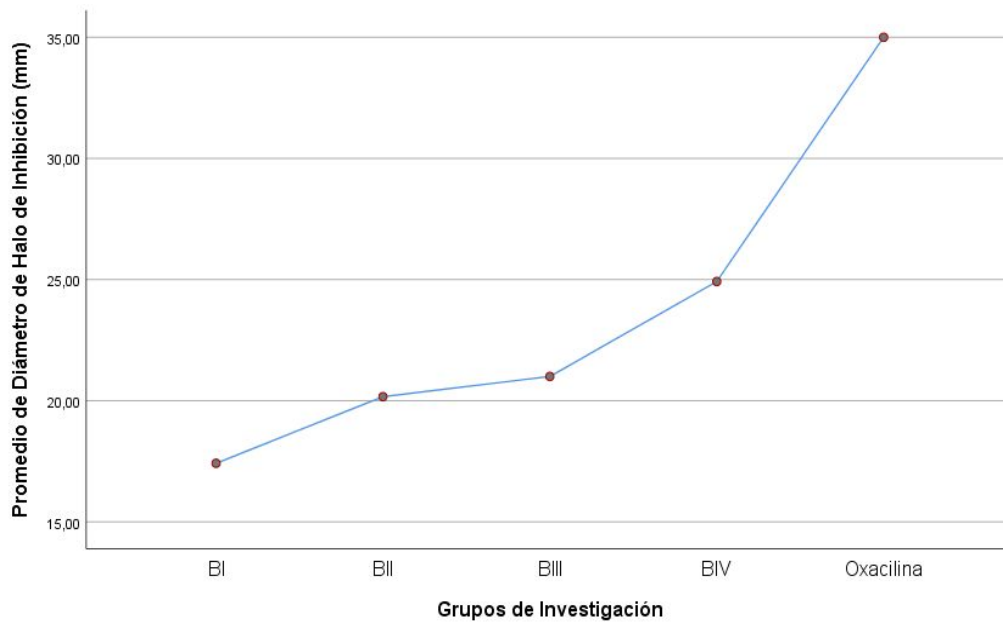
concentración denominada “B IV”, es decir la concentración de 120 mg/ml del extracto utilizado.

También se aprecian todos los promedios de los halos de inhibición, los cuales se encuentran dentro de los rangos de sensibilidad según la Escala de Duraffourd, donde BI y B II por sus valores 17.42 mm y 20.17 mm respectivamente, se encuentran en el rango de “Muy sensible (++): Diámetro 14 y 20 mm”. Las concentraciones de BIII y BIV obtuvieron 21.00 mm y 24.92 mm respectivamente, las cuales se encuentran dentro del rango “Sumamente sensible (+++): Diámetro superior a 20 mm”.

Tabla N°1: Descripción del efecto antibacteriano del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente comparado con oxacilina *in vitro*

Grupos de Investigación	de ni	Promedio	Desv. Est.
BI	12	17.42	1.16
BII	12	20.17	1.85
BIII	12	21.00	1.86
BIV	12	24.92	0.79
Oxacilina	1	35.00	0.00

Gráfico N°1: Promedios de los halos de inhibición de los grupos de investigación



En la Tabla N°2 según el análisis de varianza (ANOVA) muestra la existencia de una diferencia altamente significativa ($p < 0.001$) entre los promedios de los halos de inhibición de los diferentes “tratamientos” o concentraciones del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* aplicados.

Tabla N°2: Análisis de Varianza para determinar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente comparado con oxacilina *in vitro*

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>Gl</i>	<i>CM</i>	<i>Fo</i>	<i>P</i>
<i>Tratamientos</i>	2261.100	4	565.275	318.873	0.000
<i>Error</i>	97.500	55	1.773		
<i>Total</i>	2358.600	59			

En la Tabla N°3 según la prueba de Duncan observamos que hay una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre cada una de las diferentes concentraciones aplicadas, a excepción de las concentraciones denominadas BII y BIII donde no hay diferencia estadística significativa ($p > 0.05$).

También se puede analizar que la denominación "BIV" y la oxacilina a pesar de encontrarse ambas en la categoría de sumamente sensible (>20.00 mm) según la Escala de Duraffourd, mantienen una diferencia significativa ($p < 0.05$).

Tabla N°3: Prueba de DUNCAN

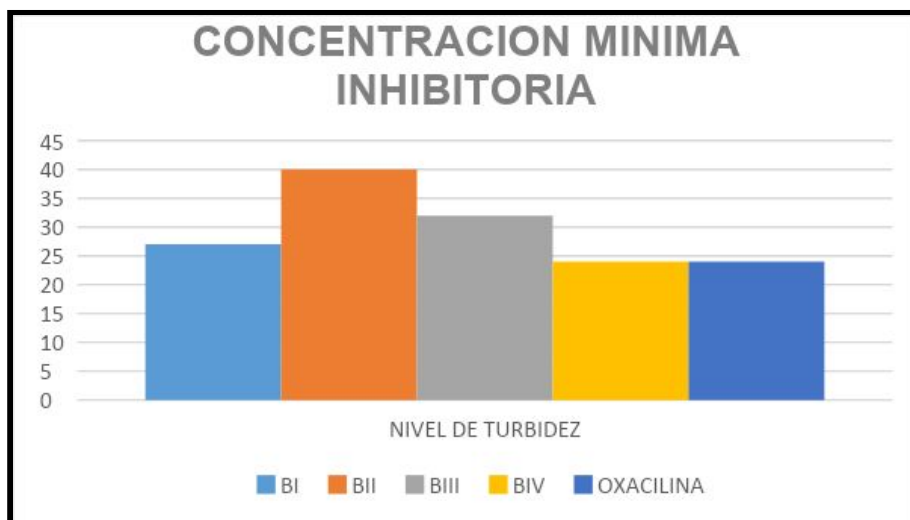
GRUPOS DE INVESTIGACIÓN	NI	GRUPOS PARA ALFA = 0.05			
		G1	G2	G3	G4
BI	12	17.42			
BII	12		20.17		
BIII	12		21.00		
BIV	12			24.92	
OXACILINA	1				35.00

En la Tabla N°4 se muestran los datos obtenidos de la lectura correspondiente de los tubos, se midió la absorbancia con la ayuda del espectrofotómetro para cuantificar el nivel de turbidez haciendo contraste con un control positivo, agua destilada con nivel de turbidez 0.000; considerándose como concentración mínima inhibitoria a la muestra con menor turbidez. En la tabla se observa que “BIV” coincidió con el mismo nivel de turbidez con nuestro control positivo. En figura 2 se expresa en números enteros por factibilidad del gráfico ($\times 10^{-3}$).

