

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**



**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO*  
DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE LAS HOJAS Y FLORES  
DE *SATUREJA PULCHELLA* (PANISARA) EN CEPAS DE  
*STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *STAPHYLOCOCCUS*  
*EPIDERMIDIS*”**

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

**TESISTAS**

**BACH. MISHIEL ROCIO CHIPA AVILA**

**BACH. CATHERIN RUIZ ALVARADO**

**ASESORA**

**Dra. Q.F NANCY CHÁVEZ VELÁSQUEZ**

**Lima – Perú**

**2017**

## **DEDICATORIAS**

A Dios por darme la vida, salud y acompañarme en los momentos que más lo necesitaba, por darme la fortaleza de seguir adelante y lograr mis objetivos.

A mi madre Amelia Avila Rosales, desde niña tú me enseñaste a no rendirme por más que fueran tiempos difíciles, las dos juntas hemos salido de abajo, me enseñaste y criaste a base de valores y ser responsable, me diste el amor, cariño y sobre todo siempre creíste en mí cuando nadie más apostaba por mí, mi carrera profesional te lo debo a ti, eres el tesoro máspreciado de mi vida te amo mamita.

**Mishel Rocio**

La vida se encuentra plagada de retos, y uno de ellos es la universidad. Tras verme dentro de ella me he dado cuenta que más allá de ser un reto es una base nos sola para mi entendimiento del campo en el que me visto inmersa, sino para lo que concierne a la vida y mi futuro.

Le agradezco a mis padres, hermanos y en especialmente a mi hija por brindarme su apoyo y sus consejos para hacer de mí una mejor persona.

A Mishel (amiga), el tiempo sigue pasando, y ahí estas, cerca de mí, gracias por tu apoyo y por mantener viva la amistad entre nosotros.

**Catherin Ruiz**

## **AGRADECIMIENTO**

A la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, por formarme profesionalmente y también como persona; así mismo a todos los docentes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica que durante mi vida estudiantil supieron entregarme sus sabios conocimientos.

A nuestro asesora de Tesis Dra. Nancy Chávez Velásquez, por su valioso apoyo, orientación y por compartir su experiencia para desarrollar y culminar el presente trabajo.

Al Dr. Q.F. Erik Olivar Gallegos, por su apoyo, consejos, paciencia y sobre todo la orientación que permitieron la realización del presente trabajo.

**Mishel Rocio y Catherin Ronne**

# ÍNDICE

Dedicatorias	
Agradecimiento	
Índice de cuadros	
Índice de figuras	
Índice de fotografías	
Índice de anexos	
Resumen	
Abstract	
	Página
Introducción .....	16
<b>CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>18</b>
1.1. Descripción de la realidad problemática .....	18
1.2. Identificación y formulación del problema .....	19
1.2.1. Problema general .....	19
1.2.2. Problemas específicos .....	19
1.3. Objetivos de la investigación .....	20
1.3.1. Objetivo general .....	20
1.3.2. Objetivos específicos .....	20
1.4. Justificación de la investigación .....	21
1.5. Limitaciones de la investigación .....	22
 <b>CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO .....</b>	 <b>23</b>
2.1. Antecedentes de la investigación .....	23
2.1.1. Antecedentes nacionales .....	23
2.1.2. Antecedentes internacionales.....	27
2.2. Bases legales .....	30
2.2.1. Normas nacionales.....	30
2.2.2. Normas internacionales.....	30
2.3. Bases teóricas .....	32
2.3.1. Bases teóricas de la variable “Extracto hidroalcohólico de la	

hojas y flores de <i>Satureja pulchella</i> “Panisara” .....	32
2.3.2. Bases teóricas de la variable “Actividad Antimicrobiana en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i> ” .....	43
2.4. Formulación de la hipótesis .....	46
2.4.1. Hipótesis general.....	46
2.4.2. Hipótesis específicas.....	46
2.5. Operacionalización de variables e indicadores .....	47
2.6. Definición de términos básicos .....	48
<b>CAPÍTULO III. METODOLOGÍA.....</b>	<b>50</b>
3.1. Tipo y nivel de la investigación .....	51
3.2. Diseño de la investigación .....	51
3.3. Población y muestra .....	51
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos .....	51
3.4.1. Descripción de instrumentos .....	51
3.4.2. Validación de instrumentos .....	52
3.4.3. Técnicas de procesamiento y análisis de datos .....	52
3.5. Materiales, equipos y reactivos.....	52
3.5.1. Material biológico.....	53
3.5.2. Material de vidrio y otros.....	53
3.5.3. Equipos e instrumentos.....	53
3.5.4. Reactivos.....	54
<b>CAPÍTULO IV. PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS</b>	
4.1. Procedimiento experimental de la variable “Extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de <i>Satureja pulchella</i> “Panisara”. .....	55
4.2. Procedimiento experimental de la variable “Actividad Antimicrobiana en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i> ” ...	58
4.3. Prueba de hipótesis .....	73
4.4. Discusión de resultados.....	73

<b>CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>78</b>
5.1. Conclusiones.....	78
5.2. Recomendaciones.....	78
 <b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	 <b>79</b>
 <b>ANEXOS .....</b>	 <b>82</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
<b>TABLA 1.</b>	Diseño de la bandeja de microdilución. 62
<b>TABLA 2.</b>	Diseño de la bandeja de microdilución para la recuperación bacteriana. 64
<b>TABLA 3.</b>	Resultados de la CMI de las 17 diferentes concentraciones contra los niveles de Inóculos de la cepa <i>Staphylococcus epidermidis</i> . 65
<b>TABLA 4.</b>	Resultados de la CMI de las 17 diferentes concentraciones contra los niveles de Inóculos de la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> . 67
<b>TABLA 5.</b>	Los resultados cuantitativos obtenidos de la siembra del contenido de los pocillos de prueba con la cepa <i>Staphylococcus epidermidis</i> . 71
<b>TABLA 6.</b>	Los resultados cuantitativos obtenidos de la siembra del contenido de los pocillos de prueba con la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> . 72

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b>	<i>Satureja pulchella</i> .	32
<b>FIGURA 2.</b>	Formación de los metabolitos secundarios	35
<b>FIGURA 3.</b>	Formación de la ruta del ácido mevalónico	37
<b>FIGURA 4.</b>	Formación de la ruta de síntesis de compuestos fenólicos.	39
<b>FIGURA 5.</b>	Características macroscópicas y microscópicas de <i>Staphylococcus aureus</i> .	44
<b>FIGURA 6.</b>	Características macroscópicas y microscópicas de <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	46
<b>FIGURA 7.</b>	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los 17 extractos hidroalcohólico por el método de microdilución contra <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	66
<b>FIGURA 8.</b>	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los 17 extractos hidroalcohólico por el método de microdilución contra <i>Staphylococcus epidermidis</i> . Se observa en la imagen a la derecha el pocillo del inóculo de Nivel IV sin turbidez por lo que se determina el MIC igual a 16384 ug/mL.	66
<b>FIGURA 9.</b>	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los 17 extractos hidroalcohólico por el método de microdilución contra <i>Staphylococcus aureus</i> .	68
<b>FIGURA 10.</b>	Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los 17 extractos hidroalcohólico por el método de microdilución contra <i>Staphylococcus aureus</i> . Se observa en la imagen a la derecha los pocillos de los inóculos de	68



Nivel II, II y IV sin turbidez por lo que se determina el MIC igual a 16384 ug/mL.

**FIGURA 11.** A la izquierda se observa los pocillos de prueba con una ligera turbidez que evidencia un resultado positivo cualitativo en el crecimiento de todos los niveles de los Inóculos de las cepas tanto de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. A la derecha los resultados cuantitativos del subcultivo del contenido del pocillo.

70

## ÍNDICE DE GRAFICAS

<b>GRAFICA 1.</b>	Determinación del MIC de los extractos hidroalcohólicos de las hojas y flores de <i>Satureja pulchella</i> contra <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	67
<b>GRAFICA 2.</b>	Determinación del MIC de los extractos hidroalcohólicos de las hojas y flores de <i>Satureja pulchella</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> .	69
<b>GRAFICA 3.</b>	Producción bacteriana por el método de recuperación por contaminación con la cepa <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	71
<b>GRAFICA 4.</b>	Producción bacteriana por el método de recuperación por contaminación con la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> .	72

## ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

<b>FOTOGRAFÍA 1.</b>	Indumentaria adecuada donde se procederá con análisis respectivos: Guardapolvo, gorra, mascarilla y guantes.	93
<b>FOTOGRAFÍA 2.</b>	Se seleccionó las hojas y flores secas de <i>Satureja pulchella</i> (Panisara) y aquellas que estén en buenas condiciones se procedió a pesar para iniciar con la extracción hidroalcohólica.	94
<b>FOTOGRAFÍA 3.</b>	Extracción hidroalcohólica de las hojas y flores de la <i>Satureja pulchella</i> (Panisara), preparación de etanol puro 96° y agua en una proporción (70:30).	94
<b>FOTOGRAFÍA 4.</b>	Al finalizar el periodo de maceración, se filtró en papel whatman N°40 para evitar que tengamos residuos de la planta.	94
<b>FOTOGRAFÍA 5.</b>	Se procede a realizar el Screening fitoquímico.	95
<b>FOTOGRAFÍA 6.</b>	Cepas de referencia reactivados. Izquierda <i>Staphylococcus aureus</i> y a la derecha <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	96
<b>FOTOGRAFÍA 7.</b>	A partir del extracto hidroalcohólico de la muestra a prueba se preparó 17 concentraciones diferentes.	96
<b>FOTOGRAFÍA 8.</b>	A la izquierda, el antibiótico estándar de eritromicina y a la derecha, la solución de eritromicina a la concentración de 4 µg/MI.	97
<b>FOTOGRAFÍA 9.</b>	A la izquierda la solución patrón de turbidez McFARLAND 0.5 y a la derecha el proceso de ajuste para la preparación del inóculo de cepas prueba.	97
<b>FOTOGRAFÍA 10.</b>	Reactivación de la cepa de referencia cuantitativa de <i>Staphylococcus aureus</i> .	97

<b>FOTOGRAFÍA 11.</b>	Reactivando las cepas, se utilizó los pellets liofilizados de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	98
<b>FOTOGRAFÍA 12.</b>	Desarrollo del proceso de preparación e inoculación del extracto de la muestra a evaluar versus los niveles de concentración de las cepas a prueba.	99
<b>FOTOGRAFÍA 13.</b>	Ejecución del Método de Microdilución en microplacas. Se inocula las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico en los pocillos de las microplacas de 96. Manteniendo siempre el cuidado debido.	99

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO 1.</b>	Matriz de Consistencia	83
<b>ANEXO 2.</b>	Carta de autorización	84
<b>ANEXO 3.</b>	Certificación botánica de la planta " <i>Satureja pulchella</i> "	85
<b>ANEXO 4.</b>	Informe de ensayo	86
<b>ANEXO 5.</b>	Certificado de análisis del <i>Staphylococcus aureus</i>	87
<b>ANEXO 6.</b>	Certificado de análisis del <i>Staphylococcus epidermidis</i>	89
<b>ANEXO 7.</b>	Cronograma del programa experimental	90
<b>ANEXO 8.</b>	Cronograma del proceso experimental	91
<b>ANEXO 9.</b>	Testimonios fotográficos	93

## RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Reconocer los metabolitos secundarios responsables del efecto antimicrobiano. **Métodos:** Screening fitoquímico o Tamizaje fitoquímico, método de microdilución y el método de recuperación por contaminación directa. **Resultados:** Los metabolitos secundarios hallados con mayor frecuencia en el extracto hidroalcohólico de la *Satureja pulchella* (Panisara), se determinó mediante el Screening fitoquímico y se comprobó de forma cualitativa; se detectaron: alcaloides, flavonoides y compuestos fenólicos. Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) fueron determinadas mediante observación de la concentración más baja del agente (17 concentraciones diferentes del extracto hidroalcohólico) que inhibió el crecimiento visible de la bacteria dentro de los pocillos inoculado de la microplaca. La producción bacteriana por el método de recuperación por contaminación directa, la lectura de la producción bacteriana se estimó por el conteo de colonias en el cultivo de placas sembradas. Esto se verifica sembrando el inóculo el cual si hay una evidente reducción logarítmica significativa con respecto a la concentración inicial de la cepa de prueba. **Conclusiones:** Mediante el método de microdilución se determinó que en las 17 concentraciones del extracto investigado, solo la concentración más alta (presentó CMI =32768 µg/mL), frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Mediante el método de recuperación por contaminación directa se evidenció que si bien a la concentración de 100 mg/mL del extracto hidroalcohólico de las partes de la hoja y las flores de *Satureja pulchella* (Panisara), contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, hubo una disminución logarítmica de las concentraciones de niveles evaluados; dicha actividad antibacteriana si se encuentra limitada.

**Palabras clave:** Screening fitoquímico, metabolitos secundarios, método microdilución y método de recuperación por contaminación directa.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate the *in vitro* antimicrobial activity of the hydroalcoholic extract of the leaves and flowers of *Satureja pulchella* (Panisara) in strains of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Recognize the secondary metabolites responsible for the antimicrobial effect. **Methods:** Phytochemical screening or phytochemical screening, microdilution method and recovery method by direct contamination. **Results:** The secondary metabolites found more frequently in the hydroalcoholic extract of the *Satureja pulchella* (Panisara), were determined by the phytochemical Screening and were checked qualitatively; were detected: alkaloids, flavonoids and phenolic compounds. To determine the minimum inhibitory concentration (MIC) were determined by observing the lowest concentration of the agent (17 different concentrations of the hydroalcoholic extract) that inhibited the visible growth of the bacteria within the inoculated wells of the microplate. The bacterial production by the method of recovery by direct contamination, the reading of the bacterial production was estimated by the colony count in the culture of sown plates. This is verified by sowing the inoculum which if there is an obvious significant logarithmic reduction with respect to the initial concentration of the test strain. **Conclusions:** By means of the microdilution method, it was determined that in the 17 concentrations of the investigated extract, only the highest concentration (presented MIC = 32768 µg / mL), against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. By means of the recovery method by direct contamination it was evident that although at the concentration of 100 mg / mL of the hydroalcoholic extract of the parts of the leaf and the flowers of *Satureja pulchella* (Panisara), against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, there was a logarithmic decrease of the concentrations of levels evaluated; said antibacterial activity if it is limited.

**Key words:** Phytochemical screening, secondary metabolites, microdilution method and direct contamination recovery method.

## INTRODUCCIÓN

El presente estudio propuesto está orientado a brindar mayor información científica sobre la especie *Satureja pulchella* (Panisara) de la cual se investiga su actividad antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermis* que ya han demostrado efectividad en experimentos anteriores. Por ser la Panisara una especie de gran importancia y con usos empíricos frecuentes por parte de la población de la sierra de nuestro país de donde es originaria motiva a los investigadores a conocer sus principios activos y metabolitos secundarios responsables de las actividades terapéuticas que se le asignan y sobre todo porque existe la necesidad de combatir una serie de patologías infecciosas persistentes que tienen gran prevalencia en nuestra sociedad actual donde sobretodo han presentado resistencia bacteriana a tratamientos antibióticos sintéticos.

Los metabolitos secundarios presentes en la familia Lamiaceae han demostrado tener diversas actividades terapéuticas, su efectividad para combatir los trastornos del sistema digestivo y controlar las flatulencias o gases estomacales. Esta planta se emplea para prevenir la indigestión y en casos de gastritis, pero por presentar flavonoides, taninos y compuestos fenólicos también puede tener un efecto antibacteriano. Esta actividad se demuestra mediante la determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas mediante observación de la concentración más baja del agente que inhibió el crecimiento visible de la bacteria. El oscurecimiento o el color turbio en los pocillos es un indicador de crecimiento bacteriano.

En los últimos diez años la resistencia bacteriana producida por microorganismos gram negativos se ha ido incrementando, el método de microdilución ha sido utilizado para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de los extractos de las plantas.



Las consecuencias de no tener tratamientos óptimos y completos en un proceso antibacteriano son diversas, la infección mal curada puede repercutir afectando el organismo, expandiendo la infección a otras zonas del cuerpo y generando resistencia bacteriana a largo plazo. Por lo tanto la presente investigación se sustenta en la siguiente interrogante ¿Cómo evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja Pulchella* (Panisara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*?

La estructura del trabajo está dividida en cinco capítulos, que describen el desarrollo del proyecto realizado.

En el Capítulo I se presenta el planteamiento de la investigación, el problema, se describen claramente los objetivos a conseguir, la justificación y limitaciones de la misma.

En el Capítulo II nos proporcionara el marco teórico, las bases legales y teóricas, abordando las hipótesis planteadas.

En el Capítulo III empieza el trabajo de diseño de la investigación donde se aborda los procedimientos a realizar.

En el Capítulo IV se ofrece el análisis y discusión de los resultados.

Finalmente, en el Capítulo V se presentan las conclusiones y recomendaciones.

## CAPÍTULO I

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

#### 1.1. Descripción de la realidad problemática.

*Satureja pulchella* “Panisara” es una especie aromática nativa del Perú, según datos etnofarmacológicos es utilizada para solucionar problemas gastrointestinales y de las vías respiratorias. El aceite esencial de *Satureja pulchella* posee actividad antioxidante y una ligera toxicidad aguda dichas actividades se deben a la estructura química del aceite esencial. Teniendo en cuenta la presencia de metabolitos secundarios presentes en esta planta se debe investigar su efecto antimicrobiano frente a especies bacterianas más comunes, sabemos que la resistencia bacteriana es definida como una condición microbiológica caracterizada por la capacidad natural o adquirida por parte de una cepa bacteriana de permanecer refractaria a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antibiótico. Esta característica de las bacterias obliga al desarrollo y utilización de nuevos antibacterianos que no sean costosos y sobre todo no sean tóxicos para los seres humanos.

El Perú es un país biodiverso, en el encontramos una gran variedad de plantas medicinales las cuales en un gran porcentaje aún no han sido estudiadas al cien por ciento, estos estudios se pueden realizar utilizando las diferentes técnicas y métodos para la extracción de los principios activos y el uso de estudios *in vitro*.

En los últimos años, ha aumentado el uso de plantas medicinales, sobre todo en países en vía de desarrollo debido a su bajo costo y alta efectividad diversos estudios sugieren que extractos de plantas medicinales pueden mejorar síntomas de enfermedades e inhibir el crecimiento de los patógenos por lo que se pueden utilizar como un tratamiento alternativo.

En vista que el mayor porcentaje de nuestra población presenta bajos recursos económicos, la medicina no tradicional, entre ellos la medicina herbal, trata de buscar alternativas de solución a enfermedades, con hierbas medicinales, como productos económicos y prácticos. El resurgimiento en el

uso de alternativas naturales ha traído el uso de plantas medicinales a la vanguardia diversos estudios (farmacológicos, toxicológicos, entre otros) y muchos medicamentos nuevos que se descubran. Estas plantas medicinales, como la *Satureja pulchella* “Panisara” presentan diversas ventajas como sus efectos antioxidantes, antiinflamatorias y antimicrobiana, por lo que su uso es cada vez más conocido.

En esta orientación la investigación tiene como propósito determinar mediante un estudio *in vitro* el efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de esta especie sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* por el método de recuperación por contaminación directa de los extractos y el método de microdilución en microplacas para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC).

Las características de la realidad problemática señalada anteriormente sobre las infecciones bacterianas conducen en la orientación de que estas pueden aumentar en la población y los costos de antibióticos pueden elevarse, por ello, el estudio adecuado con respecto a las plantas con efectos bactericidas y bacteriostáticos en el país sugiere construir una alternativa de información y una forma de tratamiento adicionales para favorecer la recuperación de las patologías infecciosas.

## **1.2. Identificación y formulación del problema.**

### **1.2.1. Problema general.**

1. ¿Cómo evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*?

### **1.2.2. Problemas específicos.**

- 1.¿Qué metabolitos secundarios están presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara)?

2.¿Existe actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) por el método de microdilución en microplacas para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC)?

3.¿Existe actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) por el método de recuperación por contaminación directa?

### **1.3. Objetivos de la investigación.**

#### **1.3.1. Objetivo general.**

1. Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

#### **1.3.2. Objetivos específicos**

1. Determinar que metabolitos secundarios están presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara).
2. Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) por el método de microdilución en microplacas para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC).
3. Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) por el método de recuperación por contaminación directa.

