

# UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA



## TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO CIRUJANO

---

“Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922”

---

### Área de Investigación:

Enfermedades Infecciosas y Tropicales

### Autora:

Br. Vásquez Rivasplata, Luz Esthefany

### Jurado Evaluador:

**Presidente:** Gonzalez Cabeza, José Guillermo

**Secretario:** Reyna López, Lennis Antonio

**Vocal:** Córdova Paz Soldán, Ofelia Magdalena

### Asesor:

Zarate Arce, Marco Antonio

**Código ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9302-1710>

**Trujillo-Perú**

**2018**

**Fecha de Sustentación: 2018/09/05**

## **DEDICATORIA**

### **A DIOS:**

Por haberme permitido llegar hasta este momento y haberme brindado salud y las bendiciones necesarias para lograr mis metas.

### **A MIS PADRES:**

#### **ARSENIO E ISABEL**

Quienes me han conducido por el camino del bien durante toda la vida, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad; muchos de mis logros se los debo a ustedes entre los que se incluye este. A ustedes les debo todo, no hubiera podido hacerlo sin su cariño y sobre todo por el apoyo incondicional que me brindaron durante toda mi carrera profesional. Me formaron con reglas y con algunas libertades, pero al final de cuentas, me motivaron constantemente para alcanzar mis anhelos.

**A MI HIJA:**

**VALERIA**

Tu afecto y tu cariño son los detonantes de mi felicidad, de mi esfuerzo, de mis ganas de buscar lo mejor para ti. Aun a tu corta edad, me has enseñado y me sigues enseñando muchas cosas de esta vida.

Te agradezco por ayudarme a encontrar el lado dulce y no amargo de la vida. Fuiste y serás mi motivación más grande para concluir con éxito mi tesis.

## **AGRADECIMIENTOS**

**EXPRESO MI GRATITUD A MI ASESOR:**

**DR. MARCO ANTONIO ZÁRATE ARCE**

Gracias por haberme brindado su valioso tiempo, por haberse tomado el arduo trabajo de transmitirme sus diversos conocimientos y experiencias en Microbiología, por guiarme y apoyarme en la elaboración de mi tesis, desde principio a fin.

**MI SINCERO AGRADECIMIENTO AL  
PERSONAL DEL LABORATORIO DE  
MICROBIOLOGIA**

Gracias por su colaboración, tiempo y apoyo desinteresado durante la realización del presente trabajo de investigación.

## INDICE

PAGINAS PRELIMINARES

PORTADA

PAGINA DE DEDICATORIA

PAGINA DE AGRADECIMIENTOS

RESÚMEN..... vii

ABSTRACT.....viii

INTRODUCCIÓN.....1

MATERIAL Y MÉTODOS.....9

RESULTADOS.....20

DISCUSIÓN.....23

CONCLUSIONES.....26

RECOMENDACIONES.....27

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA.....28

ANEXOS.....32

## RESÚMEN

**Objetivo:** Evaluar si existe el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922.

**Materiales y Métodos:** Estudio de tipo experimental, transversal. La población estuvo conformada por cultivos de *Escherichia coli* ATCC 25922, a la que se le aplicó el extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla”, la cual se enfrentó a 6 grupos, 4 de ellos con extracto etanólico al 25%, 50%, 75% y 100%, un control (-) etanol y un control interno Gentamicina 10ug, para determinar la inhibición del crecimiento bacteriano por halos de inhibición y la concentración mínima bactericida (CMB) mediante el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC).

**Resultados:** Se observó que el extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” presentó efecto inhibitorio *in vitro* a partir de las concentraciones de 75% sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, utilizando el Método de difusión en Pozo de Agar. La concentración mínima bactericida fue a la concentración del 75%.

**Conclusión:** El extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” presentó efecto inhibitorio *in vitro* sobre *Escherichia coli* ATCC 25922.

**Palabras claves:** *Matricaria chamomilla*, *Escherichia coli* ATCC 25922, halos de inhibición.

## ABSTRACT

**Objective:** To evaluate if there is an *in vitro* inhibitory effect of the ethanolic extract of *Matricaria chamomilla* "Manzanilla" on the growth of *Escherichia coli* ATCC 25922.

**Materials and Methods:** An experimental, cross-sectional study. The population consisted of cultures of *Escherichia coli* ATCC 25922, to which was applied the ethanol extract of *Matricaria chamomilla* "Manzanilla", which faced 6 groups, 4 of them with 25% ethanol extract, 50%, 75 % and 100%, a control (-) ethanol and internal control 10ug Gentamicin, to determine the inhibition of bacterial growth by halos of inhibition and minimum bactericidal concentration (CMB) by counting colony forming units (CFU).

**Results:** It was observed that the ethanol extract of *Matricaria chamomilla* "Manzanilla" presented an inhibitory effect *in vitro* from the concentrations of 75% on strains of *Escherichia coli* ATCC 25922, using the method of diffusion in Agar well. The minimum bactericidal concentration was 75%.

