



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

**EFEECTO “*IN VITRO*” DEL EXTRACTO CRUDO DE
WEINMANNIA PUBESCENS KUNTH “CHICHIR” SOBRE
CULTIVOS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *ESCHERICHIA*
COLI AISLADOS DE PACIENTES PROCEDENTES DEL
HOSPITAL NACIONAL ALMANZOR AGUINAGA ASENJO**

**PRESENTADA POR
HARLEIN JEANCARLO OBLITAS VÁSQUEZ**

**TESIS PARA OPTAR PARA OPTAR EL TÍTULO DE
MÉDICO CIRUJANO**

CHICLAYO – PERÚ

2014



Reconocimiento - No comercial - Sin obra derivada
CC BY-NC-ND

El autor sólo permite que se pueda descargar esta obra y compartirla con otras personas, siempre que se reconozca su autoría, pero no se puede cambiar de ninguna manera ni se puede utilizar comercialmente.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

PRE GRADO

**EFFECTO “*IN VITRO*” DEL EXTRACTO CRUDO DE *WEINMANNIA
PUBESCENS* KUNTH “CHICHIR” SOBRE CULTIVOS DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y *ESCHERICHIA COLI* AISLADOS DE
PACIENTES PROCEDENTES DEL HOSPITAL NACIONAL
ALMANZOR AGUINAGA ASENJO**

TESIS

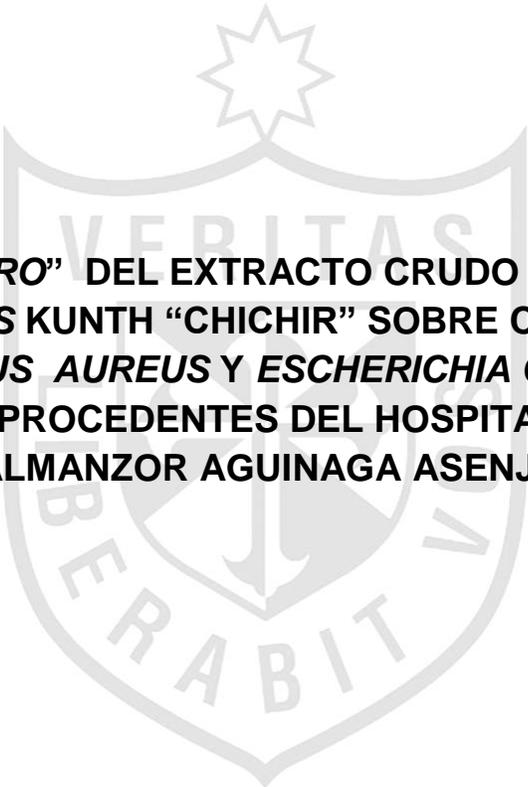
PARA OPTAR EL TÍTULO DE MÉDICO CIRUJANO

PRESENTADA POR

HARLEIN JEANCARLO OBLITAS VÁSQUEZ

CHICLAYO– PERÚ

2014



**EFFECTO “*IN VITRO*” DEL EXTRACTO CRUDO DE *WEINMANNIA
PUBESCENS* KUNTH “CHICHIR” SOBRE CULTIVOS DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y *ESCHERICHIA COLI* AISLADOS DE
PACIENTES PROCEDENTES DEL HOSPITAL NACIONAL
ALMANZOR AGUINAGA ASENJO**

ASESORES Y MIEMBROS DEL JURADO

ASESORES:

Dr. Eric Ricardo Peña Sánchez – Médico Cirujano – Epidemiólogo

Dr. Cristian Díaz Vélez – Médico Cirujano – Epidemiólogo

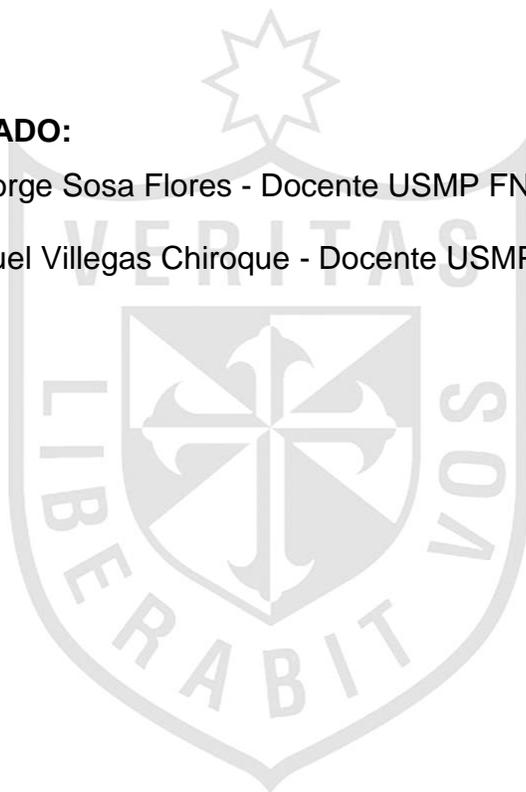
PRESIDENTE DEL JURADO:

Dr. Hugo Urbina Ramírez - Docente USMP FN

MIEMBROS DEL JURADO:

Segundo Jurado: Dr. Jorge Sosa Flores - Docente USMP FN

Tercer Jurado: Dr. Miguel Villegas Chiroque - Docente USMP FN





DEDICATORIA

A mi Madre, a mi Isa, a toda mi familia y amigos que hicieron este sueño realidad, y especialmente a ti Padre que desde el cielo me cuidas.



AGRADECIMIENTOS

A mi Alma Mater USMP, a los Profesores Lizzie Becerra y Hólmer Lezama por siempre darme una mano y enrumbar este proyecto, al Dr. Cristian Díaz por su paciencia y a todas las personas que con su granito de arena hicieron que todo sea posible.



INDICE

INDICE	1
RESUMEN.....	8
INTRODUCCION.....	10
DESCRIPCION DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA	10
ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION	11
BASES TEÓRICAS.....	12
B. <i>ESCHERICHIA COLI</i>	13
C. <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	14
PROBLEMA	15
OBJETIVO GENERAL:	15
OBJETIVOS ESPECIFICOS	15
MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
PROCEDIMIENTO	18
A. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE <i>Staphylococcus aureus</i>	18
B. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LA CEPAS DE <i>Escherichia coli</i>	20
C. CORTEZA DE ARBOL <i>Weinmannia pubescens</i> Kunth “Chichir”	21
PRUEBA “ <i>IN VITRO</i> ”: EN PLACA	22
TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN	22
RESULTADOS.....	23
DISCUSIÓN	31
CONCLUSIONES.....	34
RECOMENDACIONES	35
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	36