#### 1.4 Justificación de la investigación.

En las últimas décadas se ha visto incrementado el uso de recursos naturales, entre los que destacan las plantas medicinales para uso alimentario y para paliar o curar enfermedades. La gran cantidad de plantas medicinales que existen en el mercado, a veces sin ningún control específico, y el auge de su consumo por parte de la población en general hace necesario comprobar su eficacia basándonos en estudios sobre su procedencia, uso, actividad, pureza y calidad de las mismas, para el uso del ser humano con aval científico. El interés por conocer las plantas medicinales y su uso se ha propagado en todas partes del mundo. El desarrollo tecnológico ha dado paso a nuevas metodologías y procedimientos que han modificado sustancialmente el estudio de las plantas y permiten visualizar el papel de los nuevos medicamentos preparados a base de plantas medicinales. (1)

Basándonos sobre estudios de procedencia, uso, actividad de la misma ya que los conceptos y resultados desarrollados en ella ayudarán a encontrar alternativas de tratamientos complementarios frente a las patologías bacterianas, debido a la gran aromaticidad de la planta de *Satureja pulchella* “Panisara” en sus atribuciones medicinales como aceites esenciales frente al crecimiento de *E. coli* y *Bacillus cereus* así como también presenta una actividad antioxidante y toxicidad aguda del aceite esencial, para infecciones y hasta para la gastritis, hace que continúe siendo objeto de considerables estudios para establecer su base química y farmacológica de la actividad que se ha demostrado claramente en un número de estudios clínicos.

En cuanto al alcance este estudio motivara a los investigadores a seguir desarrollando métodos efectivos para reconocer los metabolitos secundarios y probar sus diferentes efectos de esta especie la cual es muy apreciada en la región.

Este trabajo de investigación permitió conocer la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de la *Satureja pulchella* “Panisara” en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus*

*epidermidis* con la finalidad de conocer a que concentración provoca la actividad antimicrobiana por medio de los dos métodos utilizados, el método de microdilución en microplacas y el método de contaminación directa.

Finalmente este trabajo de investigación tiene de utilidad conocer los resultados y conclusiones, de la actividad antimicrobiana de esta especie vegetal, como uso medicinal con sustento científico que permitirá aportar conocimiento a la medicina tradicional para resolver necesidades de salud y gran parte en las terapias tradicionales mediante de extractos y de sus metabolitos secundarios que ayudará a determinar la utilidad en la industria farmacéutica en beneficio de la salud. (2)

### **1.5 Limitaciones de la investigación**

- Se trabajó a base del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* “Panisara”, solo se medirá el efecto antimicrobiano en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.
- Se realizó la investigación experimental en el laboratorio de investigación y desarrollo de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 Antecedentes de la investigación.

##### 2.1.1 Antecedentes nacionales:

**Cotrina F. (2016)** en el estudio: “Actividad antibacteriana del aceite esencial Panisara (*Satureja pulchella*) sobre *Staphylococcus aureus* 2016” con el objetivo de determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial Panisara “*Satureja pulchella*” frente a *Staphylococcus aureus*, las hojas de las plantas se colectaron en el departamento de Ancash, en el distrito de Huaraz. El aceite esencial se obtuvo por destilación con arrastre de vapor de agua. La actividad antibacteriana se determinó por el método de Bauer- Kirby llamada también método de difusión de disco obteniendo como resultado que el aceite esencial de la planta Panisara “*Satureja pulchella*” presenta actividad antibacteriana significativa sobre la Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC65538 a las concentraciones de 25%, 50%, 75% con un promedio de halos de inhibición de 14, 88 mm, 23.97 mm, 27.87 mm respectivamente. Se detectó compuestos fenólicos que se confirman por la coloración azul oscura con el reactivo de cloruro férrico y estos serían los principales responsables de la actividad antibacteriana. (3)

**Díaz J. (2014)** (4) en su tesis de grado titulada “Estructura química del extracto acuoso y etanólico de las hojas de *Tagetes elliptica* sm, chincho” Tuvo como objetivo evaluar la composición química del extracto para determinar su actividad antibacteriana, anti fúngica in vitro y su aplicación en un alimento andino. La recolección de la planta se realizó en el centro poblado de Molinos de la provincia de Jauja de la Región Junín. El método utilizado para obtener el extracto

etanólico fue la maceración con etanol de 96°, y la determinación de la composición química se realizó por el método de Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (CG/EM). Como resultados el autor encontró los siguientes componentes químicos: dianhydrodulcitol, ceanothine c, resorcinol, pirocatecol, 2-(2-butilil) ciclohexanona, z, z-6,24-tritricontadien-2-ona y 5-hexil-2,4-dimetiloxazol, el extracto acuoso evaluado *in vitro* no tiene actividad antibacteriana frente a las bacterias: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en ninguna de las concentraciones ensayadas de 100, 50 y 25 mg/mL respectivamente ya que a la concentración de 25 mg/mL, el halo de inhibición presentado fue menor de 18 mm. La actividad antifúngica del extracto etanólico frente a *Candida albicans* ATCC 10231 fue inactivo. “El extracto acuoso y etanólico de *Tagetes elliptica* Smith, debe su fragancia a la composición química que posee su aceite esencial y ejerce actividad antibacteriana debido al resorcinol y pirocatecol; compuestos fenólicos a los que se les atribuiría la actividad antibacteriana, predominando su aroma y sabor en el alimento integrado en el potaje andino denominado pachamanca”. (8)

**Ruiz J. (2013)** (5) en su tesis denominada “Actividad antifúngica *in vitro* y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales” Tuvo como objetivo determinar la acción antifúngica de los extractos metanólicos, etanólicos e hidroalcohólico de *Hypericum laricifolium* (partes aéreas), *Ilex guayusa* Loes (hojas), *Juglans neotropica* Diels (corteza), *Piper lineatum* (hojas), *Piper* spp. (hojas), *Psidium guajava* (hojas), *Cassia reticulata* Wild (planta entera) y *Terminalia catappa* (hojas). Estas especies fueron recolectadas en los departamentos de Amazonas y Cajamarca. En el estudio se utilizó el método de difusión en agar frente a *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404 y *Microsporium canis* cepa clínica y la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de microdilución colorimétrico, utilizando como controles ketoconazol y fluconazol. Como resultados el autor encontró que



todos los extractos presentaron actividad antifúngica importante frente a *C. albicans* y *M. canis*, y ninguno tuvo actividad frente a *A. niger*, mediante microdilución se determinó que 19 (79%), 18 (75%) y 24 (100 %) de los extractos investigados presentaron CMI  $\leq$  1000  $\mu\text{g/mL}$ , frente a *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* cepa clínica y *Microsporum canis*, respectivamente. “Los extractos con la mayor actividad antifúngica fueron los de *Juglans neotropica* Diels, *Psidium guajava* y *Terminalia catappa*; con CMI  $< 100 \mu\text{g/mL}$ ”.

(9)

**Carhuapoma M (2007)** (6) en su estudio titulado “Composición química, actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de *Satureja brevicalyx* Epling urqu muña” tuvo como objetivo principal caracterizar los componentes químicos, la actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante del aceite esencial de esta especie. Durante el procedimiento realizado el aceite esencial reportó un rendimiento (1.80%v/p), rotación óptica (-2 a +4°), densidad (0.9047 g/mL) e índice de refracción (1.475). Mediante CG-SM y CG-FID se elucidó 35 compuestos al 97.1%: monoterpenos oxigenados (74.8%), como componentes mayoritarios la pulegona (27.2%), linalol (20.3%), mentona (11.1%), isomentona (8.3%), cis-isopulegona (2.7%), trans-isopulegona (0.9%), carvacrol (0.6%), timol (0.6%) y  $\alpha$ -terpineol (0.5%); hidrocarburos sesquiterpénicos (16%), destacando biciclogermacreno (8.2%),  $\beta$ cariofileno (6.5%) y bicicloelemeno (0.5%); hidrocarburos monoterpénicos (4.1%), con el p-cimeno (2.0%), limoneno (0.7%) y  $\gamma$ -terpineno (0.6%); y sesquiterpenos oxigenados (1.5%), con el espatulenol (0.8%). El método para demostrar la bioactividad significativa fue la *Artemia salina*, con una CL50 de 13.35  $\mu\text{g/mL}$ , y por el método de Dosis Fija, en ratones albinos, presentaron una DL50 de 655.26 mg/kg, siendo ligeramente tóxica. Por el método de Difusión de Discos, tuvo un efecto antibacteriano frente al *H. pylori*, con un halo de inhibición de 33.33 % en comparación con la amoxicilina a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ ; por el método de Difusión en microplacas, la concentración mínima

inhibitoria fue de 1.00 µg/mL, y la concentración mínima bactericida de 2.00 µg/mL. “Finalmente el autor concluye que las estructuras químicas del aceite esencial de la *S. brevicalyx* justifican su actividad anti-*Helicobacter pylori* y antioxidante”. (7)

**Soto M.** (2014) en su estudio de investigación denominado “Metabolitos secundarios y efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroetanólico de las flores de *Cantua buxifolia* Juss. Polemoniaceae) “Flor Sagrada de los Incas” tuvo como objetivo principal determinar los metabolitos secundarios y medir su efecto antimicrobiano *in vitro*. Para lo cual el material vegetal fue recolectado de la Provincia de Otuzco, Región La Libertad, la técnica utilizada para la preparación del extracto hidroetanólico de las flores fue mediante maceración con etanol de 70% y se realizó el tamizaje fitoquímico del extracto, así mismo se realizó siembras en placas y preparación de pozos de agar a concentraciones de 0,5 mg/mL, 1,0 mg/ mL y 1,5 mg/mL del extracto. Como resultados de la investigación “se encontró metabolitos secundarios como: catequinas, lactonas, triterpenos y esteroides, saponinas, compuestos fenólicos, taninos, quinonas, flavonoides y antocianidinas, las cuales inhibieron el crecimiento bacteriano de las cepas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, siendo la concentración de 1,5 mg/mL la que presentó mayor porcentaje de inhibición frente a las cepas estudiadas”. (11)

**Mendoza L. (2015)** (8) en su estudio: “Efecto del aceite esencial de *Satureja pulchella* sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*” cuyo objetivo fue determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de *Satureja pulchella* a estas especies de bacterias. La especie vegetal *Satureja pulchella* fue recolectada del Caserío de Tambillo, provincia de Otuzco, Región La Libertad. El aceite esencial fue obtenido de las hojas mediante el método de hidrodestilación. La actividad antibacteriana se determinó por el método de difusión en agar en pocillo. En los resultados se observó que a las

concentraciones de 25, 50, 75 y 100 % de aceite esencial de *Satureja pulchella*, el halo de inhibición de crecimiento de *E. coli* fue de 6.60 mm, 12.07 mm, 15.87 mm, 23.60 mm respectivamente; así mismo para *B. cereus* el halo de inhibición del crecimiento al 25, 50, 75 y 100 % fue de 15.8 mm, 26.47 mm, 36.27 mm y 57.40 mm respectivamente. Se empleó Cloranfenicol y Vancomicina como controles para *E. coli* y *B. cereus* respectivamente. Para los dos microorganismos ensayados a medida que se ha incrementó el porcentaje de aceite esencial, los halos de inhibición del crecimiento fueron mayor. “Por lo tanto; el presente estudio permite afirmar que el aceite esencial de *Satureja pulchella* tiene efecto inhibitorio sobre *E. coli* y *B. cereus*”.

### 2.1.2 Antecedentes internacionales:

**Lizcano A. Vergara J. (2008)** (9) en su tesis realizada en Colombia denominada “Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos”, tuvieron como objetivo observar y determinar el efecto antimicrobiano de 4 especies frente a microorganismos patógenos como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* y un hongo fitopatógeno, las cepas utilizadas fueron adquiridas en la Pontificia Universidad Javeriana. El proceso experimental se realizó en los laboratorios de las instalaciones de la Subdirección Científica del Jardín Botánico de Bogotá. Para la obtención de los extractos etanólicos se utilizó el material vegetal seco previamente triturado, el cual fue macerado en frío utilizando como solvente etanol durante 48 horas, se realizó reflujo con etanol-agua(9:1) para su posterior concentración a presión reducida. Para obtener aceite esencial se utilizó la técnica de hidrodestilación y para evaluar la actividad antimicrobiana se utilizó la técnica de difusión de disco en agar de Kirby-Bauer la cual permitió ver la susceptibilidad *in*

*vitro* de los microorganismos patógenos y fitopatógenos seleccionados frente a sustancias de origen natural con potencial antimicrobiano. Para el tratamiento antibacteriano se usó 300 µg de extracto y como control positivo 10 µg de cloranfenicol y agua estéril como control negativo. Como resultados los Autores observaron que el extracto etanólico de *Passiflora manicata* presentó mayor actividad antimicrobiana frente a *E. coli*, *Candida albicans* y *B. subtilis*, razón por la cual se seleccionó para fraccionar el extracto crudo utilizando como solventes diclorometano, agua y alcohol isoamílico, demostrando que la fase acuosa fue la de mayor efecto inhibitorio frente a todos los microorganismos evaluados. Así mismo manifiestan que el aceite esencial obtenido con las hojas de *Myrcianthes rhopaloides* mostraron inhibición solo frente a *Candida albicans*. Llegaron a la conclusión que “*Passiflora manicata* fue el extracto etanólico que presentó mayor acción frente a todos los microorganismos, permitiendo realizar el fraccionamiento con los diferentes solventes identificando a la fase acuosa como la responsable del principio activo con potencial antimicrobiano; cabe anotar que para dar continuidad a futuras investigaciones en torno a la potencialidad antimicrobiana de la especie es necesario el aislamiento y la elucidación de la molécula capaz de inhibir a los microorganismo seleccionados”.(12)

**Giraldo (2014)** (10) en su estudio denominado “Aislamiento e identificación de metabolitos activos sobre el sistema nervioso central obtenidos de *Valeriana pavonii*”, tuvo como objetivo identificar la presencia de metabolitos con posible actividad antimicrobiana de esta especie. Se realizó mediante el fraccionamiento bioguiado extractos activos sobre el sistema nervioso central con potencial anticonvulsivante, ansiolítico y antidepresivo en una población de modelos murinos. El estudio encontró que la Isovaleramida (compuesto 1), metabolito por primera vez reportado en esta especie, presentó efectos anticonvulsivantes en el modelo de convulsión máxima inducida por electroshock en los ratones, logrando un 90% de

protección a una dosis única de 100 mg/Kg, tres nuevos valepotriatos de tipo hidrina (compuestos 2, 4 y 10), junto con 6 valepotriatos del mismo grupo conocidos en otras especies (compuestos 3, 5-9), se reportan por primera vez en esta especie vegetal y fueron aislados de las fracciones activas de éter de petróleo y diclorometano. Ensayos *in vitro* sugieren, para el compuesto 8, aislado de la fracción de diclorometano, un mecanismo de acción mediado por la unión al sitio de benzodiazepinas del receptor GABA-A. Mientras que los compuestos 3-6, 8 y 9, aislados de la fracción de diclorometano, presentaron actividad IMAO-B en el ensayo *in vitro* realizado, lo que sugiere efectos neuroprotectores. “Como conclusión se reportó que dos de cada cinco personas presentan al menos un trastorno mental en algún momento de su vida. El Autor sugiere que es importante estudiar plantas con actividad sobre el sistema nervioso central, entre las cuales se encuentra *Valeriana pavonii*”.

**Sánchez M. (2007)** (11) en su investigación: “Estudio de la técnica de microdilución en caldo para determinar la susceptibilidad a Clotrimazol y Fluconazol en dermatofitos, basándose en el documento m38-p de nccls”, tuvo como objetivo determinar la susceptibilidad a clotrimazol y fluconazol en 24 dermatofitos utilizando la técnica de microdilución en caldo para lo cual se probaron los dermatófitos más comunes encontrados en las distintas dermatofitosis, como son *Trichophyton rubrum*, *Trychophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum* y *Microsporum canis* los cuales fueron obtenidos de ceparios, muestras clínicas y veterinarias, luego de ser subcultivados en agar papa dextrosa, lo que demoró entre 7-15 días, se procesaron, para la preparación de los inóculos, que presentaban una concentración entre 10<sup>4</sup> a 10<sup>6</sup> UFC/mL. Las distintas concentraciones de los antifúngicos, fueron depositados en microplacas de fondo plano, usando como medio de cultivo RPMI 1640 tamponado con morfolinapropanosulfónico (MOPS). Se cultivaron las microplacas durante 7 días a 35°C. Posteriormente se analizaron visualmente las placas determinando las CMI<sub>50</sub> y las CMI<sub>75</sub>, para cada una de las

cepas. “El autor concluyo que los dermatófitos probados presentan un buen comportamiento cuando se prueban con clotrimazol y fluconazol, sólo con este último antifúngico se presenta CMI más altas, especialmente para *M. gypseum*”.

## **2.2. Bases legales.**

### **2.2.1 Normas nacionales.**

- **LEY Nº 26842** Ley general de la salud.

### **2.2.2 Normas internacionales.**

- **ANSI** El Instituto Nacional de Estándares Americanos (ANSI). El Instituto supervisa la creación, promulgación y uso de miles de normas y directrices que afectan directamente a las empresas en casi todos los sectores: desde dispositivos acústicos hasta equipos de construcción, desde productos lácteos y ganaderos hasta la distribución de energía, y muchos más. ANSI también participa activamente en la acreditación, evaluando la competencia de las organizaciones que determinan la conformidad con los estándares.
- **CLSI** El Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés) crea normas y pautas voluntarias de consenso con respecto a las pruebas clínicas y de laboratorio que se utilizan en las comunidades de atención médica y pruebas médicas. Estos estándares están acreditados por el Instituto Estadounidense de Estándares Nacionales (ANSI) y se mencionan en las regulaciones gubernamentales y estándares internacionales. Los estándares de CLSI le aseguran que puede: Asegurar la precisión, adoptar protocolos eficientes y minimiza el riesgo de contaminación.

- **EUCAST** Comité Europeo de pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, se ocupa de los puntos de corte y los aspectos técnicos de las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana fenotípica *in vitro* y funciona como el comité de punto de interrupción de EMA. EUCAST no se ocupa de las políticas de antibióticos, la vigilancia o la contención de la resistencia o el control de la infección. El Comité Directivo también consulta sobre propuestas de EUCAST con expertos en los campos de enfermedades infecciosas y microbiología, compañías farmacéuticas y fabricantes de dispositivos de prueba de susceptibilidad. Los puntos de ruptura de MIC antimicrobianos en Europa han sido armonizados por EUCAST y desde hace algunos años todos los países europeos siguen las directrices de EUCAST.
- **ISO 16140** Especifica el principio general y el protocolo técnico para la validación de métodos alternativos, principalmente patentados, para la microbiología en la cadena alimentaria. Los estudios de validación según ISO 16140 están destinados a ser realizados por organizaciones involucradas en la validación de métodos. Es aplicable a la validación de métodos para el análisis (detección o cuantificación) de microorganismos en productos destinados al consumo humano, productos destinados a la alimentación de los animales, muestras ambientales en el área de la producción de alimentos, manipulación y muestras de la etapa de producción primaria. Es particularmente aplicable a bacterias y hongos.

## 2.3 BASES TEÓRICAS.

### 2.3.1. Bases teóricas de las variables “Extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* “Panisara”

➤ ***Satureja pulchella* (Panisara).**

La *Satureja pulchella* conocida popularmente con el nombre de “Panisara”, planta herbácea propia de los andes (Ancash) de nuestro país crece a más de 2500 m.s.n.m, así mismo se puede encontrar en Asia y en algunas partes de los Estados Unidos, que crece asociada con la vegetación arbustiva, crece en suelos turbosos ricos en materia orgánica, se reproduce espontáneamente por semillas y vegetativamente. (12)



*Figura 01.* Satureja pulchella. Fuente: Instituto Superior de Educación Publico Huaraz (2012). Recuperado de <http://pmedicinal.webcindario.com/eve/panisara.html>



### 2.3.2. Identificación taxonómica.

<b>Reino</b>	: Plantae
<b>Subreino</b>	: Tracheobionta
<b>División</b>	: Magnoliophyta
<b>Clase</b>	: Magnoliopsida
<b>Orden</b>	: Lamiales
<b>Familia</b>	: Lamiaceae
<b>Subfamilia</b>	: Nepetoideae
<b>Tribu</b>	: Mentheae
<b>Género</b>	: Satureja
<b>Especie</b>	: <i>Satureja pulchella</i>
<b>Nombre común</b>	: Panisara (13)

### 2.3.3. Descripción

Es una planta herbácea, aromática y tiene un tallo delgado que se desarrolla en forma de mata y muy ramificado. Sus hojas son pequeñas, con base acorazonada y ápice agudo, dentadas, verde en la cara superior y blanca en la inferior debido a que es pubescente. Sus flores son pequeñas y labiadas, pentámeras; con cinco sépalos y cinco pétalos unidos. Esta hierba tiene flores lilas y rojas tubulares, que abren en la época de julio a setiembre. Las cuales alcanzan los 30 a 60 cm de altura. Toda la planta está cubierta de unos pelillos cortos. (14)

Los jardineros que deseen cultivar esta planta deberán sembrarla entre finales de invierno y primavera a 1,5 mm de profundidad, en buena sementera de compost. La germinación usualmente necesita de 14 a 21 días a 18-20 °C. Al alcanzar el tamaño adecuado se deben trasplantar a un macetero de aproximadamente 7 centímetros

de altura. Más tarde, al alcanzar los 40 centímetros de altura, se deben plantar en un suelo bien drenado, a pleno sol y una distancia de 38 cm. Se cosechan las hojas que se vayan a utilizar en agosto que es el mejor mes. El resto de las plantas tienen suficientes semillas para que en la próxima primavera crezca una mirada de nuevas plantas. (15)

#### **2.3.4. Propiedades curativas.**

Esta planta es utilizada por los hombres y mujeres para abrigarse de las bajas temperaturas, se toma como té, mates, infusiones también se le agrega a la leche para darle un toque de sabor muy especial por su aroma incomparable. (16)

#### **2.3.5. Usos medicinales.**

Tradicionalmente ha sido utilizada para tratar diferentes patologías como calambres gastrointestinales, náuseas, diarrea, dolores musculares y enfermedades de las vías respiratorias como broncodilatador y expectorante, la mayor parte de la planta contiene aceites esenciales los cuales le dan propiedades antibacterianas para conservación de las plantas, alimentos o para tratar patógenos que causan enfermedades en humanos. También ha sido utilizada como antioxidante, antiinflamatoria y analgésica.