Tabla N°4: Concentración mínima inhibitoria: Nivel de turbidez

EXTRACTO ACUOSO	NIVEL DE TURBIDEZ
B I	0.027
B II	0.040
B III	0.032
B IV	0.024
CONTROL (+): OXACILINA	0.024

Gráfico N° 2: Concentración mínima inhibitoria: Nivel de turbidez ($\times 10^{-3}$)



- BI: 0.027
- BII: 0.040
- BIII: 0.032
- BIV: 0.024
- Oxa: 0.24

IV. DISCUSIÓN

El aumento de la multirresistencia antibiótica genera una gran problemática en nuestro entorno. Este incremento en su mayoría es debido a falencias en el uso dado por parte de la población, ésta carencia educativa nos sobreexpone y está provocando que nos veamos superados por las capacidades de defensa, adaptación y por ende supervivencia de los microorganismos patógenos, volviendo ineficaces a nuestros fármacos actuales. (1)(2)(3). Lo expuesto nos da razones y la obligación de enfatizar al máximo el desarrollo de mayores investigaciones en busca de alternativas para tratar de combatir, contrarrestar y controlar esta multirresistencia. Es de suma importancia educar y aplicar las estrategias dadas por la OMS. (4).

La medicina complementaria y alternativa abarca la fitoterapia, quien se encarga del estudio de las propiedades y aplicabilidad de plantas medicinales al servicio de la salud; siendo una alternativa considerable por la información existente que confirma sus actividades farmacológicas. (2)(11)(12)(13).

Nuestro estudio utilizó a la especie *Moringa oleifera* como planta para tratar de representar a la efectividad de la fitoterapia; la elección se basó por su creciente popularidad, la indagación y exposición de las exquisitas propiedades que contiene. Adicionalmente de sus propiedades, la *Moringa oleifera* es considerada una planta ecológica gracias a su disponibilidad eficaz en temas

socio-ambientales. Es una planta muy versátil, partiendo en la utilidad de cada una de sus partes hasta su capacidad de adaptación a diferentes terrenos y climas, incluso sobrevivir a épocas de sequía. (14)(15)(16)(17).

Diversas investigaciones señalan las propiedades de la semilla de *Moringa oleifera* que fueron identificados a través de estudios experimentales donde utilizaban diversos tipos de extractos, entre ellos: Extracto acuoso, etanólico y/o éter; los cuales pueden ser obtenidos de cualquier parte de la planta, como: Flor, semilla, hoja, raíz o su corteza. (22)(23)(24)(25)(26).

Nos enfocamos en resaltar la propiedad antimicrobiana de la especie en estudio. Se puede componer por: a. Actividad antibacteriana brindada por la presencia de isotiocianato de bencilo, taninos, saponinas, compuestos fenólicos, b. Actividad antiviral dada por isocianato y niaziminina, c. Actividad inhibitoria del crecimiento de larvas, *Anopheles gambides* y *Aedes aegypti*, debido a la presencia de B- aminina, B-sitosterol. (5)(10)(15)(16)(18)

Gustavo Viera et al obtuvieron como resultado, del enfrentamiento del extracto acuoso de semilla de *Moringa oleifera* en la concentración de 30 g/150 ml (20%) contra *S. aureus*, 25.00 mm como mayor valor promedio de halos de inhibición; en la muestra que se utilizaron mayor volumen de aplicación. Este trabajo se basó en la comparación de los diferentes volúmenes aplicados en

las placas de Petri.(14) Según sus resultados cuan mayor volumen se utilizó, mayor fue el diámetro de inhibición.

María Pérez et al compararon el efecto inhibitorio del extracto acuoso de la hoja contra la semilla de *Moringa oleifera*, utilizando como concentración 50 mg/ml, para ambas variables, sobre *S. aureus*; hallándose como promedios de los halos a los valores entre 3 y 5 mm, asegurando la existencia de efecto inhibitorio sobre el crecimiento de esta bacteria. Este estudio demuestra que las semillas tiene mayor efecto antibacteriano que la hoja de *Moringa oleifera*.

Peixoto JRO et al utilizaron la concentración de 20 mg/180 ml (11%) y compararon la aplicación de diferentes volúmenes: 100, 200, 300 y 400 uL. Donde su mayor promedio de halo de inhibición fue 25.4 mm, correspondiente de las placas de Petri a las que se le había aplicado mayor cantidad de microlitros (400 uL); incluso logró obtener un halo máximo de 38.0 mm.

Kiran Singh et al utilizaron el extracto acuoso de las hojas de *Moringa oleifera*, en las concentraciones de 30 mg/ml, 60 mg/ml, 90 mg/ml, 120 mg/ml contra *S. aureus*; donde el promedio de sus halos de inhibición fueron 3.67 mm, 4.33 mm, 6.67 mm, 7.00 mm respectivamente; como control positivo utilizaron cotrimoxazol donde se obtuvo 6.00 mm de diámetro. Demostrando la capacidad inhibitoria superior del extracto acuoso de las hojas de *Moringa*

oleifera frente un antibiótico tradicional como cotrimoxazol.