RESUMEN

Objetivo: Evaluar el efecto “*in vitro*” del extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth “Chichir” sobre cultivos de *S. aureus* y *E. coli* aislados de pacientes procedentes del Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo. **Material y Métodos:** El extracto crudo se obtuvo de la corteza del árbol *Weinmannia pubescens* Kunth “Chichir”, procedente del Caserío Romero Circa, Distrito Saucepampa; Provincia de Santa Cruz; Departamento de Cajamarca-Diciembre del 2012. Las cepas de *S. aureus* que se obtuvieron fue de 74 muestras de hisopado faríngeo de las cuales luego de cultivo y reactivación se aisló 20 cepas viables para el estudio. Las cepas de *E. coli* que se obtuvieron del Laboratorio de Microbiología del Hospital Almanzor Aguinaga Asenjo, fue en total de 30, luego de de cultivo y reactivación se obtuvo 10 muestras viables para el estudio. **Resultados:** El extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth tuvo un halo de inhibición en el 100% de las cepas de *S. aureus* y en el 70% de las cepas de *E. coli*. El promedio del halo de inhibición del extracto crudo fue de 14,7 mm, siendo mayor que el promedio de los halos de Ampicilina (14,1mm) y Oxacilina (10,3mm) en cepas de *S. aureus*. El promedio del halo de inhibición del extracto crudo fue de 0,4 mm, siendo menor que el halo de inhibición de todos los antibióticos del estudio en las cepas de *E. coli*. **Conclusiones:** El extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth muestra actividad antibacteriana “*in vitro*” en cepas de *S. aureus* y *E. coli* aislados de pacientes procedentes del Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo.

Palabras clave: *Weinmannia pubescens* Kunth “Chichir”, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, actividad antibacteriana.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the " in vitro " effect of the crude extract *Weinmannia pubescens* Kunth " Chichir " on cultures of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from patients from the National Hospital Almanzor Aguinaga Asenjo Hospital . **Material and Methods :** The crude extract was obtained from the bark of the tree *Weinmannia pubescens* Kunth "Chichir" Romero from the farmhouse Circa, Saucepampa District, Province of Santa Cruz, Department of Cajamarca in the month of December 2012. *S. aureus* strains that were obtained with 74 samples which pharyngeal swab was isolated 20 strains, which were used in the confrontation. *E. coli* strains that were obtained from the Microbiology Laboratory of the Almanzor Aguinaga Asenjo Hospital was in total of 30, after culture and reactivation 10 viable samples for the study was obtained. **Results :** The crude extract was *Weinmannia pubescens* Kunth an inhibition in 100% of strains of *S. aureus*. The average zone of inhibition of the crude extract was 14.7 mm , with a higher than average haloes Ampicillin (14.1 mm) and oxacillin (10.3 mm). Crude extract *Weinmannia pubescens* Kunth had a halo of 70% inhibition of *E. coli* strains . The average zone of inhibition of the crude extract was 0.4 mm , being smaller than the zone of inhibition of all study antibiotics in strains of *Escherichia coli*. **Conclusions:** The crude extract *Weinmannia pubescens* Kunth shows antibacterial activity "in vitro" in strains of *S. aureus* and *Escherichia coli* isolated from patients from Almanzor Aguinaga Asenjo Hospital.

Keywords: *Weinmannia pubescens* Kunth "Chichir", *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, antibacterial activity.

INTRODUCCION

DESCRIPCION DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

Se dice que desde antaño los pobladores que habitaron nuestro antiguo Perú mostraban conocimiento de plantas que tenían propiedades curativas; en nuestro país existe una gran diversidad de flora medicinal la cual ha sido descrita y analizada desde muchos años atrás tratando de conocer sus propiedades y aplicarlas en enfermedades que sean de presentación común en la población.

Respecto al presente trabajo se hace referencia a la utilización de la corteza del árbol *Weinmannia pubescens* Kunth la cual se hervía en agua y se usaba en forma de “gárgaras” para curar procesos infecciosos faringoamigdalares; dicho conocimiento medicinal ha sido difundido de manera oral por lo que no se encuentra descrita en ninguna bibliografía.

De esta información se toma como punto de partida el interés de investigar de manera científica las propiedades de dicho árbol y así poder sus propiedades químicas y el mecanismo de cómo podría ejercer su capacidad antimicrobiana.

Por lo antes mencionado, se realizó este trabajo experimental “*in vitro*”, con la finalidad de evaluar el efecto del extracto crudo de la corteza de *Weinmannia pubescens* Kunth “Chichir” sobre cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*; para de esta forma poder contribuir en recomendar o no el uso de este extracto

como antibacteriano y su utilización de manera adecuada luego de comprobar su efecto.

Siendo la *Weinmannia pubescens* Kunth “Chichir,” un árbol en el cual se ha realizado escasa investigación acerca de sus propiedades medicinales. Sin embargo, como familia los pocos estudios encontrados revelan un efecto antibacteriano, por lo que se hace necesario realizar la presente investigación con la finalidad de conocer si dicho árbol de nuestro país tenga alguna propiedad que inhiba el crecimiento bacteriano.

Se escogió al *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* por ser comúnmente los de más alta prevalencia en varias patologías de nuestro medio; así como la resistencia que adquieren estas bacterias a los fármacos usados de manera habitual contra éstas bacterias.

Se espera que luego de evaluar, conocer y analizar los resultados de las propiedades de dicho árbol; se difunda dicha información para el conocimiento de dichas propiedades en el ámbito científico y en nuestra comunidad.

ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACION

- Fogliani B y cols. En el año de 2002 en Nueva Caledonia – Francia (1), realizaron un estudio en 50 especies de Cunoniaceae incluyendo a la *Weinmannia monticola*, donde evaluaron su actividad antibacteriana mediante la prueba de difusión en placa, y luego de medir el halo de inhibición se concluyó que esta especie tenía mínima actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*.

- Montenegro G y cols. En el año de 2013 en Chile (2). Evaluó la actividad antioxidante y antimicrobiana de mieles monoflorales de plantas nativas chilenas, donde se incluyó a la familia de las Cunoniaceae, incluyendo a la *Weinmannia trichosperma*, a éstas especies se les realizó la prueba de difusión en placa y luego de medir el halo de inhibición bacteriano se concluyo que esta especie no tenia actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

BASES TEÓRICAS

A. WEINMANNIA PUBESCENS KUNTH

Respecto al extracto de *Weinmannia pubescens* Kunth, pertenece a la familia formada por arbustos o árboles, a veces plantas trepadoras leñosas, con taninos y mucílagos presenta flores pequeñas; bisexuales o a veces unisexuales en pies separados. Fruto generalmente capsular, con semillas pequeñas, aladas o pelosas. La familia comprende alrededor de 30 géneros y unas 250 especies originarias casi exclusivamente del Hemisferio Sur, salvo algunas que se hallan en México y las Antillas.(3)

Su hábitat natural se encuentra en Colombia y Perú. En el Perú, en Cajamarca y Piura. El rango de distribución altitudinal de la especie oscila entre 2 000 y 3000 msnm (4).