#### **2.3.6. Metabolitos secundarios.**

Los metabolitos secundarios son también llamados productos naturales, no son universales, cada planta en sus distintos órganos (flor, hoja, tallo, raíz) tiene diferentes tipos de compuestos químicos con actividad terapéutica, cosmética u astringente, las plantas son auto constructoras de su propio alimento mediante la fotosíntesis.

Los compuestos secundarios no tienen una función aparente en el metabolismo primario pero sí tienen una implicación ecológica como defensa contra herbívoros, virus, hongos, bacterias, como sustancias alelopáticas, fitoalexinas o disuasorios nutritivos (Bourgaud et al., 2001).

La formación de los metabolitos secundarios en la naturaleza tiene lugar a partir de los metabolitos primarios. La síntesis de los productos naturales comienza con la fotosíntesis que tiene lugar en plantas superiores, algas y algunas bacterias. Es un proceso endotérmico que requiere de la luz solar. Aquellos organismos incapaces de absorber la luz obtienen su energía de la degradación de carbohidratos. Existen tres intermedios químicos principales como son el acetil-CoA, el ácido shikímico y el ácido mevalónico, a partir de estos compuestos se biosintetizan los principales grupos de productos naturales como son los ácidos grasos, antraquinonas, terpenos, esteroides, alcaloides, cumarinas, lignanos, etc.

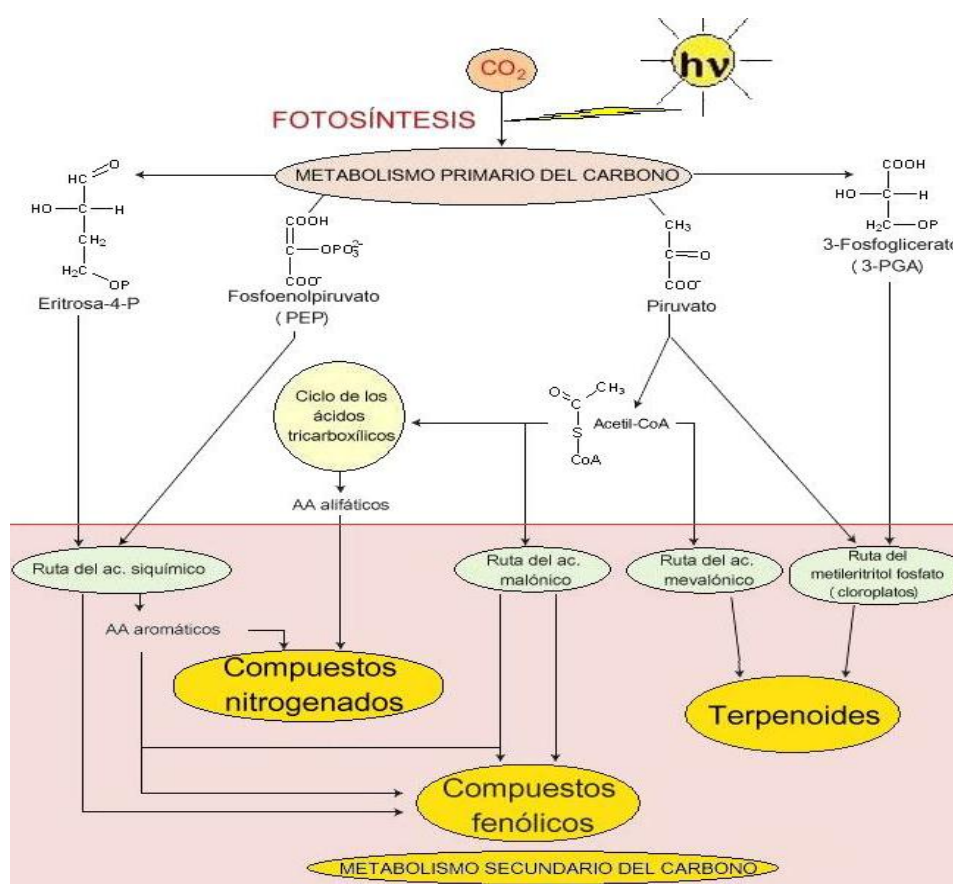


Figura 2. Formación de los metabolitos secundarios. Fuente: Ávalos, A. (2009).  
Recuperado de [http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo\\_secundario\\_de\\_plantas.pdf](http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf)

### **2.3.7. Tipos de metabolitos secundarios Básicos**

Los metabolitos secundarios de acuerdo a sus grupos funcionales se clasifican en tres partes, los cuales son: terpenoides, compuestos fenólicos y alcaloides. (17)

#### **A. Terpenoides.**

Los terpenos, o terpenoides, constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios. La ruta biosintética de estos compuestos da lugar tanto a metabolitos primarios como secundarios de gran importancia para el crecimiento y supervivencia de las plantas. Suelen ser insolubles en agua y derivan todos ellos de la unión de unidades de isopreno (5 átomos de C).

El grupo de los terpenos incluye hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol, colesterol), derivados de los esteroides (glicósidos cardíacos), latex y aceites esenciales (proporcionan el olor y el sabor característico de las plantas).

Muchos terpenoides son comercialmente interesantes por su uso como aromas y fragancias en alimentación y cosmética, o por su importancia en la calidad de productos agrícolas. Otros compuestos terpenoides tienen importancia medicinal por sus propiedades anticarcinogénicas, antiulcerosas, antimalaricales, antimicrobianas, etc. (18)

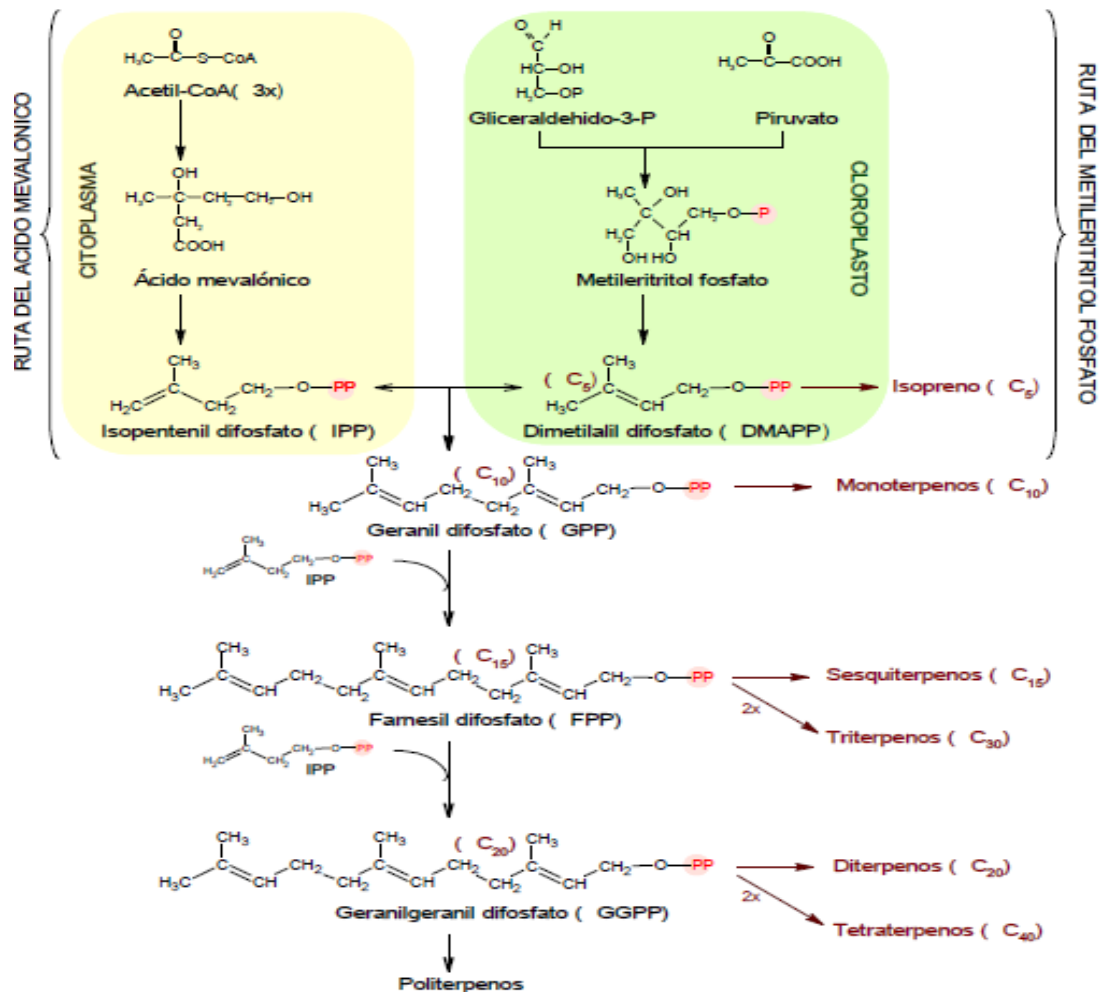


Figura 3. Formación de la ruta del ácido mevalónico. Fuente: Ávalos, A. (2009). Recuperado de [http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo\\_secundario\\_de\\_plantas.pdf](http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf)

Se sintetizan a partir de metabolitos primarios por dos rutas: la del ácido mevalónico, activa en el citosol, en la que tres moléculas de acetil-CoA se condensan para formar ácido mevalónico que reacciona hasta formar isopentenil difosfato (IPP), o bien la ruta del metileritritol fosfato (MEP) que funciona en cloroplastos y genera también IPP. (18)

El isopentenil bifosfato y su isómero dimetilalil difosfato (DMAPP) son los precursores activados en la biosíntesis de terpenos en reacciones de condensación catalizadas por prenil transferasas para dar lugar a

pernil bifosfatos como geranil difosfato (GPP), precursor de monoterpenos, farnesil difosfato (FPP) precursor de sesquiterpenos y geranilgeranil difosfato (GGPP) precursor de diterpenos. Ver Figura 03.

Muchas plantas como (limón, menta, eucalipto o tomillo) producen mezclas de alcoholes, aldehídos, cetonas y terpenoides denominadas aceites esenciales, responsables de los olores y sabores característicos de estas plantas, algunos de los cuales actúan como repelentes de insectos o insecticidas.

Los terpenos que se encuentran en los aceites esenciales son generalmente MONOTERPENOS, como el limoneno y el mentol. (18)

**Diterpenoides** se encuentran las giberelinas y el fitol, un diterpeno de cadena abierta que forma parte de la estructura de las clorofilas.

**Triterpenos** se encuentran esteroides y esteroleos derivados del escualeno, una molécula de cadena lineal de 30 C de la que derivan todos los triterpenos cíclicos. Los esteroides que contienen un grupo alcohol, y es el caso de casi todos los esteroides vegetales, se denominan esteroleos. (18)

## **B. Compuestos fenólicos.**

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides y derivan todas ellas del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo.

Existen dos rutas básicas implicadas en la biosíntesis de compuestos fenólicos: la ruta del ácido siquímico y la ruta del ácido malónico. (18)  
Ver Figura 04.

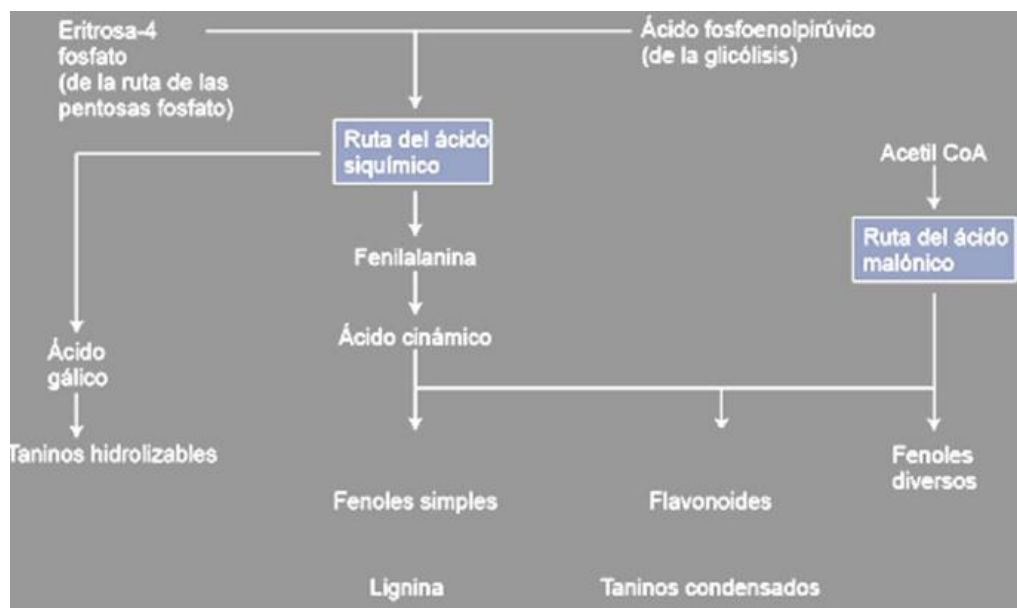


Figura 04. Formación de la ruta de síntesis de compuestos fenólicos. Fuente: Ávalos, A. (2009). Recuperado [http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo\\_secundario\\_de\\_plantas.pdf](http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf)

**La ruta del ácido malónico** es una fuente importante de fenoles en hongos y bacterias, pero es poco empleada en plantas superiores.

**La ruta del ácido siquímico** es responsable de la biosíntesis de la mayoría de los compuestos fenólicos de plantas. A partir de eritrosa-4-P y de ácido fosfoenolpirúvico se inicia una secuencia de reacciones que conduce a la síntesis de ácido siquímico y, derivados de éste, aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina). La mayoría de los compuestos fenólicos derivan de la fenilalanina. Esta ruta está presente en plantas, hongos y bacterias. (18)

## **Clasificación de los Compuestos fenólicos**

### **Fenoles simples**

**Los fenilpropanoides** por contener un anillo de benceno (C6) y una cadena lateral de tres carbonos (C3).

**Las cumarinas** son una amplia familia de lactonas, más de 1500 identificadas en más de 800 especies de plantas, que actúan como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación.

### **Fenoles complejos**

**La lignina** es un polímero altamente ramificado de fenilpropanoides. Después de la celulosa, es la sustancia orgánica más abundante en las plantas. Es insoluble en agua y en la mayoría de los solventes orgánicos lo que hace muy difícil su extracción sin degradarla. Se deposita en la pared secundaria, fortalece los tallos y tejidos vasculares permitiendo el crecimiento vertical y la conducción de agua y minerales a través del xilema.

**Los taninos** son compuestos fenólicos poliméricos que se unen a proteínas desnaturalizándolas. Existen dos categorías:

**Taninos condensados** son polímeros de unidades de flavonoides unidas por enlaces C-C.

**Taninos hidrolizables** son polímeros heterogéneos que contienen ácidos fenólicos.

**Los flavonoides** su esqueleto carbonado contiene 15 carbonos ordenados en dos anillos aromáticos unidos por un puente de tres carbonos. Los flavonoides poseen en su mayoría propiedades y actividades antiinflamatoria así mismo son antioxidantes, antialérgica, hepatoprotectora, antitrombótica, antiviral y anticarcinogénica.

Las antocianinas pertenecen a los flavonoides sin embargo son estudiadas por separado. Cada flavonoide se encuentra en forma de glicósidos (glucosa, galactosa, xilosa y arabinosa;) están unidos como una misma aglicona en diferentes partes y presentando con mayor



posición el número glicósidos conocidos; derivan del 2-fenilcromano, su estructura base (benzopirán-4-ona con un sustituyente aromático en el carbono). Se clasifican por su estructura química (flavonas, flavonoles, flavanonas, dihidroflavanoles, isoflavonas, chalconas y auronas), antocianinas. Dan coloración a las flores y frutos.

### **C. Alcaloides.**

**Los alcaloides** son una gran familia de más de 15.000 metabolitos secundarios que tienen en común tres características: son solubles en agua, contienen al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, y exhiben actividad biológica. La mayoría son heterocíclicos aunque algunos son compuestos nitrogenados alifáticos (no cíclicos).

En humanos, los alcaloides generan respuestas fisiológicas y psicológicas la mayoría de ellas consecuencia de su interacción con neurotransmisores. A dosis altas, casi todos los alcaloides son muy tóxicos. Sin embargo, a dosis bajas tienen un alto valor terapéutico como relajantes musculares, tranquilizantes, antitusivos o analgésicos. (18)

#### **2.3.8. Registro de campo (ubicación geográfica).**

***Satureja pulchella*. “Panisara”.** Se recolectó en el Departamento de Ancash, Provincia de Pomabamba, en el mes de febrero del 2017 a una altitud de 2500 m.s.n.m. Se realizó el estudio respectivo en el laboratorio de investigación y desarrollo en la Universidad Peruana Cayetano Heredia. (19)

#### **2.3.9. Métodos de extracción.**

Actualmente el aislamiento de productos naturales permite la selección de extractos y a partir de los activos el aislamiento e identificación de los principios.

Con el fin de mejorar el rendimiento de la extracción se somete el material vegetal a la identificación botánica, selección de la parte vegetal y desecación de la planta.

El proceso se inicia con la interacción droga – disolvente.

### **Tipos de Extracción.**

#### **A. Maceración**

El material vegetal está en contacto con un volumen de disolvente por un determinado tiempo. (20)

#### **B. Continua (Soxhlet) o percolación**

El equipo consta de tres partes, la primera es un balón donde va el disolvente que a un calentamiento hace que el solvente suba hasta el refrigerante que condensa y por gravedad cae a la parte donde se encuentra la muestra empaquetada en forma de cartucho, una vez que la muestra se embeba por medio de sifoneo el solvente regresa al balón y se repite la secuencia. (20)

### **2.3.10. Screening Fitoquímico o Tamizaje fitoquímico.**

Determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de color y precipitación. Debe de permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo.