Las concentraciones de nuestro estudio fueron 30 mg/ml, 60 mg/ml, 90 mg/ml, 120 mg/ml; es decir 3%, 6%, 9%, 12% respectivamente. La elección de las concentraciones fue basada en trabajo de investigación de Kiran Singh et al que demostró efectividad antibacteriana con estos valores.

Donde nuestras menores concentraciones 30 mg/ml y 60 mg/ml (3% y 6%) del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera* obtuvieron 17.42 mm y 20.17 mm respectivamente, ubicándose según la Escala de Duraffourd en la clasificación de Muy sensible (++) y las concentraciones de 90 mg/ml y 120 mg/ml, Sumamente sensible (+++). El control positivo con 200 mg/ml oxacilina, es decir al 20%, se encuentra en la misma ubicación de "Sumamente sensible" por su halo de inhibición de 35.00 mm; se puede afirmar que existe similar efecto antibacteriano entre la concentración del extracto acuoso al 12% y el control con oxacilina al 20% por encontrarse en la misma clasificación según la Escala de Duraffourd. Sin embargo, estadísticamente existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre estas muestras.

A la vez podemos afirmar que estadísticamente existe una diferencia altamente significativa ($p < 0.001$) entre todos los tratamientos y/o concentraciones que hemos aplicado en el estudio, confirmándose la existencia del efecto antibacteriano; pero sobre todo se comprueba que la semilla de *Moringa*

oleifera tiene efecto antibacteriano sobre una bacteria con farmacorresistencia como lo es *S. aureus* meticilino resistente.

Como concentración mínima inhibitoria (CMI) se considera a la muestra con el menor nivel de turbidez. La concentración al 12% del extracto acuoso de semilla de *Moringa oleifera* y el control positivo con oxacilina al 20% obtuvieron 0.024 de absorbancia. Sabiendo teóricamente que a mayor absorbancia existe mayor nivel de turbidez; el resultado obtenido de 0.024 fue el menor valor de nuestro estudio, considerando a la concentración de extracto acuoso al 12% (120 mg/ml) y a la oxacilina al 20% (200 mg/ml) como CMI. Se podría afirmar que cierta concentración del extracto acuoso de semilla de *Moringa oleifera* tendría similar efecto inhibitorio que la oxacilina.

Cuantificando las concentraciones utilizadas es evidente que no se ha utilizado las máximas concentraciones en los extractos de *Moringa oleifera*, incluso menores al 50%. A pesar de lo mencionado el extracto acuoso ha tenido un efecto antibacteriano notorio, confirmando lo mencionado en los antecedentes, pero ahora siendo evaluado frente a una bacteria con meticilino resistencia; siendo objetivo de estudios posteriores para lograr su aplicabilidad. Se ha observado en las investigaciones que nos anteceden que ante un mayor volumen aplicado mayor efecto inhibitorio; se podría interpretar usando como ejemplo a nuestra realidad terapéutica como recibir un volumen adecuado para que haya una dosis efectiva.

A la comparación de los diversos estudios se logra identificar la variedad de factores que pueden influir en la obtención de resultados efectivos como la concentración mg/ml, porque se ha observado que a mayor concentración (mg/ml) mayor el diámetro del halo de inhibición. Adicionalmente existen otros factores influyentes como los diferentes de métodos de extracción, tipo de bacteria, volumen de aplicación, temperatura de incubación y tiempo de incubación. Variables que podrían controlarse y lograr establecer cierto protocolo logrando avanzar en este tipo de investigaciones y una posterior aplicación del espécimen de interés.

La *Moringa oleifera* sembrada en nuestra región ha tenido buen efecto antibacteriano ante una cepa con resistencia antibiótica. Su aplicación sería una alternativa de bajo costo y ecológica para nuestro medio.

V. CONCLUSIONES

1. Se determina sobre el extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera*, que a mayor concentración mayor efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* metilino resistente *in vitro*
2. La concentración mínima inhibitoria corresponde a la concentración de 120 mg/ml del extracto acuoso de semilla de *Moringa oleifera* y al control positivo, oxacilina.
3. Al comparar el efecto antibacteriano de la oxacilina y de la concentración 120 mg/ml del extracto acuoso de semilla de *Moringa oleifera* sobre *Staphylococcus aureus* metilino resistente *in vitro*, ambas variables son clasificadas según la Escala de Duraffourd, en la categoría de “Sumamente sensible (+++)”. Sin embargo estadísticamente existe diferencia significativa ($p < 0.05$) entre ellas.

VI. RECOMENDACIONES

- A. Poner a disposición este trabajo de investigación para futuras investigaciones como la realización de ensayos clínicos, necesarios para evaluar aplicabilidad de la especie *Moringa oleifera*.

- B. Evaluar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de semilla de *Moringa oleifera* en mayores concentraciones y hallar la Concentración mínima bactericida (CMB) y/o en combinación antibiótica evaluando la presencia de sinergismo.

- C. Promover más estudios experimentales para la creación de una base de datos y ser pioneros en la creación de alternativas terapéuticas con base científica.

- D. Realizar el estudio de la marcha fitoquímica del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera*.

VII. LIMITACIONES:

- No se pudo realizar el estudio de la marcha fitoquímica del extracto acuoso de la semilla de *Moringa oleifera*.