B. ESCHERICHIA COLI

Escherichia coli es una bacteria del grupo de las Gram negativas; puede o no puede ser móvil. Se trata de un enterobacteria anaerobia facultativa, catalasa positiva, oxidasa negativa, reduce el nitrato a nitrito. (5,6)

Su cubierta celular es del tipo didermo y está constituida por:

- Membrana citoplasmática externa, formada por una capa de fosfolípidos con proteínas intercaladas, sobre esta se sitúa una capa fina de peptidoglicano y entre ambas se encuentra el espacio o gel periplásmico.
- La estructura antigénica está formada por tres clases de antígenos: Antígenos somáticos o antígenos O que están presentes en todas las bacterias gramnegativas; Antígenos flagelares o antígenos H que son proteínas que se localizan en los flagelos; Capsulares o antígenos K presentes en cepas con capsula, constituyen una barrera defensiva disminuyendo la capacidad de los anticuerpos para unirse a la bacteria. (5,7,6)

Escherichia coli es un habitante común del tracto intestinal del hombre y los animales de sangre caliente. La mayoría de las cepas de *E. coli* son inofensivas y son una parte de la microflora intestinal normal. (6, 8, 9,10)

Hay diversas cepas o categorías que causan enfermedades sean estas del tracto gastrointestinal, genitourinario u otro sistema. Entre algunas de estas categorías podemos encontrar: *Escherichia coli* enteropatógena, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteroinvasiva y *E. coli* enteroagregativa. (6)

C. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Son cocos grampositivos de 0,8 a 1,5 μm de diámetro, agrupados en forma de racimos cuando proceden de cultivos como células únicas, parejas o cadenas cortas en muestras clínicas. Son inmóviles y no esporuladas. Presentan resultado positivo a las pruebas de catalasa, coagulasa, fermentación del manitol, hemolisis y crece bien en los medios de cultivos comunes; muestran β -hemolisis en medios de agar sangre, y son capaces de desarrollarse a altas concentraciones de NaCl (medio agar salado con manitol o Chapman). (11,12)

Su pared celular se conforma de tres componentes celulares: glucopéptido, ácido teitoico y proteína A. Los antígenos de superficies que poseen actividad antifagocítica son determinantes en la patogenicidad del microorganismo; entre estos se encuentran las enzimas extracelulares (coagulasas, lipasas, hialuronidasa, estafiloquinasas y nucleasas) y las toxinas (toxinas del shock tóxico, enterotoxina, alfa hemolisina, citolítica y toxina exfoliativa epidérmica). (13) El principal reservorio de *S. aureus* es el ser humano, hallándose en los portadores sanos, en fosas nasales, así como en pacientes infectados. El modo de contaminación principal es el directo a través de la mano, previamente puesta en contacto con la región nasofaríngea. (14)

La resistencia a metilina en cepas de *S. aureus* es un problema creciente en el ámbito mundial, ya que las cifras crecientes que se reportan son preocupantes, y el estafilococo dorado es un agente que se disemina fácilmente y el comportamiento del proceso es agresivo, con la que este agente no solo lleva resistencia a la

meticilina, sino a la totalidad de antibióticos β -lactámicos, incluyendo cefalosporinas y carbapenem. (15)

PROBLEMA

El problema planteado fue ¿Cuál es el efecto “*in vitro*” del extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth “Chichir” sobre cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aislados de pacientes procedentes del Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo?

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto “*in vitro*” del extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth “Chichir” sobre cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aislados de pacientes procedentes del Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar la actividad antibacteriana del extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth “Chichir” y de los antibióticos ampicilina, penicilina, amikacina, ciprofloxacino, ceftriaxona, oxacilina, gentamicina, sulfametoxazol en cepas de *Staphylococcus aureus*.
- Evaluar la actividad antibacteriana del extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth “Chichir” y de los antibióticos gentamicina, ampicilina,

ceftriaxona, ciprofloxacino, sulfametoxazol, nitrofurantoína, amikacina, amoxicilina en cepas de *Escherichia coli*.

FORMULACION DE HIPOTESIS

Como hipótesis se planteó que el extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth inhibe “*in vitro*”, el crecimiento de los cultivos *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.



MATERIAL Y MÉTODOS

El diseño de investigación fue pre-experimental, en su ejecución se contó con el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de San Martín de Porres Filial Norte, y que cuenta con acceso restringido, mesas de trabajo equipadas y demás insumos de su categoría.

Se escogió a la especie *Weinmannia pubescens* Kunth “Chichir” entre todas las especies de la familia Cunoniaceae por el uso empírico que le daban en el tratamiento de enfermedades faringoamigdalares así como por no tener trabajos acerca de sus propiedades fotoquímicas. El nombre científico de la especie usada en el estudio se determinó en el Museo de Historia Natural de la UNMSM dando como resultado:

Division: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden: Rosales

Familia: Cunoniaceae

Genero y especie: *Weinmannia pubescens* Kunth

El extracto crudo de la *Weinmannia pubescens* Kunth “Chichir”, se obtuvo de manera manual de la corteza de dicho árbol procedente del Caserío Romero Circa, Distrito Saucepampa; Provincia de Santa Cruz; Departamento de Cajamarca en el mes de diciembre del 2012.

Los cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* fueron obtenidos a partir de los aislamientos de los pacientes atendidos en el Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo durante los meses de setiembre a noviembre del 2012.

PROCEDIMIENTO

A. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LAS CEPAS DE *Staphylococcus*

***aureus*.**

Recolección Y transporte de las muestras

La recolección se realizó en el Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo; donde las muestras se tomaron de secreciones faríngeas de pacientes atendidos en consultorio externo de las especialidades de Neumología con sospecha de enfermedad faringoamigdalina al momento de la consulta.

Faringe. Se pidió que el paciente abra la boca y diga "ah". Se tomó de la parte posterior de la faringe. También se tomó muestra con un hisopo detrás de la úvula y entre los pilares amigdalinos con un movimiento hacia atrás y adelante.

Luego estas muestras fueron transportadas al laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres.

Aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus*

Una vez en el laboratorio de Microbiología de la Universidad de San Martín de Porres, las muestras fueron sembradas en el medio Agar manitol salado (medio selectivo para este microorganismo el cual posee capacidad de crecer en

presencia de 7,5% de NaCl y fermentar el manitol y formar ácidos, evidenciándose su crecimiento mediante la producción de colonias con halo amarillo) servido en una placa de Petri usando la técnica de estría en cuatro cuadrantes para luego ser incubadas a 35⁰ C por 24 horas con la finalidad de obtener colonias manitol positivas.

A partir de las colonias aisladas, se procedió a seleccionar las cepas con las siguientes características: colonias grandes (2-3mm a las 24 horas), convexas, lisas, enteras, opacas y con frecuencia pigmentadas. A partir de estas colonias se realizó la coloración Gram; en la cual se consideraron aquellas colonias cuya coloración muestre las siguientes características: cocos gram positivos agrupados en racimos. Las colonias con características de *S. aureus* se cultivaron en el medio Agar nutritivo para realizar luego las pruebas bioquímicas de identificación final.