### 2.3.2 Bases teóricas de la variable “Actividad Antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*”

#### ➤ Microorganismo patógenos *Staphylococcus aureus*.

Son cocos “Gram positivos de 0,5 - 1 mcm de diámetro, inmóviles, aeróbios o anaeróbios facultativos, caracterizados por su agrupación en forma de racimo, Ver Figura 5. Crecen a una temperatura óptima de 37 °C y se desarrollan mejor en un pH ligeramente alcalino de 7.6 la adición de glucosa favorece el crecimiento”. (21)

Forma parte de la flora normal de mucosas y piel e intervienen en procesos patológicos diversos como infecciones supurativas e intoxicaciones alimenticias (Arévalo A, 1996). Más del 95% de los *Staphylococcus aureus* producen proteína A, la cual puede estar asociada a la célula o al medio extracelular, con una importante afinidad por la fracción Fc de la Ig G. La presencia de proteína A o coagulasa es de gran utilidad clínica para diferenciar *Staphylococcus aureus* de otras especies de Estafilococos. *Staphylococcus aureus* es “una bacteria que puede causar infección en todos los grupos de edad tanto en forma esporádica como epidémica y se ha identificado como una de las principales causas de infección de heridas quirúrgicas. Su principal forma de transmisión es por contacto”. (21)

La capacidad de *Staphylococcus aureus* para fermentar los azúcares como maltosa, manitol, trehalosa es positiva. “La producción de una nucleasa termoestable es un buen indicador de la presencia *Staphylococcus aureus*, al igual que la conversión de nitratos a nitritos (Peñaranda O, 2003). Elaboran diversas enzimas: proteasas, lipasas, fosfatasas, gelatinasas, catalasas y coagulasas”.(24)

En cultivo puro resisten “una concentración de fenol al 1% durante 15 minutos, pero solo los mata una concentración al 2%. Soportan el

calor húmedo a 60 °C durante 30 minutos. Muchas cepas de *Staphylococcus aureus* toleran concentraciones altas de cloruro de sodio (7,5 a 10%), y son fácilmente inhibidos por colorantes como el violeta de genciana”. (21)

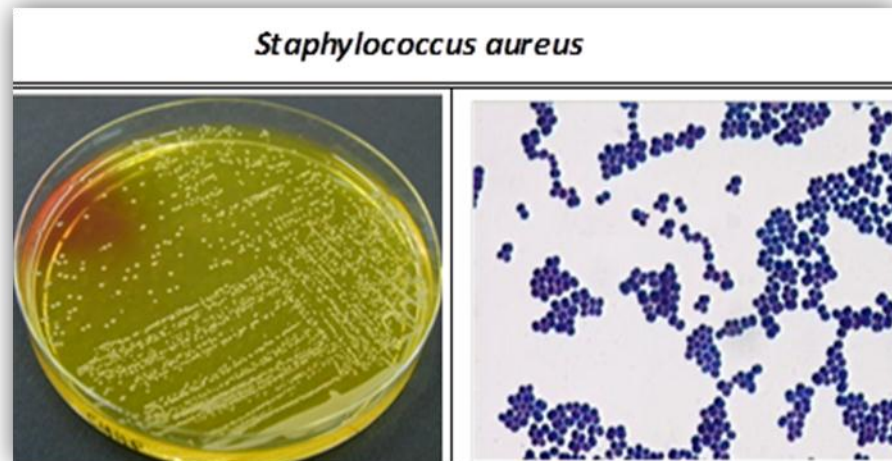


Figura 5. Características macroscópicas y microscópicas de *Staphylococcus aureus*. Fuente: Fundacionio.. Recuperado de [http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/Staphylococcus\\_aureus.html](http://fundacionio.org/img/bacteriology/cont/Staphylococcus_aureus.html)

### **Tipos de infecciones por *Staphylococcus aureus*.**

Las infecciones más comunes atacadas por *Staphylococcus aureus* varían de leves a mortales entre ellos podemos ver:

Algunas infecciones estafilocócicas son más probables en determinadas situaciones:

- **Endocarditis.-** Cuando las personas se inyectan droga, se les ha infectado un catéter en los vasos sanguíneos o se les ha instalado una válvula cardíaca artificial.
- **Osteomielitis.-** Si *Staphylococcus aureus* se propaga al hueso desde una infección del torrente sanguíneo o desde una infección de tejidos blandos adyacentes, como puede ocurrir en las personas que sufren úlceras por presión profunda o úlceras en los pies debido a la diabetes.

- **Infección pulmonar (neumonía).**- Cuando se ha sufrido una gripe (especialmente) a una septicemia, cuando se toman cortico esteroides u otros fármacos inhibidores del sistema inmunitario (inmunosupresores), o cuando los afectados han sido hospitalizados al necesitar intubación traqueal y ventilación mecánica (ver neumonías intrahospitalarias y neumonías asociadas con la asistencia sanitaria).

➤ **Microorganismo patógenos *Staphylococcus epidermidis*.**

Son cocos Gram positivos, inmóviles, aerobios o anaerobios facultativos, caracterizados por su agrupación en forma de racimo, a diferencia de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* son coagulasa negativo y termonucleasa variable. Fue considerado por mucho tiempo como un germen contaminante de cultivos. Sin embargo, ahora se le reconoce como un importante patógeno nosocomial debido al uso incrementado de dispositivos médicos como catéteres endovenosos de permanencia prolongada, injertos vasculares, válvulas cardiacas y articulaciones protésicas, representando el 24% de los patógenos nosocomiales encontrados en la sangre además es considerado el agente más común de bacteriemia en pacientes inmunodeprimidos. *Staphylococcus epidermidis* alcanza el torrente circulatorio mediante los dispositivos de acceso vasculares infectados. (22)

Los pacientes en los que desarrolla bacteriemia estafilocócica relacionada con catéteres suelen tener dispositivos de acceso múltiples ubicados para el tratamiento de cáncer o para la administración de agentes quimioterapéuticos para el trasplante de medula ósea. (23)

“Dado que este es un microorganismo de transmisión nosocomial, tiene una alta tasa de resistencia a múltiples antibióticos. Cerca del

90% producen betalactamasas, mientras que 60% al 80% son resistentes a la meticilina". (27)

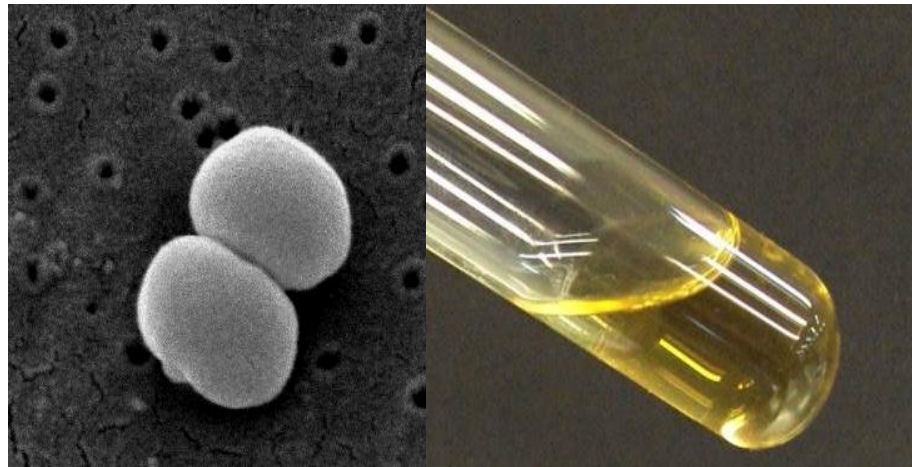


Figura 6. Características macroscópicas y microscópicas de *Staphylococcus epidermidis*. Fuente: Alamy. (2017). Recuperado de Fuente: <http://www.alamy.com/stock-photo/staphylococcus-epidermidis-bacteria.html>

## 2.4 Formulación de la hipótesis.

### 2.4.1 Hipótesis general.

1. El extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) poseen efecto antimicrobiano en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

### 2.4.2. Hipótesis específicas.

1. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) pueden tener efecto antimicrobiano en las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

2. Existe actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) por el método de microdilución en microplacas para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC).
3. Existe actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) por el método recuperación por contaminación directa.

## **2.5 Operacionalización de variables e indicadores.**

### **2.5.1 VARIABLES**

#### **2.5.1.1 Variable Independiente:**

- Extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara).

#### **2.5.1.2 Variable Dependiente:**

- Actividad antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Actividad antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus epidermidis*.

### **2.5.2 INDICADORES: (VI)**

- Diferentes diluciones del extracto hidroalcoholico

### **2.5.3 INDICADORES: (VD)**

- Incoloro: Positivo
- Coloreado: Negativo
- Crecimiento: Positivo

## 2.6 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS.

- **Actividad Antibacteriana:**

Se entiende por la acción que ejerce un factor externo sobre el crecimiento microbiano.

- **Autoclave:**

Recipiente de presión metálico de paredes gruesas con un cierre hermético que permite trabajar a alta presión para realizar una reacción industrial, una cocción o una esterilización con vapor de agua.

- **Cepa:**

Se distingue por ser característica de un organismo en particular que mantiene sus propiedades bioquímicas y macroscópicas homogéneas y únicas.

- **Dilución seriada:**

Disolución repetida de una solución para ampliar el factor de dilución rápidamente. Se realiza normalmente en experimentos que requieren soluciones muy diluidas con gran precisión.

- **Extracto acuoso:**

Preparación en agua de la sustancia de una planta o un animal que contiene la porción biológicamente activa sin el residuo celular.

- **Estufa:**

Equipo que se utiliza para secar y esterilizar recipientes de vidrio y metal en el laboratorio, por lo general entre la temperatura ambiente y los 350°C.



- **Extractos Hidroalcohólico:**

Extractos líquidos concentrados, obtenidos de la extracción de una planta o de parte de ella, utilizando como solvente alcohol y agua.

- **Microplacas:**

Placa con múltiples pocillos que se utilizan como pequeños tubos de ensayo, se ha convertido en un utensilio estándar en la investigación analítica y clínica en microbiología, y en laboratorios de diagnóstico.

- **Microorganismos:**

Ser vivo microscópico que presenta una organización biológica elemental.

- **Microdilución:**

Método adaptado de la EUCAST. Consiste en ensayo en microplacas de 96 pocillos cuyos resultados se basan en la reducción de 50% de turbidez para determinar la concentración mínima inhibitoria.

- **Papel Whatman:**

Estándares de referencia por su calidad y fiabilidad para la filtración, ofrece una amplia gama de filtros de papel con características únicas que hacen de ellos la elección óptima para múltiples técnicas de filtración.

- **Recuperación:**

Volumen de suspensión inoculada en una matriz para determinar su veracidad.

- **Unidad formadora de colonias (UFC):**

Unidad de medida empleada en la cuantificación de microorganismos, es decir, el número de bacterias o células fúngicas (levaduras) viables en una muestra líquida o sólida.

## CAPITULO III

### METODOLOGÍA

#### 3.1 Tipo y nivel de la investigación

**Investigación descriptiva.-** Los estudios descriptivos permiten detallar sucesos y/o eventos. Es decir, cómo es y de qué manera se manifiesta dicho fenómeno. Además, busca especificar importantes características de personas, grupos, comunidades o cualquier otro fenómeno que se vaya a estudiar. (24)

**Investigación experimental.-** La investigación experimental requiere de un manejo de intencionada de las actuaciones para estudiar sus posibles resultados. Esta investigación responde a un diseño experimental, donde se hace variar en forma intencional las variables para ver su efecto sobre otra variable. (24)

**Investigación analítica.-** Este método nos permite conocer más del objeto de estudio, con lo cual se puede: explicar, hacer analogías, comprender mejor su comportamiento y establecer nuevas teorías. (24)

**Investigación Observacional.-** Tipo de investigación en la que el investigador se limita a “la observación y el registro” de los acontecimientos sin intervención alguna en el curso natural de estos. (24)

Incluye aquellos proyectos de investigación donde no se controla la asignación del paciente a un determinado tratamiento o intervención, sino que ésta se efectúa de acuerdo a la práctica clínica habitual, siendo por ende el investigador solo un observador y descriptor de lo que ocurre. (24)

**Investigación Exploratoria.-** Puede ser cuantitativa, cualitativa o histórica. Dentro de sus posibilidades trata de descubrir todas las afirmaciones o pruebas existentes del fenómeno que se estudia. (24)

### **3.2. Diseño de la investigación.**

#### **Experimental**

Es una técnica estadística que permite identificar y cuantificar las causas de un efecto dentro de un estudio experimental. Se manipulan deliberadamente una o más variables, vinculadas a las causas, para medir el efecto que tienen en otra variable de interés y las pruebas controladas para entender los procesos causales. (24)

### **3.3. Población y Muestras de la Investigación.**

#### **Población**

Las cepas utilizadas para el presente estudio fueron:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

#### **Muestra**

El extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* en diferentes concentraciones.

### **3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

#### **3.4.1 Descripción de instrumentos**

**Observacional.-** Empleando el método científico a base de preguntas se observa los cambios que ocurren en la parte del tamizaje y en las microplacas para la parte microbiológica.

### **3.4.2 Validación del instrumento.**

Se presentó las técnicas para la identificación de los metabolitos secundarios que es el screening fitoquímico, el cual se identificó los principales metabolitos de la planta, así como también el instrumento para microbiología que es el método de microdilución en microplacas y el método de recuperación por contaminación, que es lo último que se emplea para la investigación titulada: “Evaluación de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcoholico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (panisara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*”.

### **3.4.3 Técnicas de procesamiento.**

- **Screening Fitoquímico o Tamizaje fitoquímico.**

Técnica utilizada en farmaconogía para determinar la presencia de metabolitos secundarios.

- **Método de Microdilución en Microplaca.**

Para determinar la concentración mínima inhibitoria, se usó el método de microdilución; adaptado y basado en la norma de referencia del documento M100-S15 y el EUCAST.

- **Método de recuperación por contaminación directa.**

Para determinar la actividad antimicrobiana como interferencia de la producción bacteriana, se usó el método de recuperación por contaminación directa; adaptado y basado en la norma de referencia del documento ISO 16140 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative Methods.

### **3.5 Materiales, equipos y reactivos.**

#### **3.5.1 Material biológico.**

- Hojas y flores de *Satureja pulchella* “Panisara”
- Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

#### **3.5.2 Material de vidrio y otros.**

- Tubos de ensayo de 13x100mm
- Tubos de ensayo de 16x100mm
- Tubos de ensayo de 20x100mm.
- Rejillas.
- Vaso de precipitado (250 y 500mL)
- Pipetas Pasteur.
- Pipetas graduadas de expulsión total, de capacidades nominales de 1ml, 5 ml, 10 ml y 25 ml, graduadas en divisiones de 0.01 ml, 0.1 ml, 0.1, 0.25 ml respectivamente.
- Baguetas
- Vaso de precipitado
- Matraz Erlenmeyer
- Embudos
- Frascos Pírex
- Soporte universal
- Aro para soporte universal
- Guantes
- Mascarillas
- Gorros
- Papel kraft
- Papel wathman
- Frascos de vidrio autoclavable de 250ml
- Frascos de vidrio autoclavable de 500ml
- Placas petri de 90mm de diámetro.
- Asas de siembra.

- Micropipetas graduadas de expulsión total, de capacidades nominales de 100 ul y 1000 ul.
- Puntas de Micropipetas.
- pH metro capaz de medir 0.01 unidades de pH a 25°C, que permita que las medidas realizadas, tengan una precisión de  $\pm 0.1$  unidades de pH.
- Frascos de vidrio autoclavable de 100 ml

### **3.5.3. Equipos e instrumentos.**

- Balanza electrónica con capacidad de 2000g y sensibilidad de 0.1g.
- balanza de plato superior
- Rotavapor
- Autoclave

### **3.5.4. Reactivos.**

- Alcohol 96°
- Agua destilada
- Reactivo Wagner
- Reactivo Shinoda
- Reactivo Fe Cl<sub>3</sub>
- Reactivo Sonneschein
- Reactivo Mayer
- Caldo Mueller Hinton.
- Agar Trypticase de soya (TSA)
- Solución Amortiguadora de Fosfato de pH 7.2.
- Hidróxido de Sodio SR

## CAPÍTULO IV

### PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

#### 4.1 Procedimiento experimental de la variable “Extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* - Panisara”.

##### 4.1.1. Recolección

***Satureja pulchella*. “Panisara”.** Se recolectó en el Departamento de Ancash, Provincia de Pomabamba, en el mes de febrero del 2017 a una altitud de 2500 m.s.n.m. Se realizó el estudio respectivo en el laboratorio de investigación y desarrollo en la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

##### 4.1.2. Obtención del extracto hidroalcohólico

- Las hojas y flores seleccionadas se sometieron a limpieza previa, luego se desinfectó con el alcohol.
- Se secaron las hojas y flores con ayuda de la estufa a una temperatura de 40 °C por dos días, para así poder triturar, obteniendo un peso de 600 gramos.
- Para la extracción hidroalcohólica está consto de una preparación de etanol grado químicamente puro (96°) y agua en una proporción de (70:30) y un total de un litro del solvente, colocados en frasco de pírex boca ancha.
- Se dejó macerar la muestra por quince días, con suaves movimientos todos los días, para que la extracción sea homogénea.
- Al finalizar el periodo de maceración, se filtró en papel whatman N°40 para evitar que tengamos residuos de la planta.

- Al término de la extracción, la muestra es colocada al equipo de rota vapor, pasado 5 horas se obtuvo 300ml de concentración del extracto.

#### 4.1.3. Screening fitoquímico o Tamizaje fitoquímico

- **Alcaloides.**- El término “Alcaloide” propuesto por W. Meissner en 1819, compuesto básico de origen natural que presenta nitrógeno en su estructura.

##### ✓ **Reactivo de Mayer**

El reactivo de Mayer se prepara con 1.36 gramos de  $\text{HgCl}_2$ /60 mL de agua (A) y 5 gramos de  $\text{KI}$ /10 mL de agua (B), se mezclan y se diluye a 100 mL con agua.

Se agrega este reactivo a la muestra acidulada.

Se obtuvo un precipitado blanco lechoso

##### ✓ **Reactivo de Wagner**

El reactivo de Wagner se prepara con 1.27 gramos  $\text{I}_2$  + 2.0 gramos de  $\text{KI}$ /5 mL en agua. Diluir a 100 mL con agua.

Se agrega este reactivo a la muestra.

Se obtiene un precipitado marrón.

##### ✓ **Reactivo de Sonneschein**

El reactivo se prepara a partir de una solución ácida de molibdato de amonio, agregando solución ácida saturada de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  hasta formación de precipitado, filtrar, lavar el precipitado y disolver en solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Evaporar a sequedad y disolver 10 gramos del residuo en 100 mL de ácido nítrico al 30%.

Se agrega este reactivo a la muestra.

Se obtiene un precipitado naranja.



✓ **Reactivo de Drangendorff**

El reactivo se prepara mezclando 8 gramos de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$  en 20 mL de ácido nítrico. Con 27.2 gramos de KI/50 mL en agua. Esta mezcla se deja reposar, decantar supernadante y diluir a 100 mL con agua.

Se agrega este reactivo a la muestra.

Se obtiene un precipitado rojo o naranja.

- **Flavonoides.-** Son sustancias fenólicas de múltiples acciones farmacológicas: antioxidantes antiinflamatorias, antimicrobiano, etc. Es el grupo más abundante de metabolitos existentes en plantas.

✓ **Solución de Shinoda**

Se añade limaduras de magnesio + ácido clorhídrico concentrado a la muestra en análisis.

Se obtiene tonos rojos.

- **Compuestos fenólicos.-** se refieren a un grupo de sustancias que poseen un anillo en común aromático. Son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua, detectados por el intenso color verde, purpura, azul o negro.

✓ **Reactivo de Tricloruro férrico**

Se colocó 5 mililitros de la muestra en un tubo de ensayo, agregándole 2 mililitros de agua y 5 gotas de solución de cloruro férrico al 1 %

Se obtuvo una coloración verde que indica la presencia de taninos condensados.

## **4.2. Procedimiento experimental de la variable “Actividad Antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*”**

### **4.2.1. Microorganismos usados.**

Se utilizaron para las pruebas, cepas de referencia. Ver Fotografía 06.

- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228

### **4.2.2. Preparación de las muestras para las pruebas de microdilución**

En la prueba de microdilución una solución de los extractos hidroalcohólico de la hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) fue diluido en solución salina estéril al 0,9%, a concentración de 32768 ug/mL y la concentración madre fue diluida en diluciones medias seriadas; obteniendo 10 diluciones de 1:2 de concentraciones finales (16384 ug/mL, 8192 ug/mL, 4096 ug/mL, 2048 ug/mL, 1024 ug/mL, 512 ug/mL, 256 ug/mL, 128 ug/mL, 64 ug/mL, 32 ug/mL, 16 ug/mL, 8 ug/mL, 4 ug/mL, 2 ug/mL, 1 ug/mL y 0,5 ug/mL). Ver Fotografía 07.

### **4.2.3. Método de Microdilución**

#### **1. Preparación de los controles para las pruebas de microdilución**

Los controles positivos utilizados para las pruebas fueron con eritromicina para *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. La eritromicina soluble en metanol, fue preparado a 400 µg/mL, siguiendo las normas del CLSI a una concentración mínima 100 veces mayor de la concentración a ser probada, en este caso 4 µg/mL. El control de esterilidad fue el medio Caldo Mueller Hinton con solución salina estéril al 0,9%. Ver Fotografía 08.

## **2. Preparación del medio de cultivo Caldo Muller Hinton para la prueba de microdilución**

El medio de cultivo utilizado fue el Caldo Mueller Hinton (Conda), siguiendo las recomendaciones del CLSI. Para preparar 50 mL del medio Caldo Mueller Hinton al 2% de NaCl, se pesó asépticamente 1,05 g del medio y se disolvió en 45 mL agua purificada estéril, luego se pesó 1,0 g de NaCl (J. T. Baker) y se añadió al preparado anterior, luego se agregó 5 mL de agua destilada estéril y finalmente se filtró utilizando filtro de 0.45 µm de porosidad (MERCK) Luego fue almacenado en recipiente estéril en conservación de 2 – 8 °C y protegido de la luz hasta el momento de su uso. Antes de usar el medio se verificó la ausencia de turbidez (ausencia de contaminación) mediante una siembra de recuento en “placa-spread plate”.

## **3. Preparación del inóculo de *Staphylococcus epidermidis*.**

A fin de obtener un mayor número de células viables, un repique de *Staphylococcus epidermidis* fue realizada 48 horas antes de la prueba de determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). El día del ensayo, una pequeña alícuota del microorganismo fue transferida a un tubo de ensayo conteniendo solución amortiguadora de fosfato de pH 7,2, hasta alcanzar un grado de turbidez semejante al tubo 0.5 de la escala de McFarland, que equivale a  $1,5 \times 10^8$  ufc/mL (inóculo concentrado). Después se realizó las diluciones con los tubos de dilución de caldo Mueller Hinton de 9ml para la obtención de los inóculos de diferentes concentraciones. Ver Fotografía 09.