VIII. BIBLIOGRAFÍA:

1. Valdés MÁS. La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. :18.
2. Rahman MM, Sheikh MMI, Sharmin SA, Islam MS, Rahman MA, Rahman MM, et al. Antibacterial Activity of Leaf Juice and Extracts of Moringa oleifera Lam. against Some Human Pathogenic Bacteria. :10.
3. Vinoth B, Manivasagaperumal R, Balamurugan S. PHYTOCHEMICAL ANALYSIS AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MORINGA OLEIFERA LAM. :5.
4. Rocha C, Reynolds ND, Simons MP. Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2 de abril de 2015;32(1):139.
5. Pérez M, Cabrera L, Colina G. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE EXTRACTOS ACUOSO DE Moringa oleifera SOBRE ESPECIES PATÓGENAS INTRAHOSPITALARIAS. REDIELUZ [Internet]. 16 de noviembre de 2016 [citado 10 de agosto de 2018];5(1y2). Disponible en: <http://produccioncientificaluz.org/index.php/redieluz/article/view/21691>
6. CARRIÓN JLC. EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE ALCALOIDES, FLAVONOIDES, TANINOS Y ACEITES ESENCIALES EN TRES ESTADOS DE MADURACIÓN Y RECOLECCIÓN DE LA MORINGA (MORINGA OLEÍFERA). :73.
7. Moringa oleifera: Revisión sobre aplicaciones y usos en alimentos [Internet]. [citado 18 de noviembre de 2018]. Disponible en: <http://www.alanrevista.org/ediciones/2017/2/art-3/>
8. Cercenado E. Procedimientos en Microbiología Clínica. :27.
9. f2bbs d80-cb68-0130-27bb-263316c03650.pdf [Internet]. [citado 12 de noviembre de 2018]. Disponible en: <http://public-files.prbb.org/publicaciones/f2bbad80-cb68-0130-27bb-263316c03650.pdf>
10. Llajaruna G, Pilar S del. Efecto antibacteriano In Vitro del aceite esencial de pelargonium hortorum sobre la cepas de pseudomonas aeruginosa atcc 27853 y staphylococcus aureus atcc 25923. Universidad Privada Antenor Orrego - UPAO [Internet]. 2015 [citado 21 de noviembre de 2018]; Disponible en: <http://repositorio.upao.edu.pe/handle/upaorep/1309>
11. Cañigüeral S, Dellacassa E, Bandoni AL. Plantas Medicinales y Fitoterapia: ¿Indicadores de Dependencia o Factores de Desarrollo? acta farmacéutica bonaerense. 2003;22:14.
12. HERNÁNDEZ JAC. CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA, ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE PLANTAS

MEDICINALES UTILIZADAS EN PEREIRA Y SANTA ROSA DE CABAL (RISARALDA). 2011;75.

13. CC_13_08.pdf [Internet]. [citado 23 de noviembre de 2018]. Disponible en: https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/4816/1/CC_13_08.pdf
14. Viera GHF, Mourão JA, Ângelo ÂM, Costa RA, Vieira RHS dos F. Antibacterial effect (in vitro) of *Moringa oleifera* and *Annona muricata* against Gram positive and Gram negative bacteria. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. junio de 2010;52(3):129-32.
15. Martín C, Martín G, García A, Fernández T, Hernández E, Puls J. Potenciales aplicaciones de *Moringa oleifera*. Una revisión crítica. *Pastos y Forrajes*. junio de 2013;36(2):137-49.
16. Brilhante RSN, Sales JA, Pereira VS, Castelo-Branco D de SCM, Cordeiro R de A, de Souza Sampaio CM, et al. Research advances on the multiple uses of *Moringa oleifera*: A sustainable alternative for socially neglected population. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 1 de julio de 2017;10(7):621-30.
17. (9) (PDF) Antibacterial Properties of Leaf Extracts of *Moringa oleifera* Lam. Growing in Sudan [Internet]. ResearchGate. [citado 22 de noviembre de 2018]. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/283270241_Antibacterial_Properties_of_Leaf_Extracts_of_Moringa_oleifera_Lam_Growing_in_Sudan
18. Instituto Politécnico Nacional, Velázquez-Zavala M, Peón-Escalante IE, Instituto Politécnico Nacional, Zepeda-Bautista R, Instituto Politécnico Nacional, et al. *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.): usos potenciales en la agricultura, industria y medicina. *Revista Chapingo Serie Horticultura*. 2016;XXII(2):95-116.
19. Al_husnan LA, Alkahtani MDF. Impact of *Moringa* aqueous extract on pathogenic bacteria and fungi in vitro. *Annals of Agricultural Sciences*. 1 de diciembre de 2016;61(2):247-50.
20. tesis 416.pdf [Internet]. [citado 8 de agosto de 2018]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8448/tesis416.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
21. 1888-1890.pdf [Internet]. [citado 23 de noviembre de 2018]. Disponible en: <http://www.docsdrive.com/pdfs/ansinet/pjbs/2003/1888-1890.pdf>
22. FRANCO-OSPINA LA, MATIZ-MELO GE, PÁJARO-BOLÍVAR IB, GÓMEZ-ESTRADA HA. Actividad Antibacteriana in vitro de Extractos y Fracciones de *Physalis peruviana* L. y *Caesalpinia pulcherrima* (L.) Swartz. :8.
23. Peña P, Pitágoras T. Efectividad antibacteriana «in vitro» del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) sobre flora salival. Repositorio de Tesis - UNMSM [Internet]. 2013 [citado 20 de noviembre de 2018]; Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/3092>
24. MARCA HMP. EVALUACIÓN DE LA ESTABILIDAD FÍSICOQUÍMICA Y MICROBIOLÓGICA DE UN EXTRACTO ACUOSO DE MORINGA (*Moringa*

oleífera Lam), COSECHADA EN LA FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DE MACHALA. :71.