Catalasa (prueba en lámina). A partir de un cultivo de 24 horas, se tomó una asada y se colocó sobre un portaobjetos, luego se añadió una gota de H₂O₂ al 3% con ayuda de una pipeta Pasteur. Luego de añadir el H₂O₂ se observara una efervescencia (formación de burbujas) lo cual indicó que la prueba es positiva para *S. aureus*.

Hemólisis. A partir de un cultivo de 24 horas se procedió a tomar una asada de este y se sembró en agar sangre (agar nutritivo mas 5-10% sangre de carnero), luego se incubó a 35⁰ alrededor de 24 horas. Luego se observó la β- hemolisis característica de las colonias de *S. aureus*.

Se realizó antibiograma a todos los cultivos con antibióticos contra GRAM positivos priorizando la confrontación con gentamicina evaluando sensibilidad y resistencia de los cultivos.

Las cepas de *Staphylococcus aureus* que se obtuvieron fue de 74 muestras de hisopado faríngeo de las cuales luego de cultivo y reactivación se aisló 20 cepas de *S. aureus*, viables para el estudio.

B. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LA CEPAS DE *Escherichia coli*

Se recolectaron cepas de *Escherichia coli* a partir de paciente con ITU confirmado con urocultivo y se seleccionaron las sensibles a la gentamicina.

Las muestras se obtuvieron de los paciente hospitalizados en el Hospital Nacional Almanzor Aguinaga Asenjo de diferentes servicios pero que cumplan con el criterio que sea positivo para ITU.

Las muestras fueron analizadas en los laboratorios del mismo Hospital y sólo se recolectaron las cepas que mostraron sensibilidad a la gentamicina, dicha información se tomó de los informes del estudio de Antibiograma sobre las cepas de *E. coli* antes que estos fueran anexadas a las historias clínicas de cada paciente. Dichas muestras fueron llevadas en frascos estériles en un medio nutritivo a la Universidad para su almacenamiento hasta su uso.

En el Laboratorio de Microbiología de la Universidad de San Martín de Porres se realizó la reactivación de dichas cepas en Agar McConkey y obtener cepas puras de *E. coli*. Luego a estos cultivos se realizó antibiograma a todos los cultivos con

antibióticos contra GRAM negativos, donde se volvió a confrontar contra gentamicina evaluando sensibilidad y resistencia de los cultivos.

Las cepas de *Escherichia coli* que se obtuvieron del Laboratorio de Microbiología del Hospital Almanzor Aguinaga Asenjo, fue en total de 30, luego de de cultivo y reactivación se obtuvo 10 muestras viables para el estudio.

C. CORTEZA DE ARBOL *Weinmannia pubescens* Kunth “Chichir”.

Recolección y obtención extracto crudo de la corteza del árbol *Weinmannia pubescens* Kunth “Chichir”.

- Se procedió a recolectar la corteza del árbol *Weinmannia pubescens* Kunth y se llevó al Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Martín De Porres para su procedimiento en el mes de diciembre de 2012.
- En el laboratorio se procedió a desinfectar la parte interna de la corteza con Alcohol Yodado, luego con ayuda de un bisturí estéril se obtuvo pequeñas partes las cuales se colocaron en un matraz y luego de moler se obtuvo el extracto puro, luego se usó papel filtro para limpiar alguna impureza; luego este fue depositado en un frasco ámbar estéril antes de su refrigeración hasta su utilización.

Parte del contenido sirvió para realizar marchas fotoquímicas para verificar los componentes o principios activos. El análisis fitoquímico del extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth se realizó en los Laboratorios de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad

Nacional Federico Villarreal en la ciudad de Lima, donde se obtuvo que el extracto contenía: SAPONINAS Y POLIFENOLES (TANINOS Y FLAVONOIDEOS).

PRUEBA “*IN VITRO*”: EN PLACA

- A partir de las copias seleccionadas (*E. coli* y *S. aureus*) se procedió a reactivarlas en Agar nutritivo por 24 horas a 37°C.
- Luego se procedió a realizar una suspensión igual al tubo 0.5 Mc Farland para la prueba “in- vitro” y el procedimiento fue el mismo que para un Antibiograma.
- Preparada las suspensiones, se procedió a realizar una siembra tipo camada en agar Müeller Hinton, luego se procedió a realizar un pocillo de 6mm en el centro de la placa donde se vertió 40 microlitros del extracto en dichos pocillos.
- Se realizó tres placas por cada cultivo.
- Una vez realizado el procedimiento, se incubó a 37° C por 24 horas, transcurrido ese tiempo se procedió a la medición de los halos de inhibición.

TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN.

Para el análisis estadístico se empleó el programa estadístico SPSS versión 19, se realizó el test de ANOVA para evaluar los valores promedio obtenidos luego de la medición de los halos de inhibición de las cepas estudiadas.

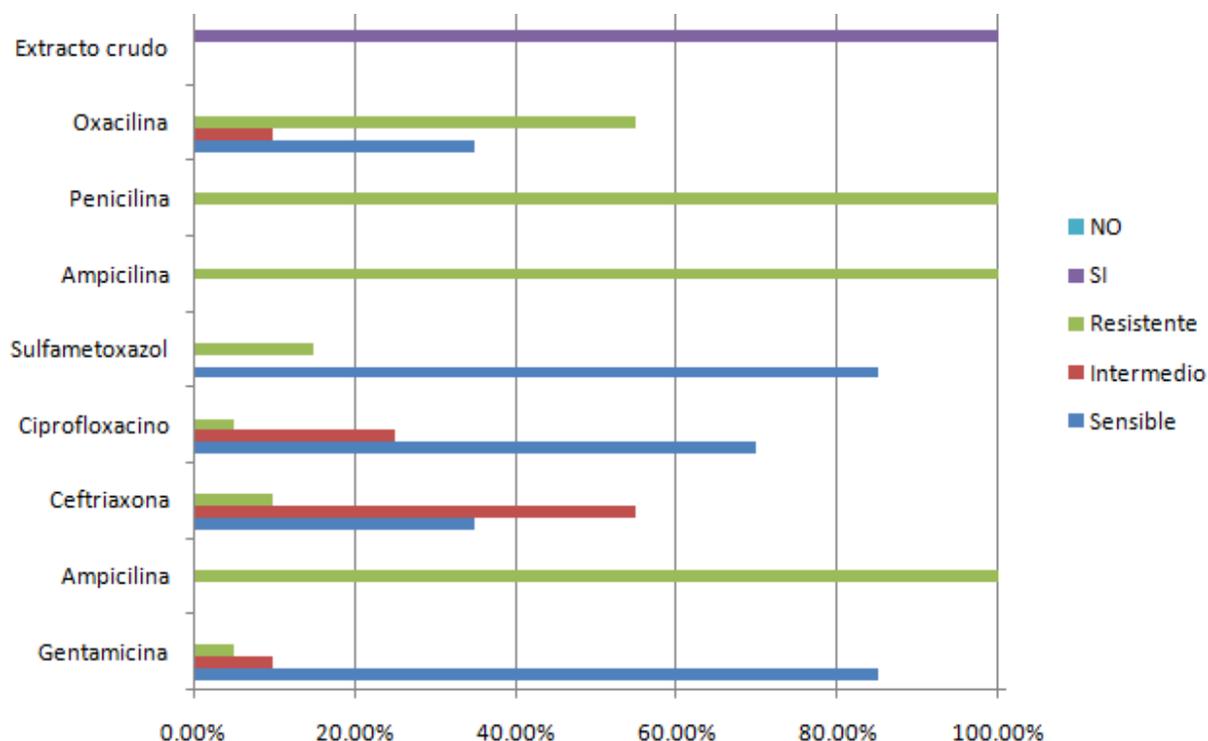
RESULTADOS

Tabla 1: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO CRUDO DE *WEINMANNIA PUBESCENS* KUNTH “CHICHIR”, Y DE ANTIBIÓTICOS SOBRE CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*.