## **4. Preparación del inóculo de *Staphylococcus aureus*.**

A fin de obtener un mayor número de células viables, una reactivación del pellet de una cepa de referencia cuantitativa de *Staphylococcus aureus* fue realizada en un frasco de 2 ml de líquido hidratante (Microbiologics). Inmediatamente se incubó el

pellet hidratado a 37°C por 30 minutos junto con los tubos de dilución de caldo Mueller Hinton de 9ml , pasado el tiempo de incubación se procedió con las diluciones y la obtención de los inóculos de diferentes concentraciones. Ver Fotografía 10.

## **5. Procedimiento de la prueba de microdilución.**

La prueba de microdilución fue realizada en microplacas de 96 pozos estériles, de fondo en plano (Nunc Surface). De manera general la distribución de las muestras se realizó teniendo en cuenta el diseño de la bandeja de microdilución (Ver Fotografía 12). En los pozos correspondientes a las muestras (A1-A12, B1-B5, C1-C12, D1-D5, E1-E12, F1-F5, G1-G12 y H1-H5), en los controles positivos de Eritromicina (B12, D12, F12 y H12) y en los controles de esterilidad (B11, D11, F11 y H11), se colocan:

### **Para el caso de *Staphylococcus aureus*.**

- 50 µL del inóculo (suspensión microbiana de *Staphylococcus aureus* de concentración:  $5.2 \times 10^7$  UFC/mL,  $5.2 \times 10^6$  UFC/mL,  $5.2 \times 10^5$  UFC/mL y  $5.2 \times 10^4$  UFC/mL) (ejemplo para el pozo A1-A12 y B1-B5 será 50 µL de inóculo de *aureus* de  $5.2 \times 10^7$  UFC/mL).
- 50 µL de cada concentración de la muestra de extracto hidroalcohólico.

### **Para el caso de *Staphylococcus epidermidis*.**

- 50 µL del inóculo (suspensión microbiana de *Staphylococcus epidermidis* de concentración:  $1.5 \times 10^7$  UFC/mL,  $1.5 \times 10^6$  UFC/mL,  $1.5 \times 10^5$  UFC/mL y  $1.5 \times 10^4$  UFC/mL) (ejemplo para el pozo A1-A12 y B1-B5 será 50 µL de inóculo de *Staphylococcus aureus* de  $1.5 \times 10^7$  UFC/mL).
- 50 µL de cada concentración de la muestra de extracto hidroalcohólico.

## **6. Incubación de la microplaca.**

Las microplacas se incubaron a 37°C por 24 h para las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

## **7. Lectura de los resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).**

La lectura de resultados se hizo visualmente. Cualquier cambio de turbidez a incoloro se registraron como positivos. La concentración más baja del extracto hidroalcohólico que inhibió el crecimiento visible del microorganismo en la que no se produzca la turbidez se tomó como el valor de la CMI.

Para una buena interpretación de los resultados se verificó que los pocillos de control positivo y control de esterilidad cumplan los criterios de aceptación para poder seguidamente determinar la CMI. Por ello la importancia de rotular y tener bien identificado los pocillos de prueba tal como se detalla en la siguiente tabla. Ver Tabla 01.

**Lectura de los resultados de la Concentración Mínima  
Inhibitoria (CMI).**

**Tabla 01. Diseño de la bandeja de microdilución.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	32768 mg/mL	16384 mg/mL	8192 mg/mL	4096 mg/mL	2048 mg/mL	1024 mg/mL	512 mg/mL	256 mg/mL	128 mg/mL	64 mg/mL	32 mg/mL	16 mg/mL
<b>B</b>	8 mg/mL	4 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL						CE	CP
<b>C</b>	32768 mg/mL	16384 mg/mL	8192 mg/mL	4096 mg/mL	2048 mg/mL	1024 mg/mL	512 mg/mL	256 mg/mL	128 mg/mL	64 mg/mL	32 mg/mL	16 mg/mL
<b>D</b>	8 mg/mL	4 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL						CE	CP
<b>E</b>	32768 mg/mL	16384 mg/mL	8192 mg/mL	4096 mg/mL	2048 mg/mL	1024 mg/mL	512 mg/mL	256 mg/mL	128 mg/mL	64 mg/mL	32 mg/mL	16 mg/mL
<b>F</b>	8 mg/mL	4 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL						CE	CP
<b>G</b>	32768 mg/mL	16384 mg/mL	8192 mg/mL	4096 mg/mL	2048 mg/mL	1024 mg/mL	512 mg/mL	256 mg/mL	128 mg/mL	64 mg/mL	32 mg/mL	16 mg/mL
<b>H</b>	8 mg/mL	4 mg/mL	2 mg/mL	1 mg/mL	0,5 mg/mL						CE	CP

Fuente: Elaboración propia

#### **4.2.4. Método de Recuperación por contaminación directa.**

##### **1. Procedimiento para la recuperación por contaminación directa**

La prueba de recuperación por contaminación fue realizada en microplacas de 96 pozos estériles, de fondo en plano (Nunclon Surface). De manera general la distribución de las muestras se realizó teniendo en cuenta el diseño de la bandeja de microdilución (Tabla 5x). En los pozos correspondientes a las muestras (A1-D1, B2-D2), en los controles positivos de inóculo de la cepa a la concentración especificada (A12, B12, C12 y D12) y en los controles de esterilidad del medio Caldo Mueller Hinton (A11, B11, C11 y D11), se colocan:

##### **Para el caso de *Staphylococcus aureus*.**

- 50 µL del inóculo (suspensión microbiana de *Staphylococcus aureus* de concentración:  $5.2 \times 10^7$  UFC/mL,  $5.2 \times 10^6$  UFC/mL,  $5.2 \times 10^5$  UFC/mL y  $5.2 \times 10^4$  UFC/mL) (ejemplo para el pozo A1 será 50 µL de inóculo de *Staphylococcus aureus* de  $5.2 \times 10^7$  UFC/mL).
- 50 µL de concentración 100 mg/mL de la muestra de extracto hidroalcohólico.

##### **Para el caso de *Staphylococcus epidermidis*.**

- 50 µL del inóculo (suspensión microbiana de *Staphylococcus epidermidis* de concentración:  $1.5 \times 10^7$  UFC/mL,  $1.5 \times 10^6$  UFC/mL,  $1.5 \times 10^5$  UFC/mL y  $1.5 \times 10^4$  UFC/mL) (ejemplo para el pozo B1 será 50 µL de inóculo de *Staphylococcus aureus* de  $1.5 \times 10^7$  UFC/mL).
- 50 µL de concentración 100 mg/mL de la muestra de extracto hidroalcohólico.

##### **2. Incubación de la microplaca**

Las microplacas se incubaron a 37°C por 24 h para las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

### 3. Lectura y prueba de producción bacteriana.

La lectura del cultivo se hizo visualmente. Independientemente de la aparente turbidez o incoloro del pocillo de prueba se debe calcular la producción bacteriana que se recuperó después de haber estado en presencia de la muestra. La estimación bacteriana se realizó mediante un subcultivo de siembra por incorporación “pour plate” y se incubó a 37°C por 24 h para ambas cepas. El recuento obtenido en la lectura de las placas sembradas se tomó como el valor de la producción bacteriana en el extracto hidroalcohólico de la muestra. En la siguiente tabla se detalla la ubicación de los pocillos de prueba. Ver Tabla 02.

**Tabla 02.** Diseño de la bandeja de microdilución para la recuperación bacteriana.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	100 mg/mL	100 mg/mL									CE	CP
B	100 mg/mL	100 mg/mL									CE	CP
C	100 mg/mL	100 mg/mL									CE	CP
D	100 mg/mL	100 mg/mL									CE	CP
E												
F												
G												
H												

Fuente: Elaboración propia



#### 4.2.5. Resultados del Método de Microdilución en Microplaca.

##### A. Lectura y determinación de la CMI por el Método de Microdilución en Microplaca: *Staphylococcus epidermidis*.

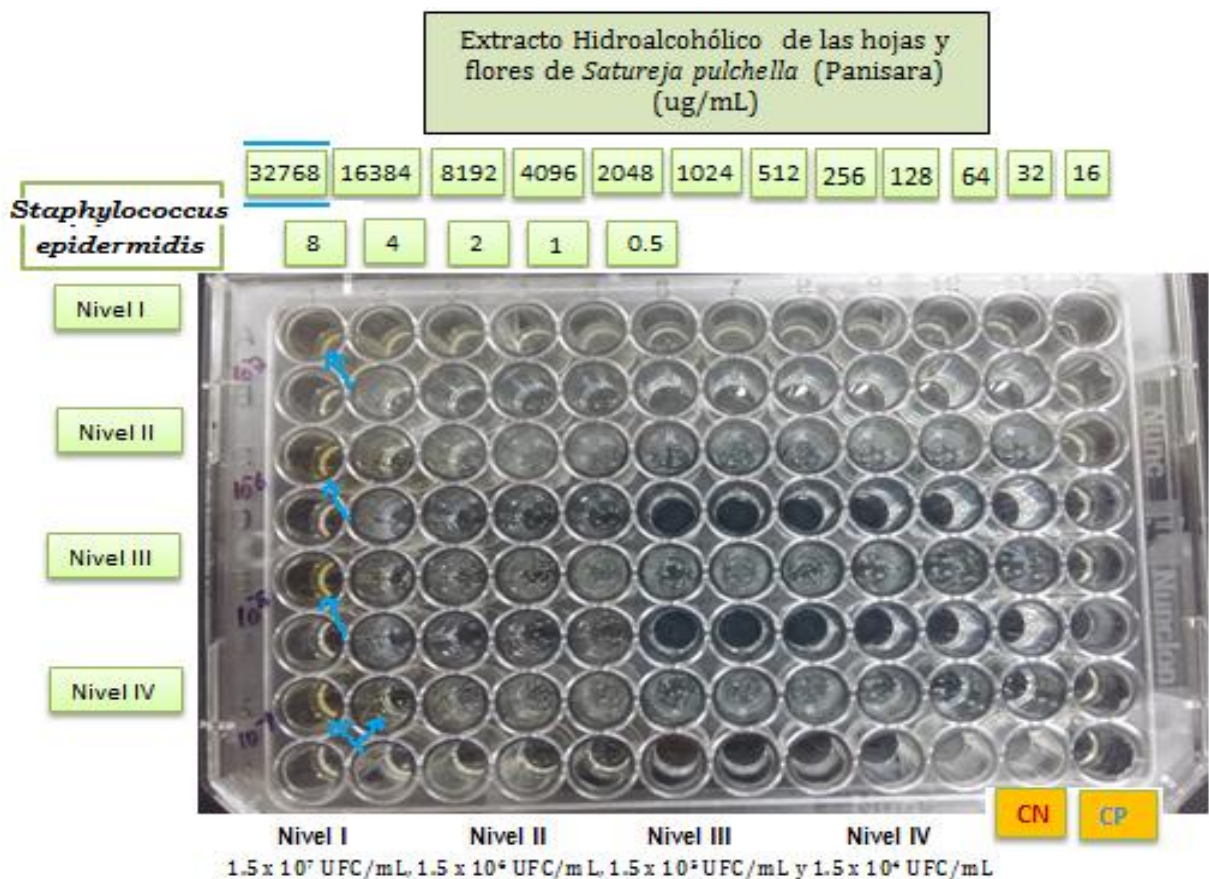
Los resultados de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método de microdilución de los extractos en estudio se presentan en la Tabla 03 y en las Figuras 07 y 08.

En la Tabla 03 y las figuras 07 y 08 se observa que con los extractos hidroalcohólico de la hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) evaluados, tienen para los 3 primeros niveles de concentración de la suspensión microbiana de *Staphylococcus epidermidis* una CMI igual a 32768 µg/mL; sin embargo del nivel IV se determinó la concentración Mínima Inhibitoria igual 16384 µg/mL. La tendencia de los resultados se muestran en la gráfica 01.

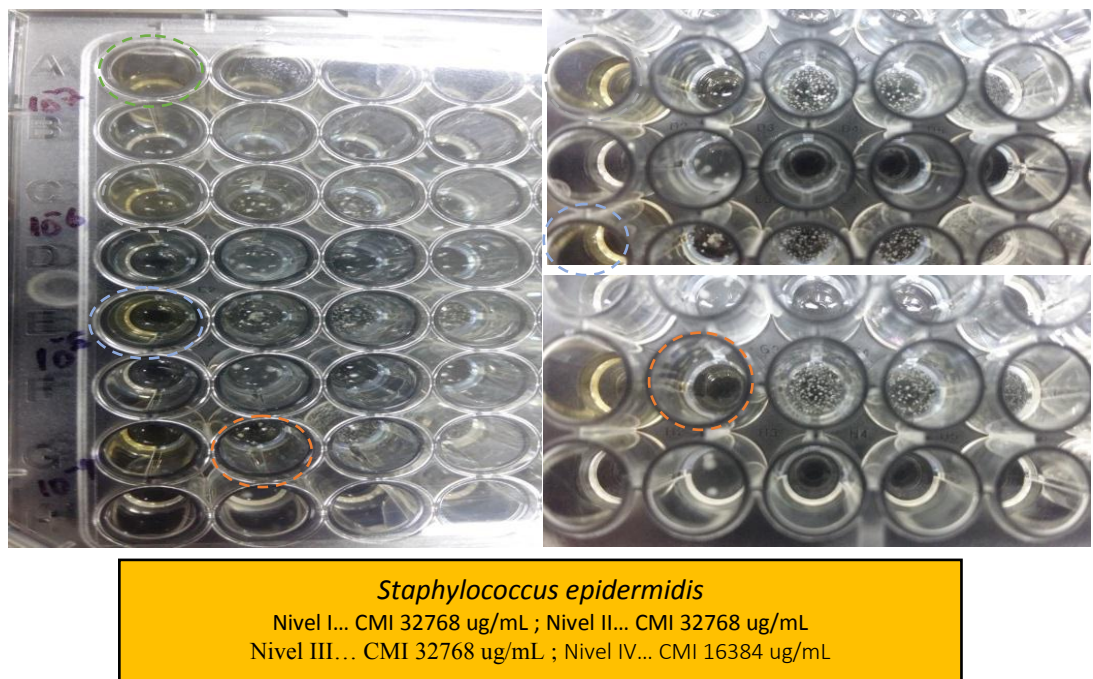
**Tabla 03.** Resultados de la CMI de las. 17 diferentes concentraciones contra los niveles de Inóculos de la cepa *Staphylococcus epidermidis*. Fuente: Elaboración propia

INÓCULO	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	CMI (ug/mL )	Lectura
Eritromicina + Inóculo	C. Positivo	4	Sin Crecimiento
Caldo Mueller Hinton + SSF 0.9%	C.Esterilidad	0	Sin Crecimiento
NIVEL I	$1.5 \times 10^7$ UFC/mL	32768	Sin Crecimiento
NIVEL II	$1.5 \times 10^6$ UFC/mL	32768	Sin Crecimiento
NIVEL III	$1.5 \times 10^5$ UFC/mL	32768	Sin Crecimiento
NIVEL IV	$1.5 \times 10^4$ UFC/mL	16384	Sin Crecimiento

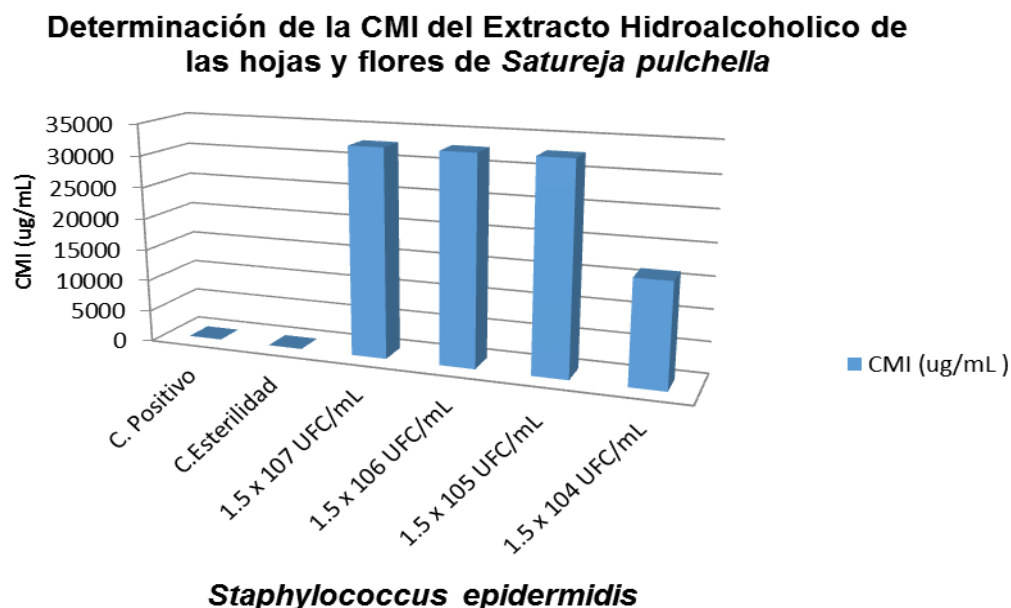
Fuente: Elaboración propia



**Figura 07.** Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los 17 extractos hidroalcohólico por el método de microdilución contra *Staphylococcus epidermidis*. Fuente: Elaboración propia.



**Figura 08.** Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los 17 extractos hidroalcohólico por el método de microdilución contra *Staphylococcus epidermidis*. Se observa en la imagen a la derecha el pocillo del inóculo de Nivel IV sin turbidez por lo que se determina el MIC igual a 16384 ug/mL. Fuente: Elaboración propia.



**Grafica 1.** Determinación del MIC de los extractos hidroalcohólicos de las hojas y flores de *Satureja pulchella* contra *Staphylococcus epidermidis*. Fuente: Elaboración propia.

## B. Lectura y determinación de la CMI por el Método de Microdilución en Microplaca: *Staphylococcus aureus*.

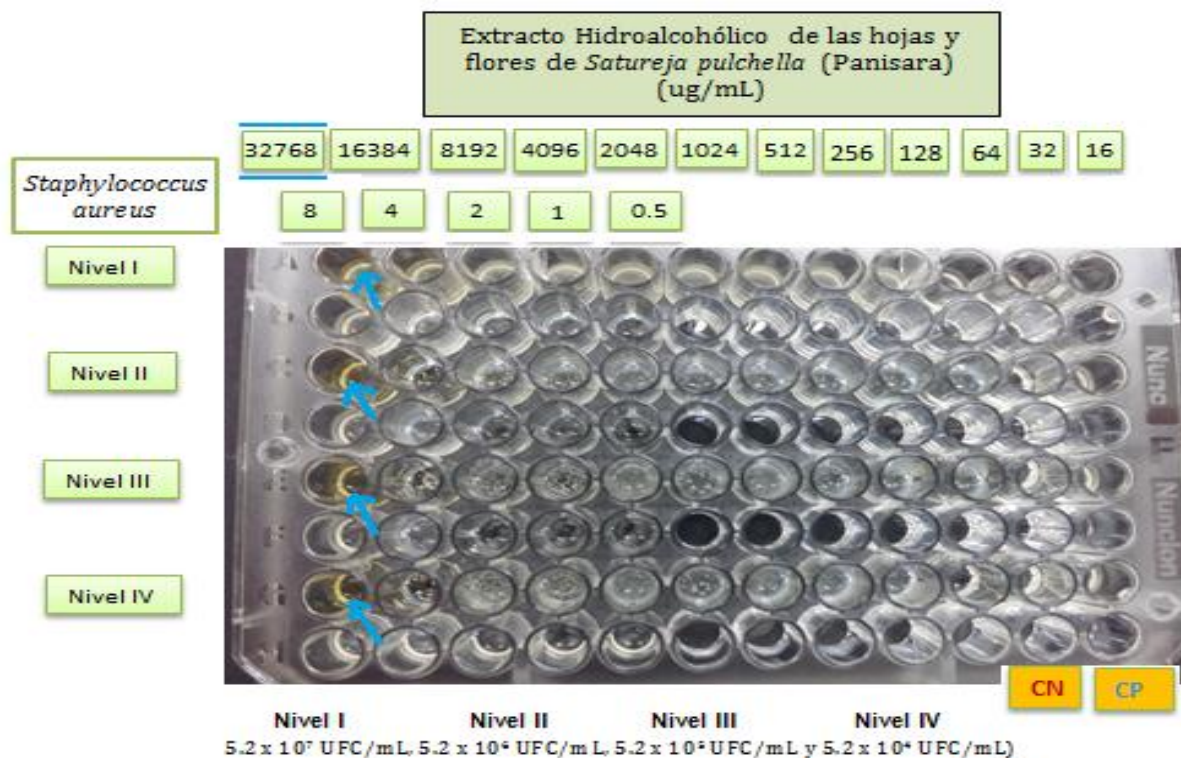
En la Tabla 04 y las figuras 09 y 10 se observa que con los extractos hidroalcohólico de la hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) evaluados, tienen para los 4 niveles de concentración de la suspensión microbiana de *Staphylococcus aureus* una Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) igual a 32768 µg/mL. La tendencia de los resultados se muestra en la gráfica 02.