25. Rojas C, Rodrigo L. Eficacia antibacteriana in vitro del gel natural de Aloe Barbadensis, Clorhexidina e hidróxido de Calcio sobre enterococcus faecalis ATCC 29212. Universidad Privada Antenor Orrego - UPAO [Internet]. 29 de septiembre de 2016 [citado 20 de noviembre de 2018]; Disponible en: <http://repositorio.upao.edu.pe/handle/upaorep/1879>
26. Singh K, Tafida GM. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF MORINGA OLEIFERA (LAM) LEAVES EXTRACTS AGAINST SOME SELECTED BACTERIA. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2014;6(9):52-4.
27. Peixoto JRO, Silva GC, Costa RA, de Sousa Fontenelle JRL, Vieira GHF, Filho AAF, et al. In vitro antibacterial effect of aqueous and ethanolic Moringa leaf extracts. Asian Pac J Trop Med. marzo de 2011;4(3):201-4.
28. cultivos potenciales zonas altoandinas.pdf [Internet]. [citado 20 de noviembre de 2018]. Disponible en: http://www.psi.gob.pe/wp-content/uploads/2016/03/cultivos_potenciales_zonas_altoandinas.pdf
29. Estudios experimentales en la práctica clínica Investigación terapéutica. Ensayos clínicos. [Internet]. [citado 26 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://www.fisterra.com/mbe/investiga/7ensayos/7ensayos.asp#Consideraciones>
30. Determinación del tamaño muestral [Internet]. [citado 26 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://www.fisterra.com/mbe/investiga/9muestras/9muestras2.asp>
31. Biblioteca U. Biblio Guías: Citas y elaboración de bibliografía: el plagio y el uso ético de la información: Estilo Vancouver [Internet]. [citado 26 de noviembre de 2018]. Disponible en: https://biblioguias.uam.es/citar/estilo_vancouver
32. WMA - The World Medical Association-Declaración de Helsinki de la AMM – Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos [Internet]. [citado 27 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://www.wma.net/es/policias-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>

IX. ANEXOS

ANEXO 1:

Solicitud de permiso del coordinador del Laboratorio de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de medicina de la Universidad Privada Antenor Orrego

**SOLICITO PERMISO PARA USO
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN
MULTIDISCIPLINARIA**

DR. GONZALES CABEZA, JOSÉ

Coordinador del Laboratorio de Investigación Multidisciplinaria de la Universidad Privada Antenor Orrego

Yo, DANELLI ALCANTARA NORIEGA, identificado con DNI: 71914238; alumna de la Escuela de Medicina Humana de la Universidad Privada Antenor Orrego, con el debido respeto me presento y expongo:

Que a fin de aplicar mi proyecto de tesis titulada: **“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA SEMILLA DE *Moringa oleifera* (MORINGACEAE) “MORINGA” SOBRE *Staphylococcus aureus* METICILINO RESISTENTE COMPARADO CON OXACILINA IN VITRO”** se me otorgue el permiso para el uso adecuado del laboratorio de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Privada Antenor Orrego; por contar con el debido equipamiento y la infraestructura conveniente para la ejecución del proyecto mencionado anteriormente.

Por lo expuesto es justicia que espero alcanzar.

Trujillo, 05 de Enero del 2020

Dr. Gonzales Cabeza, José
Coordinador del Área de Laboratorios de Investigación

Danelli Alcántara Noriega
Estudiante de Medicina

ANEXO 2:

Solicitud de permiso de la coordinadora del área de microbiología de la Facultad de medicina de la Universidad Nacional de Trujillo

**SOLICITO PERMISO PARA
USO DEL LABORATORIO
DE MICROBIOLOGÍA**

Dra.

ELVA MANUELA MEJÍA DELGADO

**Coordinadora del Área de Microbiología de la Facultad de Medicina de la
Universidad Nacional de Trujillo**

Yo, DANELLI CRISTINA ALCÁNTARA NORIEGA, identificado con DNI: 71914238; alumno de la Escuela de Medicina Humana de la Universidad Privada Antenor Orrego, con el debido respeto me presento y expongo:

Que a fin de aplicar mi proyecto de tesis titulada: **“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ACUOSO DE LA SEMILLA DE *Moringa oleifera* (MORINGACEAE) “MORINGA” SOBRE *Staphylococcus aureus* METICILINO RESISTENTE COMPARADO CON OXACILINA *IN VITRO*”** se me otorgue el permiso para el uso adecuado del laboratorio de microbiología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Nacional de Trujillo; por contar con el debido equipamiento y la infraestructura conveniente para la ejecución del proyecto mencionado anteriormente.

Por lo expuesto es justicia que espero alcanzar.

Trujillo, 10 de Enero del 2020

Dra. ELVA M. MEJÍA DELGADO
Coordinadora del Área de microbiología

DANELLI ALCANTARA NORIEGA
Estudiante de Medicina Humana

ANEXO 3: FICHA N°01 DE RECOLECCIÓN DE DATOS

ZONA DE INHIBICIÓN (mm)						
N°	Extracto acuoso de semilla de <i>Moringa oleifera</i> (mg/ml)				Oxacilina (Control positivo)	Solución salina (Control negativo)
	BI: 30	BII: 60	BIII: 90	BIV: 120		
1	15	19	20	26		
2	18	19	20	25		
3	17	19	17	25		
4	17	22	22	26		
5	16	22	21	25		
6	17	21	22	26		
7	19	22	22	24		
8	17	22	23	24		
9	18	18	23	24		
10	19	19	23	24		
11	18	22	20	25		
12	18	17	19	25	35.00 mm	0 mm
Promedio (mm)	17.42	20.17	21.00	24.92	35.00 mm	0 mm

Fuente: International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, vol 6, Issue 9, 2014

Escala de Duraffourd:

- 1) Diámetro de inhibición: Nula (-): Diámetro inferior a 8 mm.
- 2) Sensibilidad límite (sensible +): Diámetro 8 a 14 mm.
- 3) Medio (muy sensible ++): Diámetro entre 14 y 20 mm.
- 4) Sumamente sensible (+++): Diámetro superior a 20 mm.

Concentración mínima inhibitoria						
N°	Extracto acuoso de semilla de <i>Moringa oleifera</i> (mg/ml)				Oxacilina (Control positivo)	Solución salina (Control negativo)
	BI: 30	BII: 60	BIII: 90	BIV:120		
1	0.027	0.040	0.032	0.024	0.024	

Fuente: International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, vol 6, Issue 9, 2014

Concentración Mínima Inhibitoria:

- Muestra con menor valor de turbidez.