**Conclusion:** The ethanolic extract of *Matricaria chamomilla* "Manzanilla" presented inhibitory effect *in vitro* on *Escherichia coli* ATCC 25922.

**Key words:** *Matricaria chamomilla*, *Escherichia coli* ATCC 25922, inhibition halos.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ANTECEDENTES:

Las plantas medicinales desde tiempos antiguos han sido consideradas como el primer recurso terapéutico para tratamientos de la salud, como medicina tradicional. Desde entonces estos conocimientos han evolucionado y las plantas pasaron a constituir importantes fuentes de productos naturales biológicamente activos. Estudiando su actividad en el organismo e identificando su carácter terapéutico se podrá evaluar los usos que la medicina les atribuye.<sup>1</sup>

De las 250,000 especies de plantas con flores en el mundo, más de 20,000, se clasifican como hierbas escogidas por la población, han sido un factor esencial en la atención de salud en todo el mundo a través del tiempo y en todas las culturas. Hoy en día, alrededor del 80% de la población del mundo confían sobre medicamentos tradicionales a base de plantas, para cuidar su salud primaria.<sup>2</sup>

La actividad farmacológica del extracto de plantas muchas veces es debido a la acción combinada de más de un principio activo y es posible que estos extractos puedan inhibir el crecimiento de cepas resistentes y multirresistentes, por ello es necesario el estudio de los principios activos de las diferentes partes anatómicas de las plantas para mejorar el conocimiento de la actividad biológica y su aplicación en el control de microorganismos como una estrategia de importancia económica y social.<sup>3</sup>

*Matricaria chamomilla* es una de las más antiguas hierbas medicinales conocidas por la humanidad, existen dos variedades comunes; manzanilla alemana (*Chamomilla recutita*) y la manzanilla romana (*Chamaemelum nobile*).<sup>4</sup>

*Matricaria chamomilla* es una planta herbácea que pertenece a la familia Asteraceae, formada con tallo cilíndrico, erguido, ramoso, de hasta 50 o 60 cm de altura con hojas divididas de segmentos estrechos. Presenta hojas alternas y sésiles. Las flores forman una cabezuela amarilla hueca con lígulas blancas.<sup>5,6</sup>

Es una planta nativa de Europa y de regiones templadas de Asia, que se ha habituado en algunas regiones de América, África y Australia.<sup>7</sup> Crece con facilidad en suelo con buen drenaje, bastante sol; resiste heladas, escasez de nutrientes y la acidez del suelo.<sup>8</sup> Es una planta nativa y resistente a cambios climáticos con fácil adaptación geográfica.<sup>9</sup>

*Matricaria chamomilla* pertenece a un grupo importante de plantas con un gran número de especies terapéuticamente provechosas y clases de compuestos activos: Sesquiterpenos, flavonoides, cumarinas, y los poliacetilenos los cuales son considerados como los más importantes constituyentes de la manzanilla.<sup>10,11</sup>

La propiedad antibacteriana de la manzanilla es atribuida principalmente al bisabolol que forma parte de su composición química, sin embargo, tanto los flavonoides, cumarinas y los sesquiterpenos en general, presentes en la manzanilla, muestran también actividad antimicrobiana.<sup>8</sup>

El principal mecanismo de acción antibacteriano de la *Matricaria chamomilla* es la disrupción de la membrana celular bacteriana, el cual es posible mediante tres vías: aumentando su permeabilidad a pequeños iones, afectando la estabilidad estructural y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica.<sup>12</sup>

*Escherichia coli* pertenece a un grupo de bacterias que se encuentran en el intestino del ser humano y animales, siendo, la gran mayoría, inocuas en ellos. Sin embargo, hay algunas cepas de *Escherichia coli* productoras de toxinas, llamadas verotoxinas o toxinas de tipo Shiga que pueden causar síntomas que van desde diarrea acuosa a colitis hemorrágica grave, mientras que otras pueden causar infecciones extra-intestinales, incluyendo aquellas patologías asociadas con el tracto urinario o problemas sistémicos, tales como septicemia.<sup>13, 14</sup>

*Escherichia coli* es una bacteria Gram-negativa miembro de la familia Enterobacteriaceae, una familia numerosa que incluye *Salmonella*, *Klebsiella*,

*Proteus* y *Enterobacter spp.* Son anaerobios facultativos, móvil por flagelos peritricos (que rodean su cuerpo), no forma esporas, es capaz de fermentar glucosa y lactosa, y manifiesta una gran diversidad en fenotipo y genotipo. El genoma de *E. coli* sufre un cambio constante debido a un flujo continuo de inserciones y deleciones.<sup>13,15</sup>