**Tabla 04.** Resultados de la CMI de las 17 diferentes concentraciones contra los niveles de Inóculos de la cepa *Staphylococcus aureus*.

INÓCULO	<i>Staphylococcus aureus</i>	CMI (ug/mL )	Lectura
Eritromicina + Inóculo	C. Positivo	4	Sin Crecimiento
Caldo Mueller Hinton + SSF 0.9%	C.Esterilidad	0	Sin Crecimiento
NIVEL I	5.2 x 10 <sup>7</sup> UFC/mL	32768	Sin Crecimiento
NIVEL II	5.2 x 10 <sup>6</sup> UFC/mL	32768	Sin Crecimiento
NIVEL III	5.2 x 10 <sup>5</sup> UFC/mL	32768	Sin Crecimiento
NIVEL IV	5.2 x 10 <sup>4</sup> UFC/mL	32768	Sin Crecimiento

Fuente: Elaboración propia.





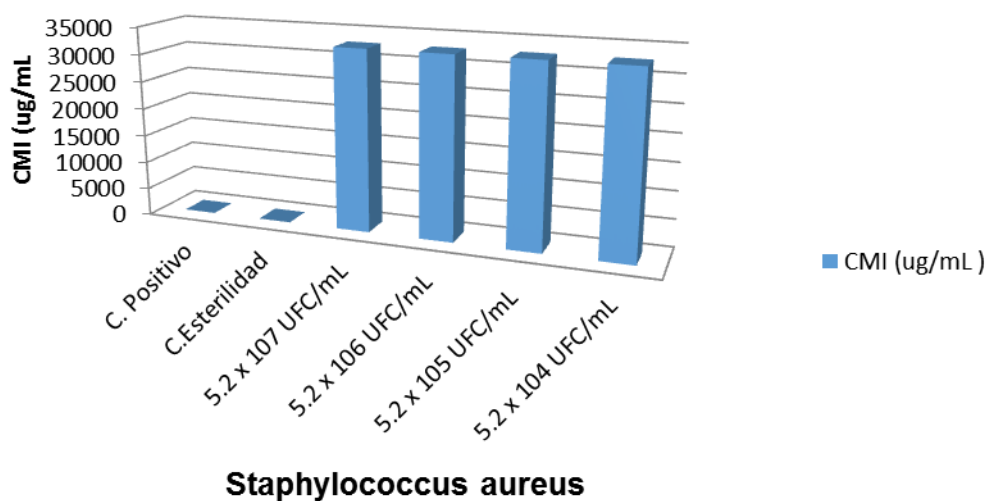
**Figura 09.** Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los 17 extractos hidroalcohólico por el método de microdilución contra *Staphylococcus aureus*. Fuente: Elaboración propia.



***Staphylococcus aureus***  
 Nivel I... CMI 32768 ug/mL ; Nivel II... CMI 32768 ug/mL  
 Nivel III... CMI 32768 ug/mL ; Nivel IV... CMI 32768 ug/mL

**Figura 10.** Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de los 17 extractos hidroalcohólico por el método de microdilución contra *Staphylococcus aureus*. Se observa en la imagen a la derecha los pocillos de los inóculos de Nivel II, II y IV sin turbidez por lo que se determina el MIC igual a 16384 ug/mL. Fuente: Elaboración propia.

### Determinación de la CMI del Extracto Hidroalcoholico de las hojas y flores de *Satureja pulchella*

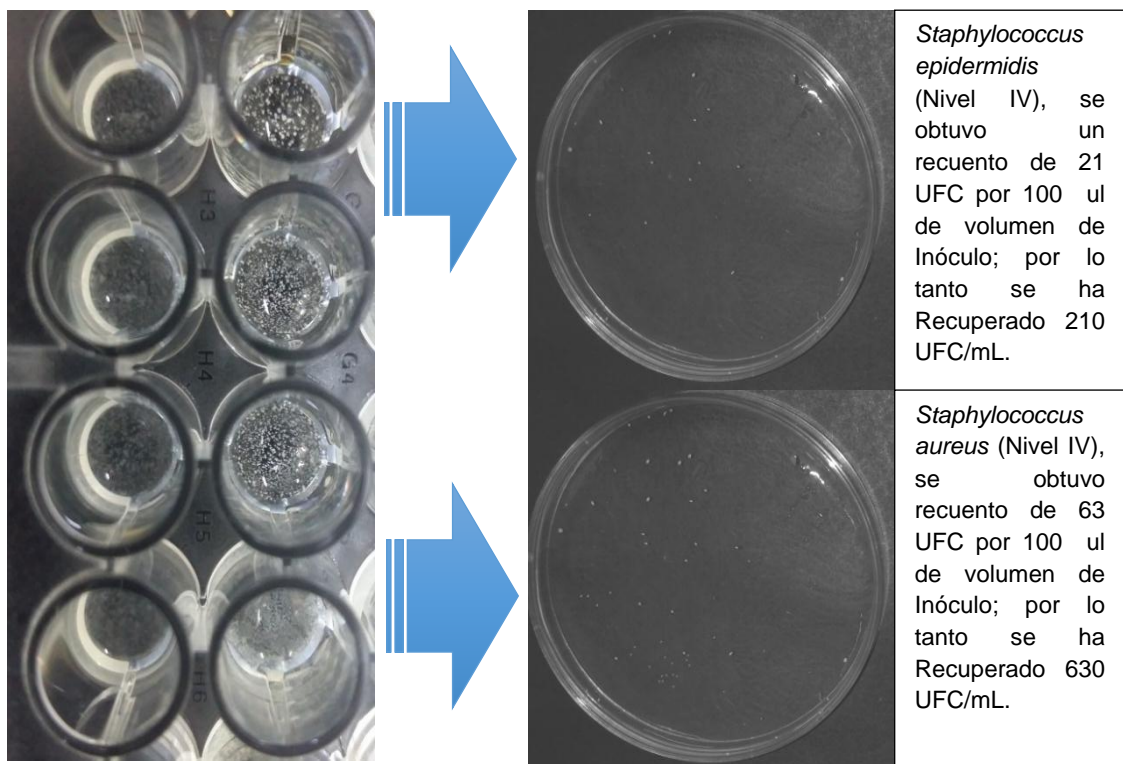


**Grafica 02.** Determinación del MIC de los extractos hidroalcohólicos de las hojas y flores de *Satureja pulchella* contra *Staphylococcus aureus*.

#### 4.2.6. Resultados del Método de Recuperación por contaminación.

##### **Lectura y resultados de la Producción Bacteriana por el Método de Recuperación por contaminación.**

En la lectura para ambas cepas de prueba se presentó crecimiento bacteriano, los pocillos de prueba se observan ligeramente turbios.



**Figura 11**

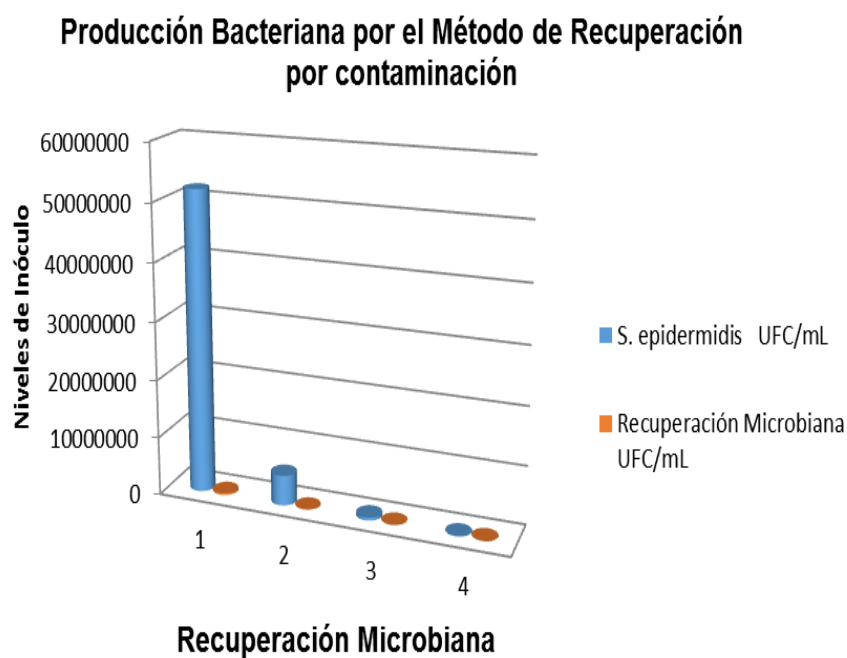
A la izquierda se observa los pocillos de prueba con una ligera turbidez que evidencia un resultado positivo cualitativo en el crecimiento de todos los niveles de los Inóculos de las cepas tanto de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. A la derecha los resultados cuantitativos del subcultivo del contenido del pocillo. Fuente: Elaboración propia.

## A. Lectura y resultados de la Producción Bacteriana por el Método de Recuperación por contaminación para *Staphylococcus epidermidis*.

**Tabla 05.** Los resultados cuantitativos obtenidos de la siembra del contenido de los pocillos de prueba con la cepa *Staphylococcus epidermidis*.

INÓCULO	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Recuperación Microbiana	Lectura
NIVEL I	$5.2 \times 10^7$ UFC/MI	$33 \times 10^4$ UFC/mL	Con Crecimiento
NIVEL II	$5.2 \times 10^6$ UFC/mL	$51 \times 10^3$ UFC/mL	Con Crecimiento
NIVEL III	$5.2 \times 10^5$ UFC/mL	$19 \times 10^2$ UFC/mL	Con Crecimiento
NIVEL IV	$5.2 \times 10^4$ UFC/mL	$21 \times 10$ UFC/mL	Con Crecimiento

Fuente: Elaboración propia.



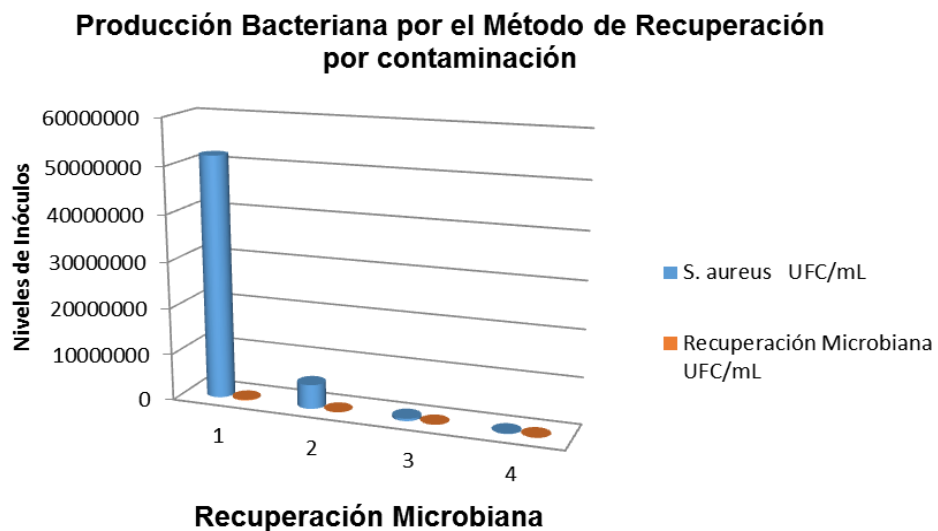
**Gráfica 03.** Producción bacteriana por el método de recuperación por contaminación con la cepa *Staphylococcus epidermidis*. Fuente: Elaboración propia.

**A. Lectura y resultados de la Producción Bacteriana por el Método de Recuperación por contaminación para *Staphylococcus aureus*.**

**Tabla 06.** Los resultados cuantitativos obtenidos de la siembra del contenido de los pocillos de prueba con la cepa *Staphylococcus aureus*.

INÓCULO	<i>Staphylococcus aureus</i>	Recuperación Microbiana	Lectura
NIVEL I	$1.5 \times 10^7$ UFC/mL	$17 \times 10^4$ UFC/mL	Con Crecimiento
NIVEL II	$1.5 \times 10^6$ UFC/mL	$24 \times 10^3$ UFC/mL	Con Crecimiento
NIVEL III	$1.5 \times 10^5$ UFC/mL	$12 \times 10^2$ UFC/mL	Con Crecimiento
NIVEL IV	$1.5 \times 10^4$ UFC/mL	$63 \times 10$ UFC/mL	Con Crecimiento

Fuente: Elaboración propia.



**Gráfica 04.** Producción bacteriana por el método de recuperación por contaminación con la cepa *Staphylococcus aureus*. Fuente: Elaboración propia.



#### 4.3. Prueba de hipótesis.

1. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) tienen efecto antimicrobiano en las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.
2. Existe actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) por el método de microdilución en microplacas para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC).
3. Existe actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) por el método de recuperación por contaminación directa.

#### 3.4. Discusión de resultados.

Los resultados de esta investigación comprueban las hipótesis propuestas. Se afirma que hay actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, demostrando así que los resultados ratifican las descritas por otros investigadores de manera confiable.

En el Screening fitoquímico o Tamizaje fitoquímico de las hojas y flores de la *Satureja pulchella* (Panisara), se encontró alcaloides, flavonoides y compuestos fenólicos que corroboran lo propuesto en; Journal of Acupuncture and Meridian Studies, Review article; A Critical Overview on the Pharmacological and Clinical Aspects of Popular *Satureja* Species. Fereshteh Jafari, Fatemeh Ghavidel, Mohammad M. Zarshenas.

Asimismo, se evidencia que la Panisara posee aceites esenciales conformadas por la presencia de: terpenos como la pulegona cimeno, carvacrol, acetato de bornilo y pineno, los cuales sinergizan con los anteriores metabolitos para garantizar la actividad antimicrobiana. Lo cual contrasta con lo propuesto en la revista de investigación de la UNMSM, Composición química, actividad antioxidante y toxicidad aguda del aceite esencial de *Satureja pulchella* "Panizara", Mario Carhuapoma Yance, Sofía López G., Félix Veliz LM., Luis Inostrosa R., Ricardo Yuli P., Norma Carlos C.

Se determinó en el extracto hidroalcohólicos de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara), que mostraron actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* de suspensión de inóculos de nivel I, II, III y IV (CMI= 32768 µg/mL). Si bien no se ha encontrado alguna referencia sobre el reporte de resultados similares con el presente estudio; solo se ha encontrado resultados de Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Satureja pulchella* (Panisara) en Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 a las concentraciones de 25%, 50%, 75% con un promedio de halos de inhibición de 14,88mm, 23.97 mm, 27.87 mm respectivamente determinado por el método de Bauer-Kirby llamada también método de difusión de disco. Esta información si bien ambos resultados no se correlación del todo por metodologías distintas, solo confirma que existe actividad antibacteriana a ciertas concentraciones evaluadas del extracto hidroacohólico desarrollado. Propuesto en la tesis Actividad antibacteriana del aceite esencial panizara (*Satureja pulchella*) sobre *Staphylococcus aureus* 2016, Cotrina Jorge, Franco Joel.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en microplaca, en donde el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) presentó un CMI =32768 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 en los 4 niveles de concentración (I=5,2 x 10<sup>7</sup>UFC/mL; II=5,2 x 10<sup>6</sup> UFC/mL; III=5,2 x 10<sup>5</sup> UFC/mL y IV=5,2 x 10<sup>4</sup> UFC/mL), un CMI = 16384 µg/mL para *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 en los 3 niveles de concentración (I=1,5 x

107UFC/mL; II=1,5 x 10<sup>6</sup> UFC/mL y III=1,5 x 10<sup>5</sup> UFC/mL), y un CMI = 16384 µg/mL para *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 en el nivel de concentración IV (1,5 x 10<sup>4</sup> UFC/mL). Estos altos rangos de MICs obtenidos para ambas especies de bacterias evaluadas se correlacionan con los altos rangos de MICs del extracto hidroalcohólico de *Satureja khuzestanica* en cepas de *Cryptococcus neoformans* isolates (CMI en el rango de 62,5 - 2000mg / mL), determinados por Zarrin, M., Amirrajab, N., & Sadeghi-Nejad, B. (2010). *In vitro* antifungal activity of *Satureja khuzestanica* Jamzad against *Cryptococcus neoformans*. Pak J Med Sci, 26(4), 880. 2010 pakistan.

Por otro lado los resultados de la producción bacteriana por el método de recuperación por contaminación directa frente a concentraciones muy altas (100 mg/mL) del extracto hidroalcohólico de *Satureja pulchella* (Panisara), se encontró una reducción logarítmica de las concentraciones iniciales (Nivel I= 5.2 x 10<sup>7</sup> UFC/mL; Nivel II= 5.2 x 10<sup>6</sup> UFC/mL; Nivel III= 5.2 x 10<sup>5</sup> UFC/mL y Nivel IV= 5.2 x 10<sup>4</sup> UFC/mL) a concentraciones finales (Nivel I= 33 x 10<sup>4</sup> UFC/mL; Nivel II= 51 x 10<sup>3</sup> UFC/mL; Nivel III= 19 x 10<sup>2</sup> UFC/mL y Nivel IV= 21 x 10<sup>1</sup> UFC/mL), en *Staphylococcus epidermidis* y una reducción logarítmica de las concentraciones iniciales (Nivel I= 1,5 x 10<sup>7</sup> UFC/mL; Nivel II= 1,5 x 10<sup>6</sup>UFC/mL; Nivel III= 1,5 x 10<sup>5</sup> UFC/mL y Nivel IV= 1,5 x 10<sup>4</sup> UFC/mL) a concentraciones finales (Nivel I= 17 x 10<sup>4</sup> UFC/mL; Nivel II= 24 x 10<sup>3</sup> UFC/mL; Nivel III= 12x 10<sup>2</sup> UFC/mL y Nivel IV= 63 x 10<sup>1</sup> UFC/mL) en *Staphylococcus aureus*. Haciendo un contraste con un estudio realizado al evaluar la producción bacteriana *in vitro* del Sugammadex (100 mg/ mL) contaminado con *Staphylococcus aureus*, donde se observó que si hubo crecimiento bacteriano sin cambios logarítmicos, demostrando que el Sugammadex no tienen propiedades antimicrobianas. Dicha conclusión nos permite a partir de nuestros resultado confirmar que el extracto hidroalcohólico de *Satureja pulchella* (Panisara) si presentó propiedad antimicrobiana contra el crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*. Volkan Hanci, Ahmet Vural, Sevgi Yılmaz Hanci, Hasan Ali Kiraz, Dilek Ömür y Ahmet Ünver. Evaluación in vitro de las

características antimicrobianas del sugammadex. Rev Bras Anesthesiol. 2014;64(2):105---108.

En el estudio de la evaluación antimicrobiana usando la metodología recuperación por contaminación, los resultados obtenidos para la concentración del extracto de 100 mg/mL frente a las cepa de *Staphylococcus aureus* de concentraciones de inóculos de niveles I, II, III y IV de recuperación  $17 \times 10^4$  UFC/mL,  $24 \times 10^3$  UFC/mL,  $12 \times 10^2$  UFC/mL y  $63 \times 10$  UFC/mL respectivamente (Ver Tabla 7) indican que hay una progresiva correlación de la disminución del logaritmo de la concentración de los niveles de concentración evaluados. Del mismo modos sucede con la cepa *Staphylococcus epidermidis* de concentraciones de inóculos de niveles I, II, III y IV de recuperación  $33 \times 10^4$  UFC/mL,  $51 \times 10^3$  UFC/mL,  $19 \times 10^2$  UFC/mL y  $21 \times 10$  UFC/mL respectivamente (Ver Tabla 6). Para ambos resultados no existe alguna referencia con los mismos reportes que nos permitan correlacionar resultados y verificar si existen algunas diferencias significativas habiendo usado los mismos métodos. De lo mencionado anteriormente podemos encontrar que si puede haber crecimiento bacteriano frente a concentraciones muy altas (100 mg/mL) del extracto hidroalcohólico de *Satureja pulchella* (Panisara), por lo que se evidencia que actividad antibacteriana se encuentra algo limitada.