ANEXO 5:

FOTOS DE RECOLECCION DE MATERIAL DE MUESTRA, MÉTODO DE OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO DE SEMILLAS DE *Moringa oleifera*



Figura N°1: Planta *Moringa oleifera*



Figura N°2: Recolección de muestra



Figura N°3: Huerto familiar, Las Lomas II, distrito Huanchaco



Figura N°4: Vainas maduras de *Moringa oleifera*



Figura N°5: Vainas maduras y semillas de *Moringa oleifera*



Figura N°6: Identificación taxonómica en el Herbarium Truxillense (HUT)

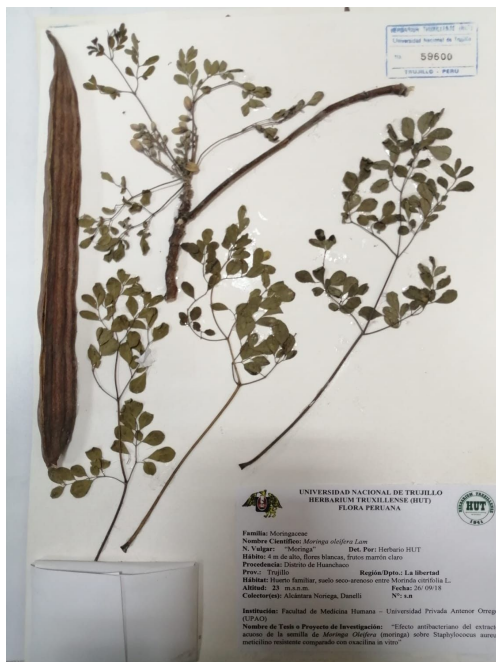


Figura N°7 y 8: Identificación taxonómica de *Moringa oleifera* por Herbarium Truxillense (Dos muestras)



Figura N°9: Tarjeta de identificación Taxonómica de Herbarium Truxillense (HUT)



Figura N°10: Semillas de *Moringa oleifera* previo secado en estufa



Figura N°11: Semillas de *Moringa oleifera* en estufa con corriente de aire a 40°C



Figura N°13: Semillas de *Moringa oleifera* posterior ha secado de 48h a 40°C



Figura N°12: Medición de peso seco de semillas de *Moringa oleifera*



Figura N°13 y 14: Autor de estudio moliendo semillas de *Moringa oleifera*, en el laboratorio de Farmacognosia de la Universidad Nacional de Trujillo



Figura N°15: Muestra de semillas de *Moringa oleifera* en polvo previa tamizaje



Figura N°16 y N°17: Muestra en proceso de tamizado y total de la muestra tamizada



Figura N°18 y N°19: Equipo de reflujo con muestra de las semillas de *Moringa oleifera*



Figura N°20: Muestra obtenida luego de método de extracción de Reflujo por dos horas



Figura N°21 y N°22: Equipo de filtración al vacío y muestra por método de reflujó



Figura N°23: Aplicación de filtración al vacío

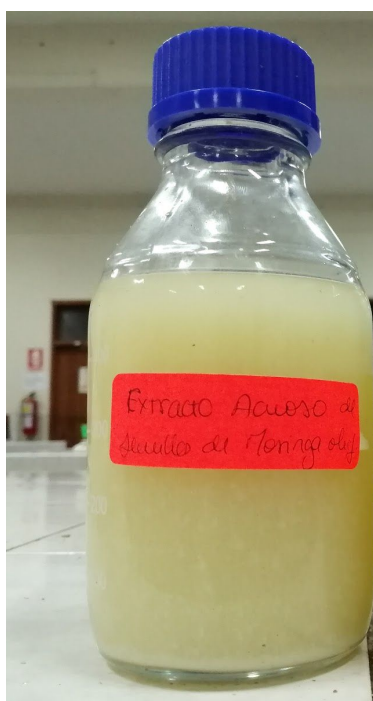


Figura N°24: Extracto acuoso de semillas de *Moringa oleifera*



Figura N°25: Equipo de rotavapor

ANEXO 6: FOTOS DE EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO POR MÉTODO DE KIRBY-BAUER Y LECTURA CON ESPECTROFOTÓMETRO PARA HALLAR CMI



Figura N°26: Extractos acuosos de semillas de *Moringa oleifera* en sus cuatro concentraciones

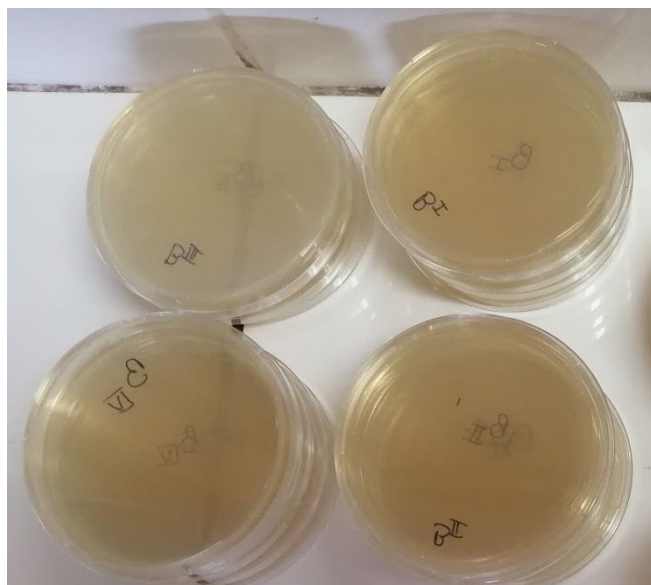


Figura N°27: Placas de Petri con Agar Muller- Hinton rotuladas con sus denominaciones