	Actividad Antibacteriana	Frecuencia	Porcentaje
Extracto crudo	SI	20	100.0
	NO	00	0.0
Ampicilina	Resistente	20	100.0
Penicilina	Resistente	20	100.0
Amikacina	Sensible	4	20.0
	Resistente	10	50.0
	Intermedio	6	30.0
Ciprofloxacino	Sensible	14	70.0
	Resistente	1	5.0
	Intermedio	5	25.0
Ceftriaxona	Sensible	7	35.0
	Resistente	2	10.0
	Intermedio	11	55.0
Oxacilina	Sensible	7	35.0
	Resistente	11	55.0
	Intermedio	2	10.0
Gentamicina	Sensible	17	85.0
	Resistente	1	5.0
	Intermedio	2	10.0
Sulfametoxazol	Sensible	17	85.0
	Resistente	3	15.0

En la **Tabla 1** se muestra en el caso del extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth hubo actividad antibacteriana en todas las cepas de *S. aureus*; y la actividad antibacteriana de los antibióticos se describe según sensibilidad, intermedio y resistencia.

Grafico 1 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA (%) DEL EXTRACTO CRUDO DE *WEINMANNIA PUBESCENS* KUNTH “CHICHIR”, Y DE ANTIBIÓTICOS SOBRE CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*



En la **Gráfico 1** se muestra que la actividad antibacteriana del extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth se presentó en todas las cepas (100%), el porcentaje de sensibilidad de los antibióticos fluctúa entre 85 y 20%.

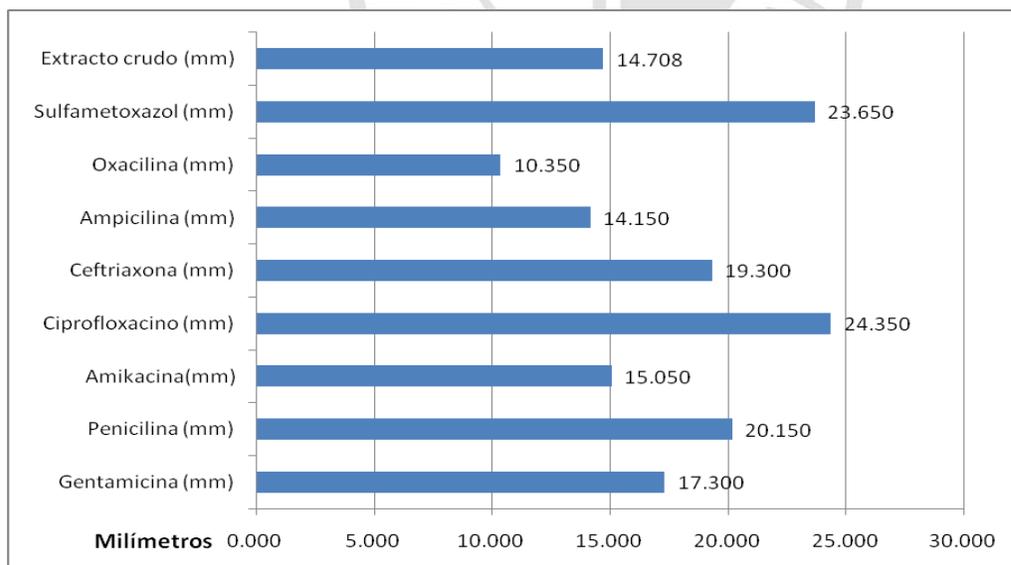
Tabla 2 PROMEDIO DEL HALO DE INHIBICION Y DESVIACION ESTANDAR DEL EXTRACTO CRUDO DE *WEINMANNIA PUBESCENS* KUNTH Y DE ANTIBIOTICOS EN CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

	x	DS	p
Extracto crudo (mm)	14.708	1.6149	
Penicilina (mm)	20.150	4.4518	
Amikacina(mm)	15.050	2.6651	
Ciprofloxacino (mm)	24.350	5.2443	
Ceftriaxona (mm)	19.300	4.0406	p<0.05
Ampicilina (mm)	14.150	3.2811	
Oxacilina (mm)	10.350	4.0298	
Sulfametoxazol (mm)	23.650	7.6246	
Gentamicina (mm)	17.300	2.6378	

Valor p calculado con prueba de ANOVA

En esta **tabla 2** se observa el promedio del halo de inhibición del extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth (14.7mm), es mayor que el promedio de la Oxacilina (10.3mm) y la Ampicilina (14.1mm).

Gráfico 2 PROMEDIO DEL HALO DE INHIBICION DEL EXTRACTO CRUDO DE *WEINMANNIA PUBESCENS* KUNTH Y DE ANTIBIOTICOS EN CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*



En el **Gráfico 2** se muestra que el promedio de los halos de inhibición fluctúan entre 10,3mm y 24,3mm, siendo el menor de la oxacilina y el mayor del ciprofloxacino.

Tabla 3 ANOVA DEL EFECTO IN VITRO DEL EXTRACTO CRUDO DE *WEINMANNIA PUBESCENS* KUNTH Y DE ANTIBIOTICOS EN CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

	Extracto crudo	Ampicilina	Oxacilina	Ceftriaxona	Penicilina	Sulfametoxazol
Extracto crudo		p>0,05	p<0.05			
Ampicilina			p<0.05			
Amikacina	p>0,05	p>0,05	p<0.05			
Gentamicina	p>0,05	p>0,05	p<0.05			
Ceftriaxona	p<0.05	p<0.05	p<0.05			
Penicilina	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p>0,05		
Sulfametoxazol	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p>0,05	
Ciprofloxacino	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p>0,05