Asimismo este método de microdilución en microplaca para *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, se utilizó el mismo método, sin embargo los resultados obtenidos no guardan relación con los rangos intermedios de MICs del extracto etanólico de las hojas de *Prosopis pallida* (CMI =  $1000 \mu\text{g/mL}$  frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y un CMI =  $62,5 \mu\text{g/mL}$  para *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228). Cardenas Camacho, C. O. R. (2017). Actividad antimicrobiana y antioxidante del extracto etanólico de *Prosopis pallida* “algarrobo”. 2017 tesis peru <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/5857>.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en microplaca para *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus*

*epidermidis*, se utilizó el mismo método, sin embargo los resultados obtenidos no guardan relación del extracto hidroalcohólico de la semilla *Prosopis juliflora* (CMI =312 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus* y un CMI = 78 µg/mL para *Staphylococcus epidermidis* ) Tajbakhsh S, Barmak A, Vakhshiteh F, Gharibi M. In vitro Antibacterial Activity of the Prosopis Juliflora Seed Pods on Some Common Pathogens. J Clin Diagn Res. 2015; 9(8): DC13-5 india

Los resultados obtenidos de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) por el método de microdilución en microplaca frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*; se hizo a partir de 17 concentraciones finales del extracto hidroalcohólico, se usó la misma técnica de dilución en solución salina 0,9% con la finalidad de poder contar con un amplio espectro de opciones para determinar con mayor posibilidad rango de MICs, propuesta en la Revista Brasileira de Anestesiologia del artículo científico; Evaluación *in vitro* de las características antimicrobianas del sugammadex.

## CAPÍTULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1. Conclusiones.

1. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) son los alcaloides, flavonoides y compuestos fenólicos.
2. Si existe actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) por el método de microdilución en microplacas para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC).
3. Si existe actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) por el método de recuperación por contaminación directa.

#### 5.2. Recomendaciones.

1. Se recomienda aplicar el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (Panisara) en el método de difusión de discos o método de Bauer-Kirby o llamada también método de difusión de disco para encontrar una correlación con los resultados obtenidos por el método de microdilución basándose en la referencia CLSI.
2. Por la capacidad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de la *Satureja pulchella* (Panisara), obtenida a través de los métodos de microdilucion y recuperación se recomienda formular un nuevo antibiótico de origen natural en beneficio de la población.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Del Campo, M. Pervivencia de los remedios vegetales tradicionales americanos en la terapéutica española actual. [Tesis de licenciatura en internet]. UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID; 2014 [citada 12 dic 2016]. Recuperado de <http://eprints.ucm.es/24963/1/T35261.pdf>
2. Jean B. et al. Clinical and laboratory standards institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Document m100-s15. wayne, pa: Clinical and laboratory standards institute; 2015 vol 35. USA.
3. Cotrina Jorge, Franco Joel. Actividad antibacteriana del aceite esencial panizara (satureja pulchella) sobre staphylococcus aureus 2016. [tesis de licenciatura en internet]. Universidad alas peruanas (UAP); 2016 [citada 12 dic 2016]. Perú. Recuperado de [http://repositorio.uap.edu.pe/bitstream/uap/2738/2/COTRINA\\_JORGE-Resumen.pdf](http://repositorio.uap.edu.pe/bitstream/uap/2738/2/COTRINA_JORGE-Resumen.pdf)
4. Díaz Uribe, Julio Luis. "ESTRUCTURA QUÍMICA DEL EXTRACTO ACUOSO Y ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE Tagetes elliptica Sm. "Chincho", ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA EN LA APLICACIÓN DE UN ALIMENTO ANDINO." [tesis de Maestría en internet]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2014. [citada 12 dic 2016]. Perú.
5. Ruiz Quiroz, Julio Reynaldo. Actividad Antifungica In Vitro y Concentración Mínima Inhibitoria mediante Microdilución de ocho plantas medicinales. [tesis de Maestría en internet]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013. [citada 12 dic 2016]. Perú. Recuperado de [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/2590/1/Ruiz\\_qj.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/2590/1/Ruiz_qj.pdf)
6. Carhuapoma Yance, Mario. Composición química, actividad anti-Helicobacter pylori y antioxidante del aceite esencial de Satureja brevicalyx. [tesis de Doctorado en internet]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007. [citada 12 dic 2016]. Perú. Recuperado de [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/cybertesis/788/Carhuapoma\\_ym%282%29.pdf?sequence=1](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/xmlui/bitstream/handle/cybertesis/788/Carhuapoma_ym%282%29.pdf?sequence=1)
7. Marilú Roxana Soto Vásquez, Karina Soto Vásquez, Alejandra Serrano Bringas. Metabolitos secundarios y efecto antibacteriano in vitro del

- extracto hidroetanólico de las flores de *Cantua buxifolia* Juss. ex Lam. (Polemoniaceae) “Flor Sagrada de los Incas”; 2014. [citada 12 dic 2016]. Perú.
8. <sup>1</sup>Mendoza Yamashiro, Luisa Yrene. Efecto del aceite esencial de *Satureja pulchella* sobre el crecimiento de *Escherichia Coli* y *Bacillus cereus*. [tesis de Licenciatura en internet]. Universidad Nacional de Trujillo; 2015 [citada 12 dic 2016]. Recuperado de <http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/4574/Mendoza%20Yamashiro%2c%20Luisa%20Yrene.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
  9. Lizcano Ramón, Andrea Jimena y Vergara Gonzales, Jenny Lisseth. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. [tesis de Licenciatura en internet]. Pontificia Universidad Javeriana; 2008 [citada 12 dic 2016].
  10. Giraldo Quintero, Sara Emilia. Aislamiento e identificación de metabolitos activos sobre el sistema nervioso central obtenidos de *Valeriana pavonii*. [tesis de Doctorado en internet]. Universidad Nacional de Colombia; 2010 [citada 12 dic 2016]. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/8644/1/192810.2010.pdf>
  11. Sánchez Troncoso, M. Estudio de la técnica de microdilución en caldo para determinar la susceptibilidad a Clotrimazol y Fluconazol en dermatofitos, basándose en el documento m38-p de nccls. [tesis de Maestría en internet]. Universidad Talca; 1950 [citada 12 dic 2016]. Recuperado de [http://dspace.utalca.cl/bitstream/1950/4112/1/sanchez\\_troncoso\\_m.pdf](http://dspace.utalca.cl/bitstream/1950/4112/1/sanchez_troncoso_m.pdf)
  12. Instituto Superior de Educación Publico Huaraz. Panisara; 2015 [citada 12 dic 2016]. Recuperado de <http://pmedicinal.webcindario.com/eve/panisara.html>
  13. Tropicos. *Satureja hortensis* L.; 2017 [citada 12 dic 2016]. Recuperado de <http://www.tropicos.org/Name/17600323>
  14. Instituto Superior de Educación Publico Huaraz. Panisara; 2015 [citada 12 dic 2016]. Recuperado de <http://pmedicinal.webcindario.com/eve/panisara.html>



15. Esacademic. *Satureja hortensis*; 2017 [citada 12 dic 2016]. Recuperado de <http://www.esacademic.com/dic.nsf/eswiki/52140>
16. Verdicina: El Perú y su diversidad de medicina floral. Panizara; 2017. Recuperado el 14 de diciembre del 2017. Recuperado de <https://www.facebook.com/verdicinainvestigacion/photospcb.276246392879795/276246046213163/?type=3>
17. Durango. *Metabolitos Secundarios*. Universidad de Antioquia; 2009. Recuperado el 14 de diciembre del 2017. Recuperado de <https://es.scribd.com/document/137122672/Metabolitos-secundarios-1>
18. Adolfo Ávalos García. Elena Pérez-Urria Carril. *Metabolismo secundario de plantas*. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145, 2009 ISSN: 1989-3620. Recuperado de [http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo\\_secundario\\_de\\_plantas.pdf](http://eprints.ucm.es/9603/1/Metabolismo_secundario_de_plantas.pdf)
19. Instituto Superior de Educación Publico Huaraz. Panisara; 2015. Recuperado el 14 de diciembre del 2017. Recuperado de <http://pmedicinal.webcindario.com/eve/panisara.html>
20. Gonzalez Villa, Angela Andrea. *Obtención de aceites esenciales y extractos etanolicos de plantas del amazonas*; 2004. Recuperado el 14 de diciembre del 2017. Recuperado de <http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandreagonzalezvilla.2004.pdf>
21. Quispillo J. "Separación, purificación y posible identificación de metabolitos secundarios del escobillón rojo (*callistemon speciosus*)" [tesis]; 2013. Ecuador
22. Barreto J. *Evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas de los extractos en petrol y en etanol de hojas y corteza de la planta Bursera tomentosa*; 2009. Colombia
23. Sampieri, R, Fernández, C, Baptista, P. *Metodología de la investigación*. (5ta. ed.). D.F., México: McGraw Hill. 2010.

## **ANEXOS**

# ANEXO 1: MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO: "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA IN VITRO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE LAS HOJAS Y FLORES DE SATUREJA PULCHELLA (PANISARA) EN CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS"						
PROBLEMA GENERAL:	OBJETIVOS GENERAL:	HIPÓTESIS GENERAL:	VARIABLES VI:	DIMENSIONES VI:	INDICADORES VI:	SUB INDICADORES
¿Cómo evaluar la actividad antimicrobiana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de Satureja pulchella (Panisara) en cepas de Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis?	Evaluar la actividad antimicrobiana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de Satureja pulchella (Panisara) en cepas de Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis	El extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de Satureja pulchella (Panisara) poseen efecto antimicrobiano en cepas de Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis	Extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de Satureja pulchella (Panisara)	Concentración	Diferentes diluciones del extracto hidroalcohólico	-32768 ug/mL -16384 ug/mL -8192 ug/mL -4096 ug/mL -2048 ug/mL -1024 ug/mL -512 ug/mL -256 ug/mL -0.5 ug/mL
						Diámetro Experimental Tipo: Anélico, experimental, observacional, exploratorio y descriptivo.
<b>ESPECÍFICOS:</b>	<b>ESPECÍFICOS:</b>	<b>ESPECÍFICOS:</b>	<b>VD:</b>	<b>VD:</b>	<b>VD:</b>	<b>Nivel:</b> Descriptivo Población: Las cepas de Staphylococcus aureus ATCC 6538 y Staphylococcus epidermidis ATCC 12228
1. ¿Qué metabolitos secundarios están presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de Satureja pulchella (Panisara)?	1. Determinar que metabolitos secundarios están presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de Satureja pulchella (Panisara)	1. Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de Satureja pulchella (Panisara) pueden tener efecto antimicrobiano en las cepas de Staphylococcus aureus y Staphylococcus epidermidis	Actividad antimicrobiana en cepas de Staphylococcus aureus	A) Variación de colores (Método de microdilución) B) Recuento de colonias (Método de contaminación directa)	Positivo: Incoloro Mayor 32768 ug/ml Negativo: Coloreado Menor 16384	5.2 x 107 UFC/mL -5.2 x 106 UFC/mL -5.2 x 105 UFC/mL -5.2 x 104 UFC/mL
2. ¿Existe actividad antimicrobiana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de Satureja pulchella (Panisara) por el método de microdilución en microplacas para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC)?	2. Determinar la actividad antimicrobiana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de Satureja pulchella (Panisara) por el método de microdilución en microplacas para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC).	2. Existe actividad antimicrobiana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de Satureja pulchella (Panisara) por el método de microdilución en microplacas para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC).	Actividad antimicrobiana en cepas de Staphylococcus epidermidis	A) Variación de colores (Método de microdilución) B) Recuento de colonias (Método de contaminación directa)	Positivo: Incoloro Mayor 16384 Menor 8192 ug/ml Negativo: Coloreado Positivo Crecimiento Mayor 19 UFC	1.5 x 107 UFC/mL -1.5 x 106 UFC/mL -1.5 x 105 UFC/mL -1.5 x 104 UFC/mL
3. ¿Existe la actividad antimicrobiana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de Satureja pulchella (Panisara) por el método de recuperación por contaminación directa?	3. Determinar la actividad antimicrobiana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de Satureja pulchella (Panisara) por el método de recuperación por contaminación directa.	3. Existe actividad antimicrobiana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de Satureja pulchella (Panisara) por el método de recuperación por contaminación directa.				Muestra: El extracto hidroalcohólico de las flores y hojas de Satureja pulchella en diferentes concentraciones. Técnicas: Método de microdilución Método de recuperación por contaminación
						Instrumento: Rotavapor

## ANEXO 2: CARTA DE AUTORIZACION



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA

Servicio de Control de Calidad

Lima, 21 de Junio del 2017

Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

S.D.

Mediante la presente se pone en conocimiento lo siguiente:

La Bachiller **Srta. Chipa Ávila, Rocío Mishel y Ruiz Alvarado, Catherin Ronné**, egresada de la facultad de ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas de la prestigiosa Universidad Inca Garcilaso de la Vega; está haciendo su tesis de Investigación en "Evaluación de la Actividad Antimicrobiana del Extracto Hidroalcoholico de las Hojas y Flores de la Especie Vegetal *Satureja pulchella* (PANISARA) frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*" en los laboratorios del Servicio de Control de Calidad de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

Se expide este documento para fines pertinentes.

Atentamente,

Universidad Peruana Cayetano Heredia  
Servicio de Control de Calidad

Q.F. Erik Olivar Gallegos  
CQFP: 20522

**Q.F. ERIK OLIVAR GALLEGOS**  
Coordinador de Aseguramiento de la Calidad

UNIVERSIDAD ACREDITADA INTERNACIONALMENTE CON MENCIÓN ESPECIAL EN  
INVESTIGACIÓN

Av. Honorio Delgado N° 430, Urb. Ingeniería, San Martín de Porres / P.O. Box 4314, Lima 100  
Directo: (511) 483-2188 / Central: (511) 319-0000 anexos: 2424 ó 2427 / Fax: (511) 382-0321  
e-mail: [control.calidad@oficinas-upch.pe](mailto:control.calidad@oficinas-upch.pe) / [leon.villegas@upch.pe](mailto:leon.villegas@upch.pe)  
Página Web: [www.upch.pe](http://www.upch.pe)



### ANEXO 3: CERTIFICACION BOTANICA DE LA PLANTA “Satureja pulchella”



#### CERTIFICACION BOTANICA

El profesional que suscribe certifica que la muestra vegetal identificada es la planta *Satureja pulchella* L. (Panizara) y cumple con la siguiente Clasificación Taxonómica:

##### Clasificación Taxonómica

Reino	Plantae
Sub reino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Sub familia	Nepetoideae
Tribu	Mentheae
Género	Satureja
Especie	<i>Satureja pulchella</i> L.
N. común	Panizara

Se expide el presente para los fines pertinentes.

A blue ink signature is written over a circular official stamp. The stamp contains the text 'Universidad Peruana Cayetano Heredia' and 'Servicio de Control de Calidad'. The signature is in blue ink and appears to be 'Dr. [illegible]'. The stamp also includes the text 'Calle [illegible]' and 'Lima [illegible]'. The date '2019' is visible at the bottom of the stamp.

## ANEXO 4: INFORME DE ENSAYO



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

Servicio de Control de Calidad

### INFORME DE ENSAYO

Producto : Extracto de Producto Natural (*Satureja Pulchella* (panisara))  
Presentación : Frasco de 200 mL  
Análisis Solicitado : Screening Fitoquímico  
Fecha de Análisis : 2017-03-15

#### Resultado de Análisis del Screening Fitoquímico

Identificación de Metabolitos Secundarios		
Metabolitos secundarios	Reactivo de identificación	Forma de reconocimiento
Alcaloides	Drangerdorff	Precipitado rojo o naranja
	Wagner	Precipitado marrón
	Sonneschein	Precipitado naranja
	Mayer	Precipitado blanco
Compuestos fenólicos	Cloruro ferrico	Tono azul
Flavonoides	Shinoda	Tonos rojos

Universidad Peruana Cayetano Heredia  
Servicio de Control de Calidad  
  
Q.F. Erik Olivar Gallegos  
COSP: 20522

**Q.F. ERIK OLIVAR GALLEGOS**  
Coordinador de Aseguramiento de la Calidad


UNIVERSIDAD ACREDITADA INTERNACIONALMENTE CON MENCIÓN ESPECIAL EN  
INVESTIGACIÓN

Av. Honorio Delgado N° 430, Urb. Ingeniería, San Martín de Porres / P.O. Box 4314, Lima 100  
Directo: (511) 483-2188 / Central: (511) 316-0000 anexo 2424 y 2425 / Fax: (511) 483-2189

## ANEXO 5: CERTIFICADO DE ANALISIS DEL STAPHYLOCOCCUS AUREUS



### Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> Staphylococcus aureus subsp. aureus <b>Catalog Number:</b> 0485 <b>Lot Number:</b> 485-271 <b>Reference Number:</b> ATCC® 6538™ <sup>+</sup> <b>Purity:</b> < 0.1% Total Pellet CFU <b>Mean Assay Value:</b> 5.2E+07 CFU per pellet <b>Passage from Reference:</b> 4	<b>Expiration Date:</b> 2017/3/31 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Jennifer Holub <b>Release Date:</b> 2015/4/23				
<p style="text-align: center;"><b>Performance</b></p> <table border="0"> <tr> <td style="vertical-align: top;"> <b>Macroscopic Features:</b>            Medium to large, convex, circular, glistening, smooth, creamy, opaque, beta hemolytic - both light gold and darker gold colonies may be present.         </td> <td style="vertical-align: top;"> <b>Medium:</b>            SBAP         </td> </tr> <tr> <td style="vertical-align: top;"> <b>Microscopic Features:</b>            Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters.         </td> <td style="vertical-align: top;"> <b>Method:</b>            Gram Stain (1)         </td> </tr> </table>		<b>Macroscopic Features:</b> Medium to large, convex, circular, glistening, smooth, creamy, opaque, beta hemolytic - both light gold and darker gold colonies may be present.	<b>Medium:</b> SBAP	<b>Microscopic Features:</b> Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters.	<b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>Macroscopic Features:</b> Medium to large, convex, circular, glistening, smooth, creamy, opaque, beta hemolytic - both light gold and darker gold colonies may be present.	<b>Medium:</b> SBAP				
<b>Microscopic Features:</b> Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters.	<b>Method:</b> Gram Stain (1)				
<b>ID System:</b> Vitek GP (1) See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma-tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative  <div style="text-align: center;">               Brad Goskowitz, President              AUTHORIZED SIGNATURE           </div>				

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

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

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.

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

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

TESTING CERT #2655.01

bioMérieux Customer: 05871  
System #: C21105

## Laboratory Report

Printed Apr 23, 2015 09:27 CDT  
Printed by: jrh  
Report Version: 1 of 1

Isolate Group: 485271-1

Bench: JH

Card Type: GP Testing Instrument: 00000A6D6328 (1116)

Bionumber: 010402062561231

Organism Quantity:

Comments:	

Identification Information	Card: GP	Lot Number: 242344040	Expires: May 15, 2016 13:00 CDT
	Completed: Apr 22, 2015 17:28 CDT	Status: Final	Analysis Time: 4.00 hours
Selected Organism	99% Probability Staphylococcus aureus		
	Bionumber: 010402062561231		Confidence: Excellent identification
SRF Organism			
Analysis Organisms and Tests to Separate:			
Analysis Messages:			
Contraindicating Typical Biopattern(s)			

Biochemical Details																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	-	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	+
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	+
38	dRIB	-	39	ILATk	+	42	LAC	-	44	NAG	+	45	dMAL	-	46	BACI	+
47	NOVO	-	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	-	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

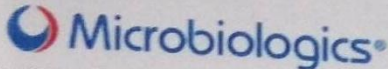
Installed VITEK 2 Systems Version: 07.01  
MIC Interpretation Guideline:  
AES Parameter Set Name:


Therapeutic Interpretation Guideline:  
AES Parameter Last Modified:



## ANEXO 6: CERTIFICADO DE ANALISIS DEL STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS

CP-025

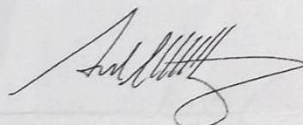





(5)

**Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release**

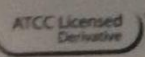

<p><b>Specifications</b></p> <p>Microorganism Name: Staphylococcus epidermidis          Catalog Number: 0371(CRM)          Lot Number: 371-157          Reference Number: ATCC® 12228™          Purity: &lt; 0.1% Total Pellet CFU          Recovery: &gt; 1000 CFUs per Pellet          Passage from Reference: 1</p>	<p><b>Expiration Date:</b> 2017/11/30  <b>Release Information:</b>          Quality Control Technologist: Marie M Howe          Release Date: 2016/1/18</p>
--	---

<p><b>Macroscopic Features:</b>          Two colony types; small to medium, circular, convex, entire edge, smooth, SBAP glistening; one type is white and the other is gray to translucent.</p> <p><b>Microscopic Features:</b>          Gram positive cocci usually in pairs and tetrads.</p> <p><b>ID System:</b> Vitek GP (1)          See attached ID System results document.</p>	<p><b>Performance</b></p> <p><b>Medium:</b>          SBAP</p> <p><b>Method:</b>          Gram Stain (1)</p> <p><b>Other Features/ Challenges: Results</b>          (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive          (1) Coagulase (rabbit plasma-tube): negative</p> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">               Brad Goscawicz, President              AUTHORIZED SIGNATURE         </div>
--	--

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.  
 Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.  
 Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.  
 Individual products are traceable to a recognized culture collection.