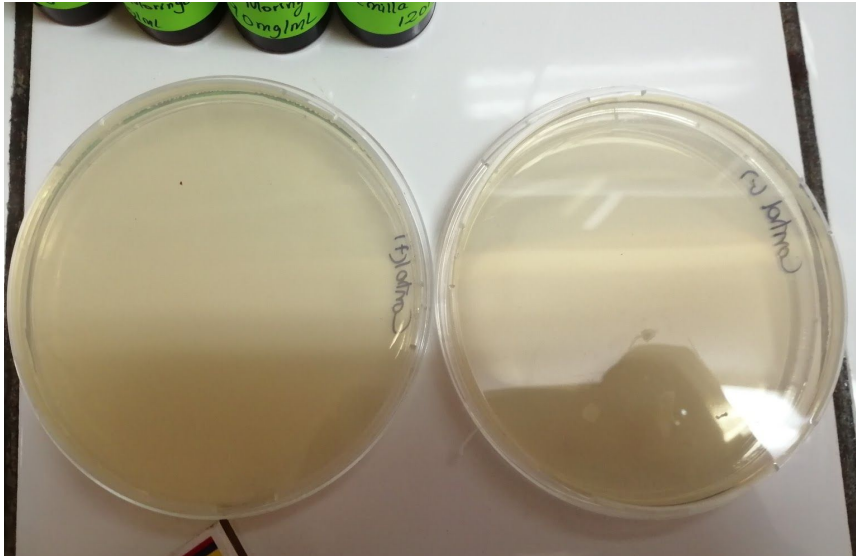


Figura N°28: Placas de Petri con Agar Muller-Hinton controles



Figura N°29: Bacteria *Staphylococcus aureus* meticilino resistente diluida en solución salina, para conseguir concentración semejante al tubo 0.5 de la Escala de MacFarland



Figura N°30: Realización de hoyos con sacabocado esterilizado en autoclave.



Figura N°30: Sembrado de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, a través de un hisopo estéril

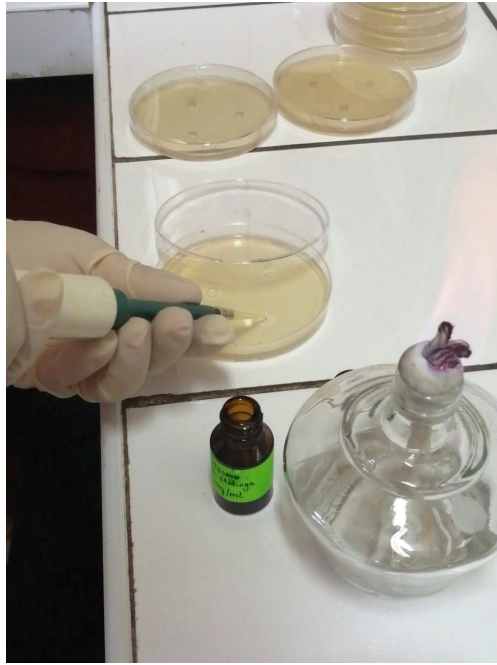


Figura N°31: Aplicación de 50 uL del extracto acuoso de la semilla de *M. oleifera* con la ayuda de una micropipeta estandarizada



Figura N°31: Preparación de los tubos de ensayos para hallar CMI



Figura N°32: Presentación de oxacilina utilizada



Figura N°33: Tubos de ensayos rotulados, previa incubación



Figura N°34: Tubos de ensayo posterior incubación de 24 horas a 37°C



Figura N°35: Tubos de ensayo posterior incubación de 24 horas a 37°C y se aprecia en la esquina derecha el tubo de ensayo control positivo con oxacilina

**ANEXO 7:
LECTURA DE RESULTADOS POSTERIOR A INCUBACIÓN POR 24 HORAS
A LA TEMPERATURA DE 37°C**

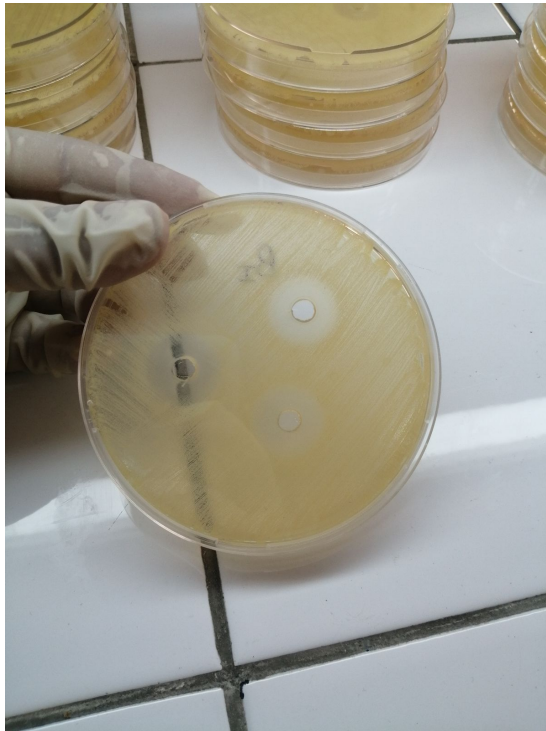


Figura N°36: Foto de una de las placas de Petri con sus halos de inhibición obtenidos de la aplicación de la concentración 30 mg/ml “BI”

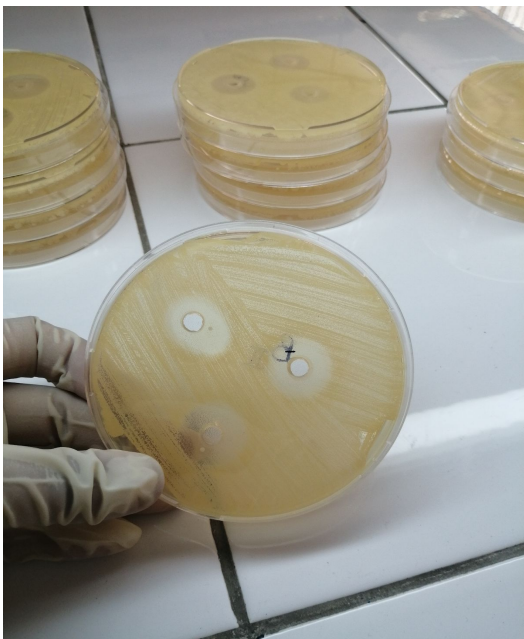


Figura N°37 y N°38: Fotos de algunas placas de Petri obtenidas de la aplicación de la concentración 60 mg/ml “BII”