Valor p calculado con prueba de ANOVA

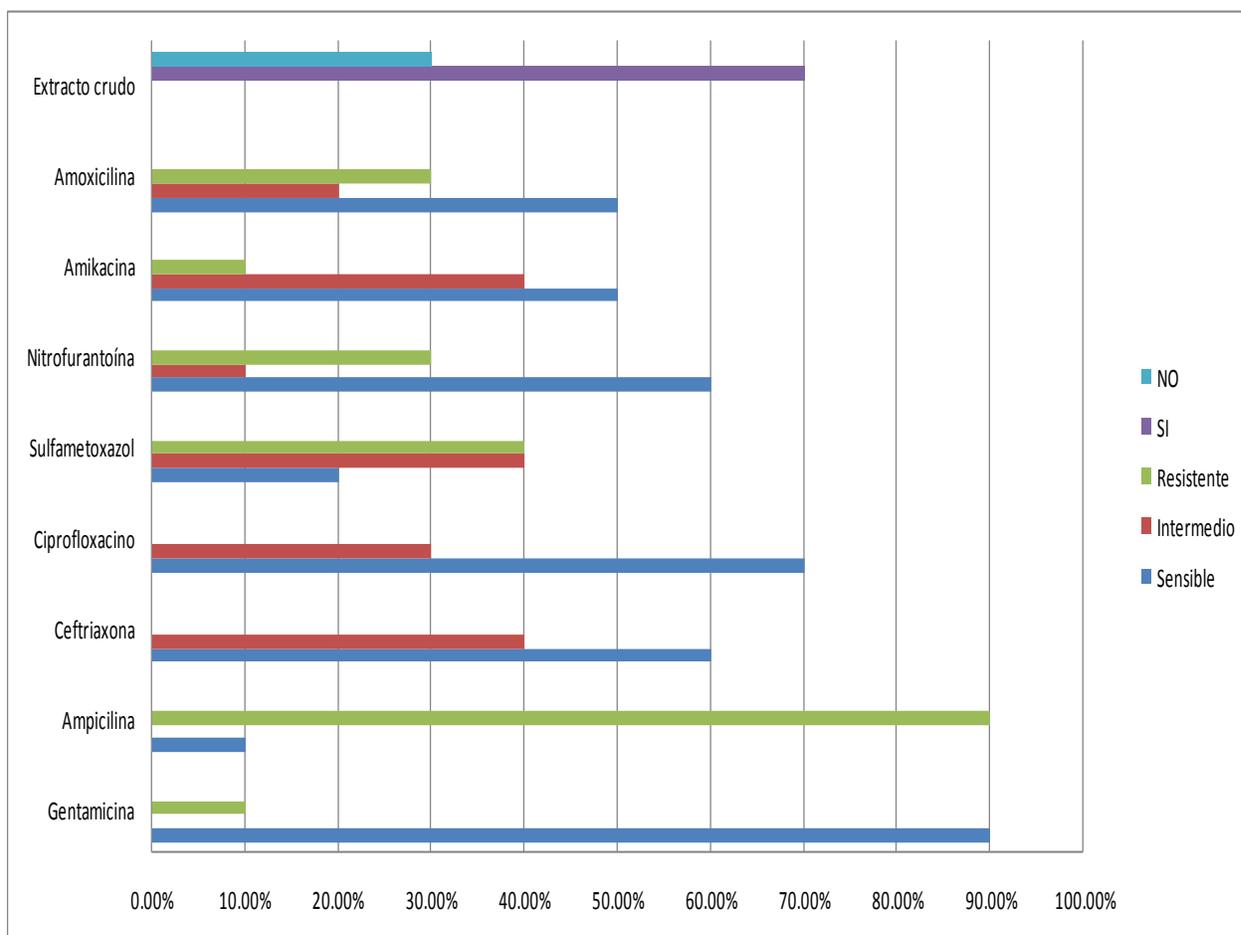
En la **tabla 3** se muestra que el halo de inhibición del extracto crudo *Weinmannia pubescens* Kunth tuvo diferencia significativa frente a los halos de: ceftriaxona, penicilina, sulfametoxazol, ciprofloxacino, oxacilina, sobre cepas de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 4: ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO CRUDO DE *WEINMANNIA PUBESCENS* KUNTH “CHICHIR”, Y DE ANTIBIÓTICOS SOBRE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*

	Actividad Antibacteriana	Frecuencia	Porcentaje
Extracto crudo	SI	7	70.0
	NO	3	30.0
Gentamicina	Sensible	10	100.0
	Resistente	0	0.0
Ampicilina	Sensible	0	0.0
	Resistente	10	100.0
Ceftriaxona	Sensible	6	60.0
	Intermedio	4	40.0
Ciprofloxacino	Sensible	7	70.0
	Intermedio	3	30.0
Sulfametoxazol	Sensible	2	20.0
	Resistente	4	40.0
	Intermedio	4	40.0
Nitrofurantoína	Sensible	6	60.0
	Resistente	3	30.0
	Intermedio	1	10.0
Amikacina	Sensible	5	50.0
	Resistente	1	10.0
	Intermedio	4	40.0
Amoxicilina	Sensible	5	50.0
	Resistente	3	30.0
	Intermedio	2	20.0

En la **tabla 4** se muestra en el caso del extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth que hubo un halo de inhibición en el 70% de cepas de *S. aureus* y la actividad antibacteriana de los antibióticos se describe según sensibilidad, intermedio y resistencia.

Gráfico 3 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA (%) DEL EXTRACTO CRUDO DE *WEINMANNIA PUBESCENS* KUNTH “CHICHIR”, Y DE ANTIBIÓTICOS SOBRE CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*



En el **gráfico 3** se muestra que el porcentaje de la actividad antibacteriana del extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth y de los antibióticos se encuentran entre 10 y 100%.

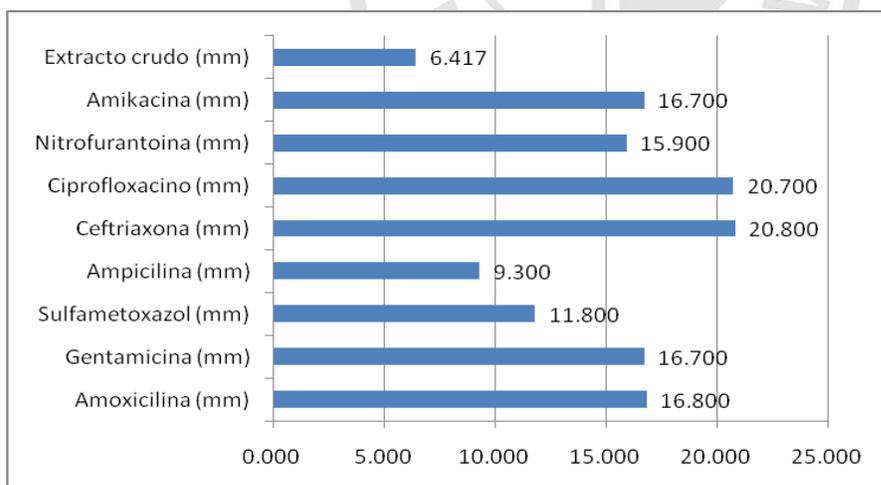
Tabla 5 PROMEDIO DEL HALO DE INHIBICIÓN Y DESVIACIÓN ESTANDAR DEL EXTRACTO CRUDO DE *WEINMANNIA PUBESCENS* KUNTH Y DE ANTIBIOTICOS EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*

	x	DS	p
Extracto crudo (mm)	6.417	0.3447	
Gentamicina (mm)	16.700	1.6364	
Sulfametoxazol (mm)	11.800	2.8983	
Ampicilina (mm)	9.300	1.7670	
Ceftriaxona (mm)	20.800	2.5298	p<0.05
Ciprofloxacino (mm)	20.700	2.2136	
Nitrofurantoina (mm)	15.900	2.5582	
Amikacina (mm)	16.700	1.4944	
Amoxicilina (mm)	16.800	4.0222	

Valor p calculado con prueba de ANOVA

En esta **tabla 5** se observa el promedio del halo de inhibición del extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth (6.4mm), es menor que el halo de inhibición de todos los antibióticos en las cepas de *Escherichia coli*.