REFERENCE MATERIAL PRODUCER  
CERT #2655.02

TESTING CERT #2655.01

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

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

(5) Microbiologics has determined each pellet of this reference material to be sufficiently homogeneous for its intended use.

© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303

Page 1 of 1

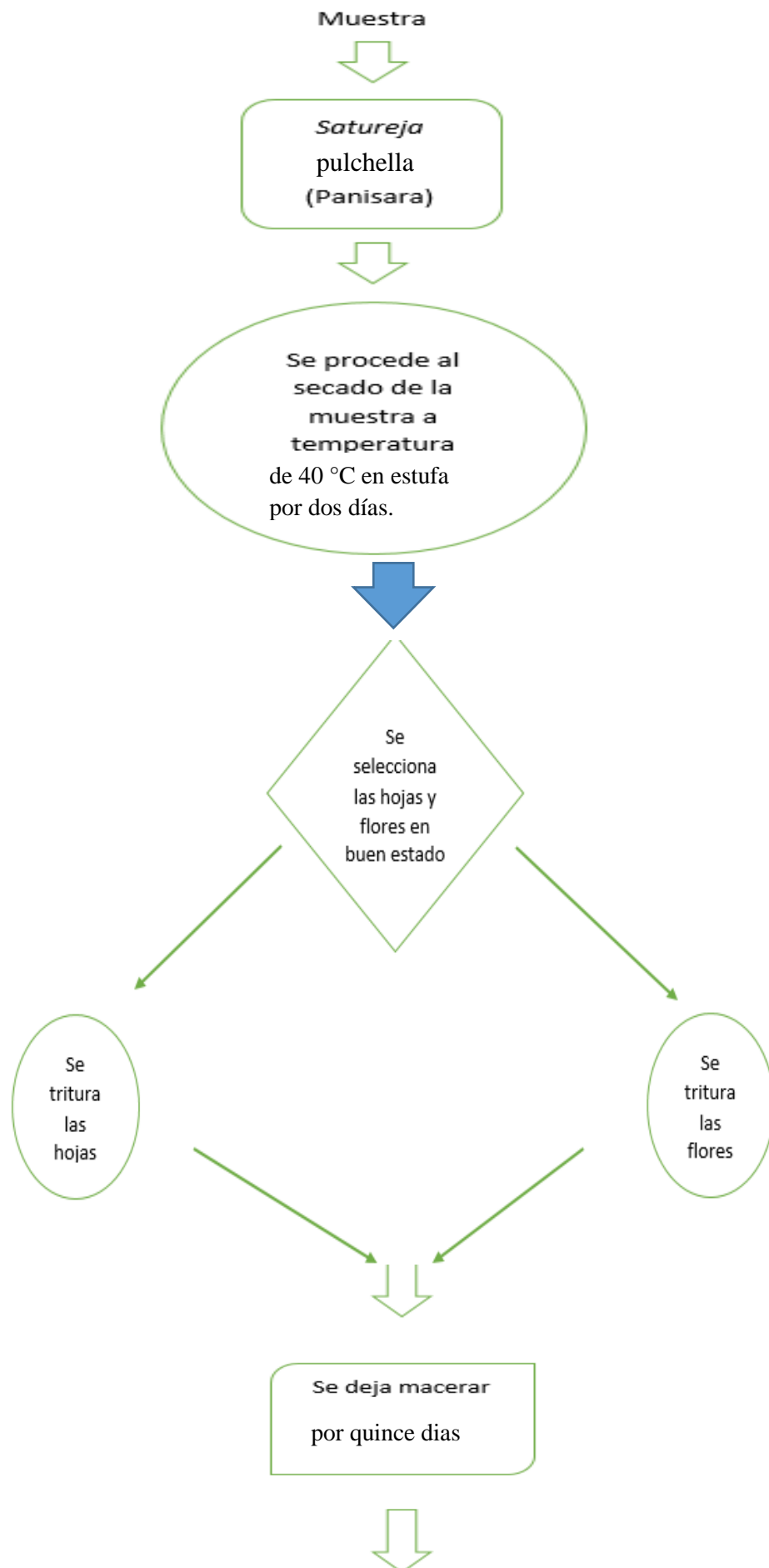
DOC.286

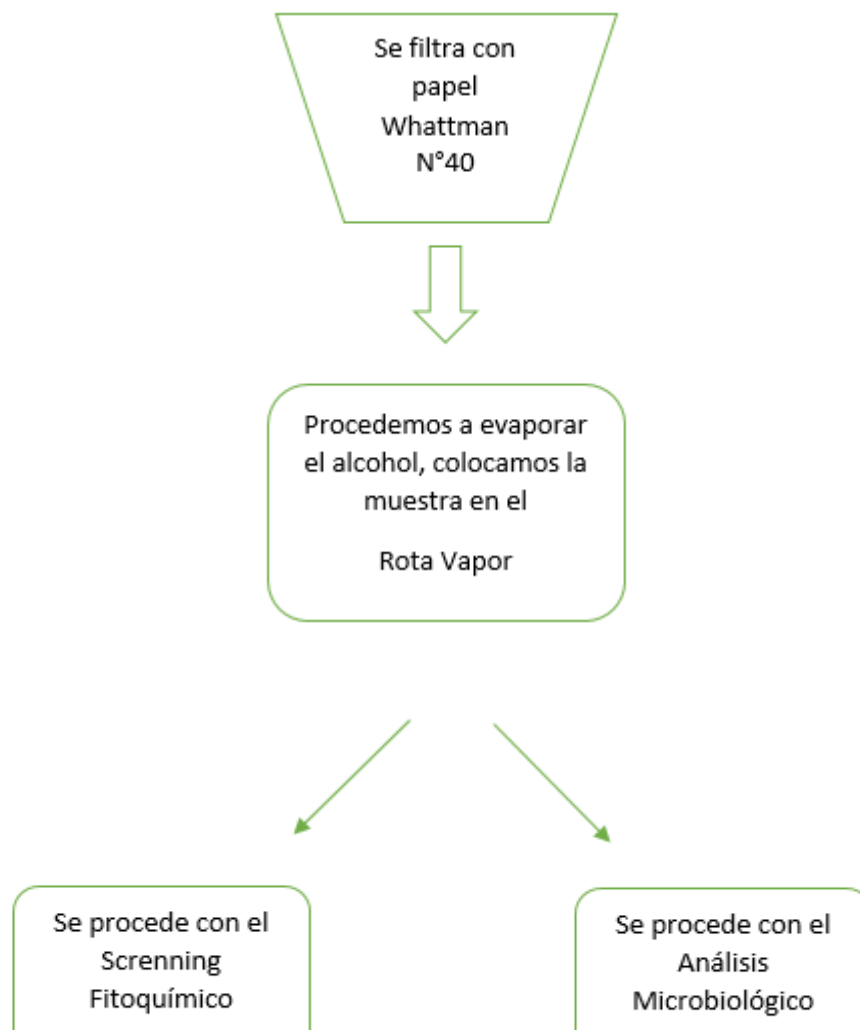
## ANEXO 7: CRONOGRAMA DEL PROGRAMA EXPERIMENTAL

ACTIVIDADES	DIAS A REALIZAR
ELABORACION DEL MACERADO DE LAS DROGAS	REALIZADO
IDENTIFICACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS(CUALITATIVOS)	Marzo del 2017
Pruebas microbiológicas	Marzo y Abril del 2017
Discusión de resultados	Febrero hasta Junio del 2017

Fuente: Elaboración propia.

## ANEXO 8: CRONOGRAMA DEL PROCESO EXPERIMENTAL





Fuente: Elaboración propia.

## ANEXO 9: TESTIMONIOS FOTOGRAFICOS



**Fotografia 01:** Indumentaria adecuada donde se procederá con análisis respectivos: Guardapolvo, gorra, mascarilla y guantes. Fuente: Elaboración propia.

**Procedimiento experimental de la variable “Extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* “Panisara”**



**Fotografía 02:** Se seleccionó las hojas y flores secas de *Satureja pulchella* (Panisara) y aquellas que estén en buenas condiciones se procedió a pesar para iniciar con la extracción hidroalcohólica. Fuente: Elaboración propia.

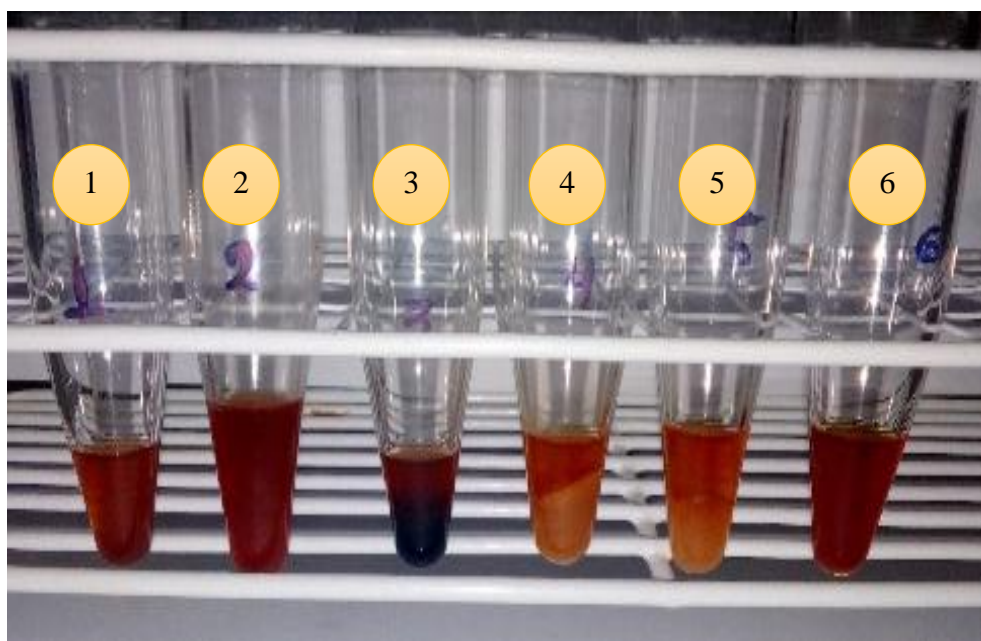


**Fotografía 03:** Extracción hidroalcohólica de las hojas y flores de la *Satureja pulchella* (Panisara), preparación de etanol puro 96° y agua en una proporción (70:30).



**Fotografía 04:** Al finalizar el periodo de maceración, se filtró en papel whatman N°40 para evitar que tengamos residuos de la planta.





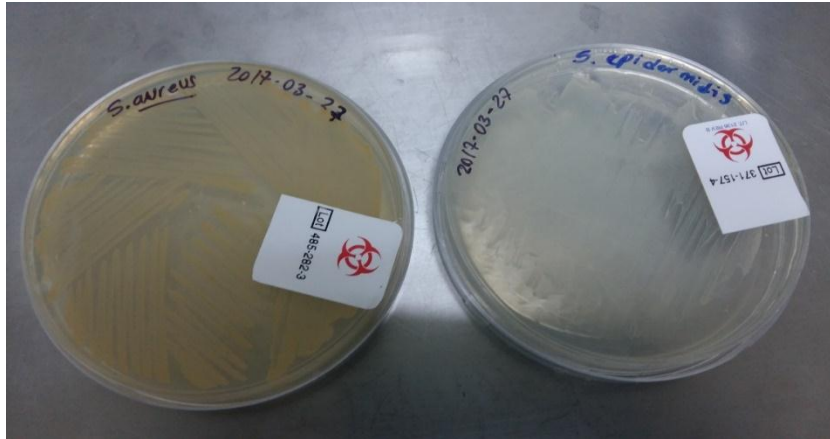
**Fotografía 05:** Se procede a realizar el Screening fitoquímico.

Fuente: Elaboración propia.

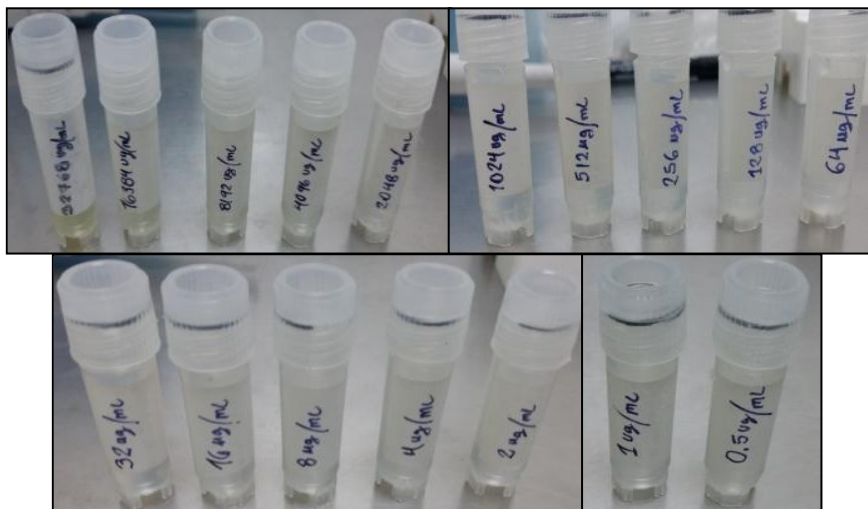
1	Reactivo Wagner	precipitado marrón	(Alcaloides).
2	Solución Shinoda	coloración roja	(Flavonoides).
3	Reactivo de tricloruro ferrico	coloración azul	(Compuestos fenólicos).
4	Reactivo Sonneschein	precipitado naranja	(Alcaloides).
5	Reactivo Mayer	precipitado blanco	(Alcaloides).
6	Reactivo Drangendorff	precipitado rojo o naranja	(Alcaloides).

Fuente: Elaboración propia.

**Procedimiento experimental de la variable** “Actividad Antimicrobiana en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*”

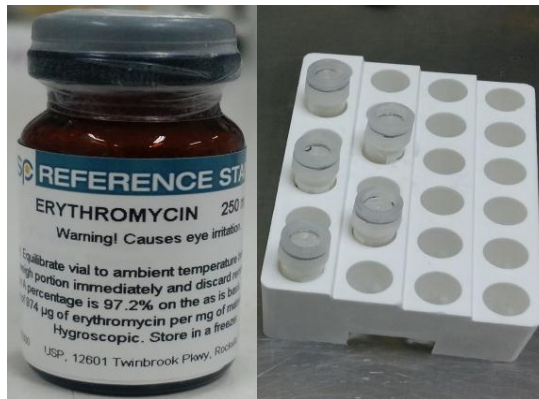


**Fotografia 06:** Cepas de referencia reactivados. Izquierda *Staphylococcus aureus* y a la derecha *Staphylococcus epidermidis*. Fuente: Elaboración propia.



**Fotografia 07:** A partir del extracto hidroalcohólico de la muestra a prueba se preparó 17 concentraciones diferentes. Fuente: Elaboración propia.

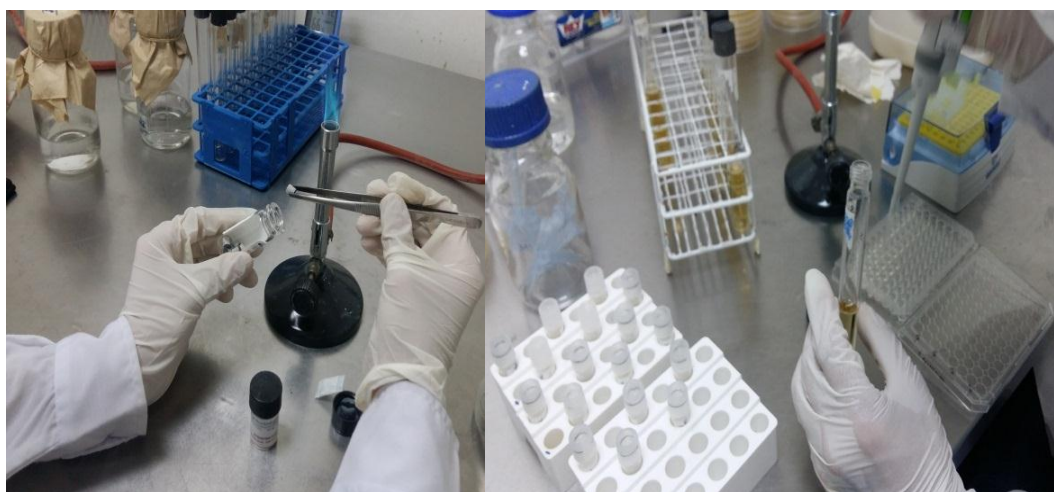




**Fotografia 08.** A la izquierda, el antibiotico estandar de eritromicina y a la derecha, la solución de eritromicina a la concentración de 4 µg/mL. Fuente: Elaboración propia.



**Fotografia 09:** A la izquierda la solución patrón de turbidez McFARLAND 0.5 y a la derecha el proceso de ajuste para la preparación del inóculo de cepas prueba. Fuente: Elaboración propia.

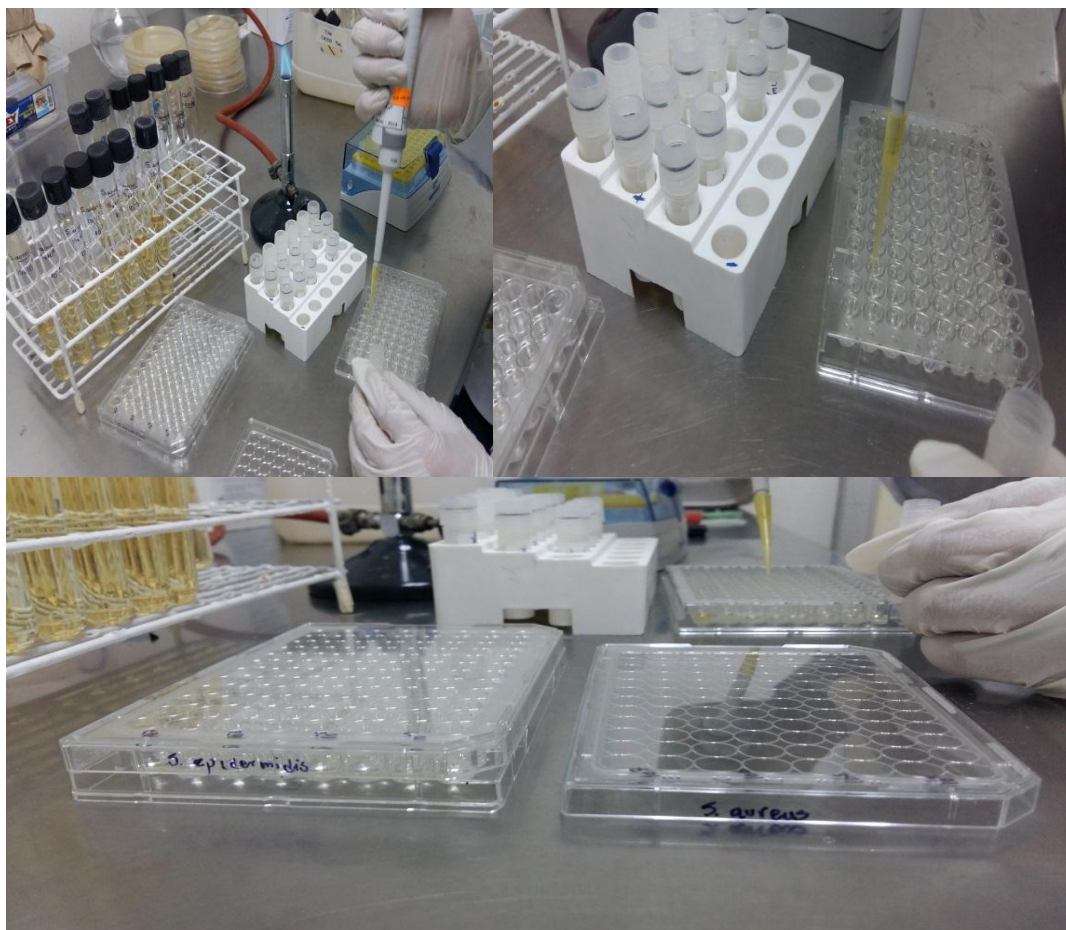


**Figura 10:** Reactivación de la cepa de referencia cuantitativa de *Staphylococcus aureus*. Fuente: Elaboración propia.



**Fotografia 11:** Reactivando las cepas, se utilizó los pellets liofilizados de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*. Fuente: Elaboración propia.





**Fotografía 12:** Desarrollo del proceso de preparación e inoculación del extracto de la muestra a evaluar versus los niveles de concentración de las cepas a prueba. Fuente: Elaboración propia.



**Fotografía 13:** Ejecución del Método de Microdilución en microplaca. Se inocula las diferentes concentraciones del extracto hidroalcoholico en los pocillos de las microplacas de 96. Manteniendo siempre el cuidado debido. Fuente: Elaboración propia.