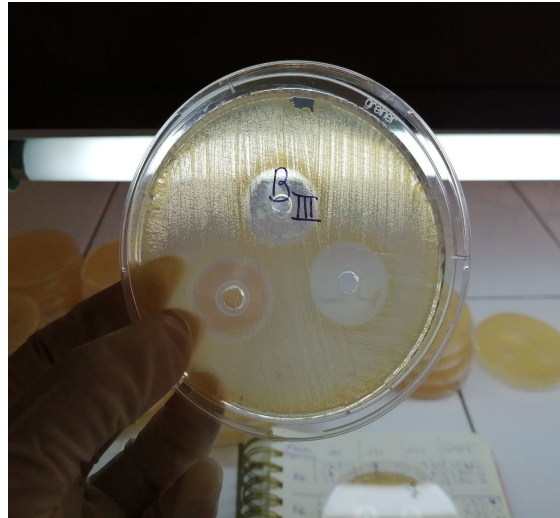
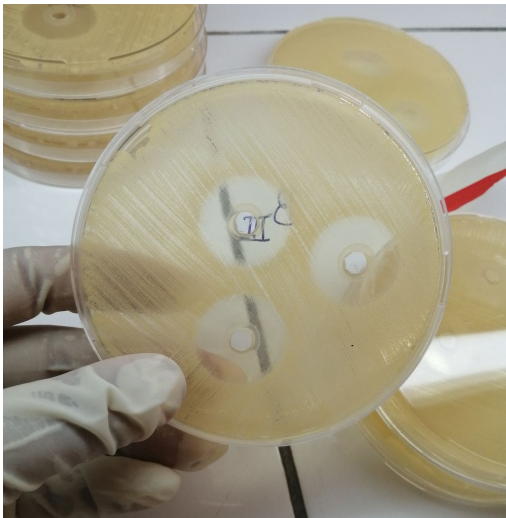


Figura N°39 y N°40: Fotos de algunas placas de Petri obtenidas de la aplicación de la concentración 90 mg/ml “BIII”

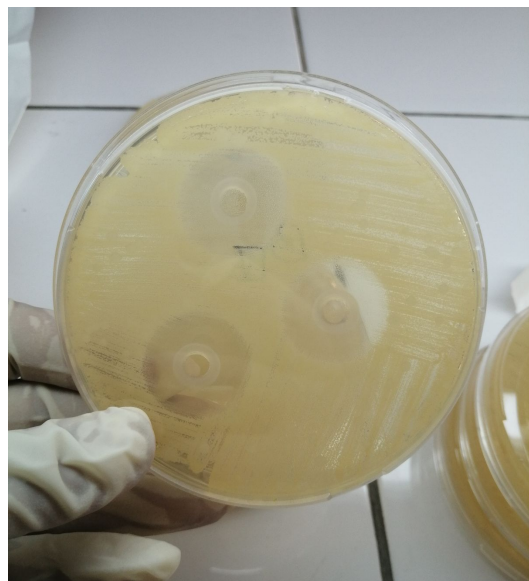


Figura N°41 y N°42: Fotos de algunas placas de Petri obtenidas de la aplicación de la concentración 120 mg/ml “BIV”



Figura N°43: Fotos placa de Petri obtenidas de la aplicación de 50 uL de suero fisiológica 0.9% “control negativo”



Figura N°44: Fotos de placa de Petri obtenida de la aplicación de 50 uL de oxacilina a 200 mg/ml “control positivo”



Figura N°45: Espectrofotómetro y tubos de ensayos con muestras obtenidas luego de la incubación de 24 horas. Previa lectura de nivel de turbidez para determinar CMI.

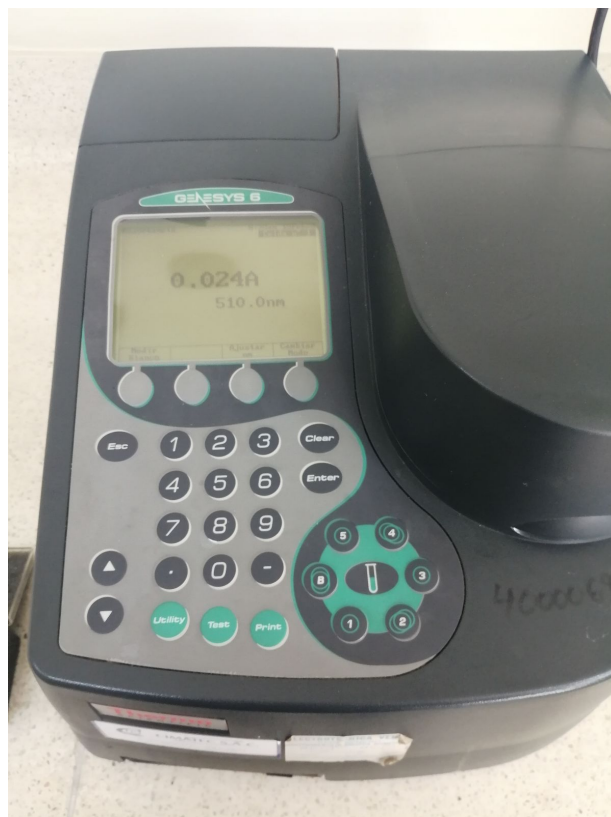


Figura N°46: Resultado obtenido tras lectura del tubo de ensayo correspondiente a la concentración 120 mg/ml “BIV”



Figura N°47: Lectura de resultados con regla graduada utilizando la medida de milímetros “mm”