Gráfico 4 PROMEDIO DEL HALO DE INHIBICION DEL EXTRACTO CRUDO DE *WEINMANNIA PUBESCENS* KUNTH Y DE ANTIBIOTICOS EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*



En el **Gráfico 4** se muestra que el promedio de los halos de inhibición fluctúan entre 6,4mm y 20,8mm, siendo el menor de la ampicilina y el mayor de la ceftriaxona.

Tabla 6 ANOVA DEL EFECTO IN VITRO DEL EXTRACTO CRUDO DE *WEINMANNIA PUBESCENS* Y DE ANTIBIÓTICOS EN CEPAS DE *ESCHERICHIA COLI*

	Extracto crudo	Ampicilina	Sulfametoxazol	Nitrofurantoína	Gentamicina	Amikacina	Amoxicilina
Extracto							
Ampicilina	p<0.05						
Sulfametoxazol	p<0.05	p>0,05					
Nitrofurantoína	p<0.05	p<0.05	p<0.05				
Gentamicina	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p>0,05			
Amikacina	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p>0,05	p>0,05		
Amoxicilina	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p>0,05	p>0,05	p>0,05	
Ciprofloxacino	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05
Ceftriaxona	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05	p<0.05

Valor p calculado con prueba de ANOVA

En la **tabla 3** se muestra que el halo de inhibición del extracto crudo *Weinmannia pubescens* Kunth tuvo diferencia significativa frente a los halos de: Ampicilina, Sulfametoxazol, Nitrofurantoína, Gentamicina, Amikacina, Amoxicilina, Cirprofloxacino, Ceftriaxona, sobre cepas de *Escherichia coli*.

DISCUSIÓN

En la tabla 1 y 4 se observan los resultados donde se muestran que el Extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth "Chichir", mostró halo de inhibición en el 100% de las cepas de *S. aureus* y un halo de inhibición en el 70% de las cepas de *E.coli*, resultados diferentes a los obtenidos por Montenegro G et al. en su estudio de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de la *Weinmannia trichosperma* donde demostraron que éste extracto no tenía actividad antibacteriana frente a cepas de *S. aureus* y de *E.coli*; en dicho estudio no se determinó los principios activos del extracto. En el estudio de Fogliani B et al trabajaron con extractos etanólicos de *Weinmannia dichotoma* y *Weinmannia monticola* donde éstas no tuvieron actividad antibacteriana frente a cepas de *S. aureus* y *E. coli*. En el caso de la *Weinmannia pubescens* Kunth se demostró que contenía Saponinas y Polifenoles (Flavonoides y Taninos), por lo cual es posible que la actividad antibacteriana de esta se deba a estos principios activos. Se determina así que no todas las especies del género *Weinmannia* presentan actividad antibacteriana.(1,2)

En la tabla 2 sobre las cepas de *S. aureus*, el promedio del halo de inhibición del extracto crudo fue de la *Weinmannia pubescens* Kunth fue de 14,7 mm, siendo mayor que el promedio de los halos de Ampicilina (14,1mm) y Oxacilina (10,3mm) en las cepas de *S. aureus* (Tabla 2). En la tabla 5 en el caso de las cepas de *E. coli*, el promedio del halo de inhibición del extracto crudo fue de 0,4 mm, siendo menor que el halo de inhibición de todos los antibióticos del estudio (Tabla 5). Comparado con los estudios de Montenegro G et al y Fogliani B donde en sus resultados no hubo

actividad antibacteriana en las cepas de *S. aureus* y de *E.coli*. Esto se puede explicar por la creciente resistencia en los últimos años a muchos antibióticos, por su uso desmedido el cual ha causado mutaciones genéticas y alteraciones en las membranas de muchas bacterias como es el caso del *S. aureus* y *E. coli*. Se observa también que el extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth muestra resultados promisorios en cepas resistentes a Oxacilina esto podría explicarse por la presencia de Saponinas, Flavonoides y Taninos que muestran mayor actividad antibacteriana que la Oxacilina. (1,2,16).

En la grafica 3 y 4 se observa que el extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth mostró halos de inhibición mayores para *S. aureus* que para *E. coli*, resultado contrario a los obtenidos por Montenegro G et al; esto podría ser explicado por la presencia de Saponinas y Polifenoles (flavonoides y taninos); en el extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth; los Polifenoles por la presencia en su estructura de hidroxilos fenólicos, penetran fácilmente a través de la membrana celular bacteriana, se combina y precipitan las proteínas protoplasmáticas desnaturalizándolas y actuando como venenos protoplasmáticos. En el caso de las saponinas se dice que interaccionan con barreras lipofílicas por afinidad química de la genina, y la porción glicosídica contribuye a la disrupción celular. Pero la totalidad de estos mecanismos no ha sido del todo descrita y no se ha podido establecer la relación estructura-actividad. Se ha propuesto la formación espontánea de complejos entre moléculas de saponinas y colesterol de membrana, que conducirían a la formación de poros. Estos poros causarían un incremento en la permeabilidad de la membrana, permitiendo la circulación de iones y macromoléculas entre proteínas, además de la extracción de

esteroles a través de vesículas. La mayor sensibilidad al efecto antimicrobiano puede ser atribuida, en el caso del *S. aureus*, a la estructura de su membrana citoplasmática, la cual permite a las sustancias antibacterianas destruir fácilmente la membrana de la célula ocasionando una salida del citoplasma (1,17,18)

En la tabla 6 se muestra el análisis estadístico de los resultados muestra que existe diferencia significativa (ANOVA $p < 0,05$) entre los halos de inhibición del extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth, frente a todos los antibióticos control sobre las cepas de *E coli*. La resistencia de *E. coli* frente a las sustancias antibacterianas está relacionada con la superficie hidrofílica de su membrana externa. Esta membrana, rica en moléculas de lipopolisacáridos, despliega una barrera contra la penetración de numerosas moléculas antibióticas y está también asociada con las enzimas en el espacio periplasmático, las cuales son capaces de romper las moléculas introducidas desde el exterior. En el caso de la resistencia del *E coli* a la Ampicilina se puede explicar porque esta presenta betalactamasas las cuales son enzimas que se caracterizan por hidrolizar el enlace amida del núcleo betalactámico, lo cual inactiva al antibiótico. (19,20).

CONCLUSIONES

En el estudio se observó que el extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth “Chichir” sí mostró actividad antibacteriana; la cual fue mayor que la ampicilina y la oxacilina sobre cultivos de *Staphylococcus aureus*.

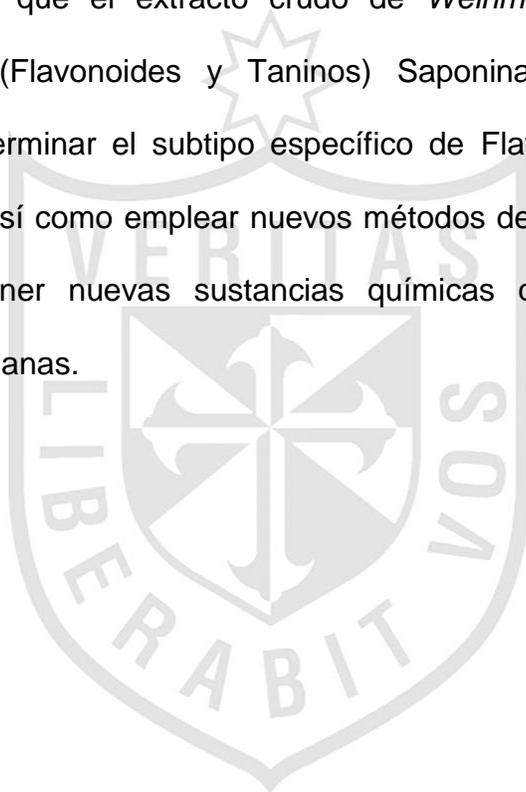
En el estudio se observó que el extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth “Chichir” sí mostró actividad antibacteriana, la cual fue menor que todos los antibióticos del estudio sobre cultivos de *Escherichia coli*.



RECOMENDACIONES

Se recomienda nuevos estudios sobre cepas de otras bacterias de gran prevalencia en nuestro medio para así determinar si el extracto posee actividad antibacteriana sobre éstas.

Si bien se determinó que el extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth contenía Polifenoles (Flavonoides y Taninos) Saponinas, queda para futuras investigaciones el determinar el subtipo específico de Flavonoides y Taninos que contenga el extracto; así como emplear nuevos métodos de extracción de principios activos y poder obtener nuevas sustancias químicas que puedan tener más propiedades antibacterianas.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Fogliani B, Bouraima-Madjebi S, Medevielle V, Pineau R. Screening of 50 Cunoniaceae species from New Caledonia for antimicrobial properties. New Zealand Journal Of Botany 2002; 40:(3), 511- 520.
2. Montenegro G, Santander F, Jara C. Actividad antioxidante y antimicrobiana de mieles monoflorales de plantas nativas chilenas. Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat, 2013, 12 (3): 257 – 268.
3. Rogers, ZS. A new Species of *Weinmannia* (Cunoniaceae: Cunonieae) from Southern Ecuador. Novon 2002, 12: 249-252.
4. Flora del Perú, actualización de datos [internet], Lima, Perú; 2006 [fecha de acceso 15 de octubre del 2012]. URL disponible en http://www.minam.gob.pe/pdf/familias/D_Magnoliophyta_C_Magnoliopsida_O_Oxalidales_F_CUNONIACEAE.pdf
5. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2004; 2:123-140
6. Torres, A. G., Zhou, X. Kaper, J. B. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. Infect Immun 2005; 73: 18–29
7. Meraz IM, Jiang ZD, Ericsson CD, et al. Enterotoxigenic *Escherichia coli* and diffusely adherent *E. coli* as likely causes of a proportion of pathogen negative travelers' diarrhea a PCR based study. J Travel Med 2008;15:412-8.
8. DuPont HL. Bacterial diarrhea. N Engl J Med 2009;361:1560-9

9. Donnenberg, MS, Whittam, TS. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Invest* 2001; 107: 539–548
10. Nguyen TV, Le Van P, Le Huy C, Gia KN, Weintraub A. Detection and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* from young children in Hanoi, Vietnam. *J Clin Microbiol.* 2005; 43(2):755-760.
11. Johnson DRP, Howden PB, Bennett CM. *Staphylococcus aureus*: a guide for the perplexed. *Med J Aust* 2006; 184:374-5.
12. Fowler VG Jr, Olsen MK, Corey GR, et al. Clinical identifiers of complicated *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Arch Intern Med* 2003;163:2066-2072
13. Plata K, Rosato AE, Grzegorz W. *Staphylococcus aureus* as an infectious agent: overview of biochemistry and molecular genetics if its pathogenicity. *Acta Biochim Pol* 2009; 56: 597-612
14. Deurenberg R, Stobberingh E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, genetics and evolution* 2008;8(6):747-763
15. Smith DL. Persistent colonization and the spread of antibiotic resistance in nosocomial pathogens. Resistance is a regional problem. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(10): 3709-3714
16. Velázquez Meza ME. Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud Pública Méx* 2005; 47:38
17. Dastidar SG, Manna A, Kumar KA, et al. Studies on the antibacterial potentiality of isoflavones. *Int J Antimicrob Agents* 2004;23:99–102.
18. Augustin J, Kuzina V, Andersen S, Bak S. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry.* 2011;72:435-57.

19. Kuwano K, Tanxaka N, Shimizu T, Nagatoshi K, Nou S, Sonomoto K. Dual antibacterial mechanisms of nisin Z against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int J Antimicrob Ag.* 2005 Nov; 26 (5): 396 – 402.
20. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med.* 2006;119:S3-10; discussion S62-70.



ANEXOS

FICHA DE RECOLECCION DE DATOS

1. Material de estudio

Extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth

Cepas de *Staphylococcus aureus*

Cepas de *Escherichia coli*

2. Halos de inhibición

Extracto crudo de *Weinmannia pubescens* Kunth

Primer ensayo

Diámetro a	Diámetro b	Promedio (mm)

Segundo Ensayo

Diámetro a	Diámetro b	Promedio (mm)

Tercer ensayo

Diámetro a	Diámetro b	Promedio (mm)

3. Antibiograma: Cepas de *Staphylococcus aureus*

Ampicilina	Penicilina	Amikacina	Ciprofloxacino	Ceftriaxona	Oxacilina	Gentamicina	Sulfametoxazol

4. Antibiograma: Cepas de *Escherichia coli*

Gentamicina	Ampicilina	Ceftriaxona	Ciprofloxacino	Sulfametoxazol	Nitrofurantoina	Amikacina	Amoxicilina



LABORATORIO DE QUIMICA ANALITICA

REPORTE DE ANALISIS FITOQUIMICO

MUESTRA: *Weinmannia pubescens*

Extracto crudo acuoso

RESULTADOS:

MUESTRA	Flavonoides(1)	Saponinas (2)	Taninos (3)
A	+	+	+++
B	+	+	+++

(1) Prueba de Shinoda

(2) Prueba de la espuma

(3) Prueba de gelatina y adicionalmente prueba con $FeCl_3$ acuoso

El Agustino, 4 de febrero de 2014

Q.F. Barreto Yaya Danilo