Las cepas de *Escherichia coli* pueden estructurarse ampliamente en tres familias: organismos comensales que son residentes normales del tracto gastrointestinal que no causan enfermedad, cepas que causan cuadros intestinales diarreicos (*E. coli* enteropatógena, *E. coli* enterotoxigénica, *E. coli* enterohemorrágica o verotoxigénica, *E. coli* enteroagregante, *E. coli* enteroinvasivo y *E. coli* adherente), y cepas que generalmente causan patologías fuera del intestino (agrupados bajo el término patógenos extra-intestinales).<sup>16</sup>

Las cepas que en su mayoría causan patologías fuera del intestino (agrupados bajo el término patógenos extra-intestinales) son responsables de aproximadamente el 80% de las infecciones de tracto urinario adquirida en la comunidad y el 30% de las infecciones urinarias nosocomial adquirida. Las infecciones en los niños son a menudo debido a obstrucciones en el tracto urinario, lo que resulta en charcos de orina estancada.<sup>17</sup>

Como todas las bacterias Gram negativas, la cubierta de *Escherichia coli* consta de tres elementos: cápsula, pared celular y membrana plasmática. Una pared celular está constituida de membrana externa y poco peptidoglicano. Esta última estructura brinda a la bacteria su forma y rigidez, y le permite resistir presiones osmóticas ambientales relativamente aumentadas.<sup>18</sup>

*E. coli* fue diseñado principalmente sobre la base de la identificación serológica de antígenos O (lipopolisacárido, LPS), H (flagelar) y K (de la envoltura y cápsula, termoestables y termolábiles). Aproximadamente 186 tipos diferentes de antígeno O y 53 antígenos H han sido reconocidos.<sup>19,20</sup>

La resistencia antibiótica a nivel mundial es un problema producido por el uso indiscriminado de antibióticos y en el caso de las Enterobacteriaceae, este

problema está en aumento, generando falla en el tratamiento, desarrollo de bacteremia, requerimiento de terapia endovenosa, hospitalización y estancia hospitalaria prolongada; además existen otros factores que pueden predisponer a la resistencia como: edad mayor a 60 años, presentar ITU recurrente, presentar una condición médica crónica, tratamiento antibiótico u hospitalizaciones recientes.<sup>21</sup>

*Escherichia coli*, presenta varios mecanismos de resistencia a diversos antibióticos, siendo el productor de Betalactamasa de Espectro Extendido (BLES) uno de los más importantes, cuya codificación se da principalmente por los genes CTX-M, TEM, OXA y SHV, que son los más comunes en la familia de Enterobacteriaceae, sabiendo que tienen un alto fracaso en su tratamiento, debido a la capacidad que presentan de inactivar antibióticos B- lactámicos, incluyendo las generaciones de oximino-cefalosporinas.<sup>22, 23</sup>

La gentamicina es un antibiótico aminoglucósido con acción bactericida, bajo condiciones aeróbicas. Interfiere con la síntesis proteica. La actividad bactericida disminuye en condiciones anaeróbicas y de hiperosmolaridad (como ocurre, respectivamente, en un absceso y en la orina ácido hiperosmolar). El antibiótico se une a la subunidad 30S de los ribosomas bacterianos, produciendo un complejo de iniciación 70S de carácter no funcional.<sup>24</sup>

Es un antibiótico de amplio espectro, actúa preferentemente sobre bacterias Gram-negativas, incluyendo enterobacteriáceas y *Pseudomonas*. El espectro de actividad in vitro de la gentamicina incluye los siguientes microorganismos: Gramnegativos: *Escherichia coli*, *Proteus spp*, *Providencia spp*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Serratia spp*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Yersinia pestis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*. La CMI de gentamicina frente a *Serratia spp* es dos veces menor que la de los demás aminoglucósidos y se considera que es el aminoglucósido de elección en las infecciones ocasionadas por esta bacteria.<sup>25, 26</sup>

La actividad antibacteriana del extracto de plantas muchas veces es debido a la acción combinada de más de un principio activo y es posible que estos extractos

puedan inhibir el crecimiento de cepas resistentes y multirresistentes, por ello es necesario el estudio de los principios activos de las diferentes partes anatómicas de las plantas para mejorar el conocimiento de la actividad biológica y su aplicación en el control de microorganismos como una estrategia de importancia económica y social.<sup>27</sup>

Se demostró efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) sobre bacterias Gram negativas, siendo una de ella *Escherichia coli*, demostrando el mejor efecto inhibitor a la concentración del 100%.<sup>28</sup>

Al haber revisado diferente bibliografía en relación a extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “manzanilla” sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y habiendo encontrado muy escasa investigación al respecto, nos ha motivado realizar una búsqueda con el fin de brindar información a posteriores trabajos y así se puedan desarrollar mejores alternativas en cuanto al tratamiento de las enfermedades que el agente pueda causar.

Existen escasos trabajos de la actividad antibacteriana contra Gram negativos, siendo uno de ellos los estudios de Zuta N. (2014), quienes investigaron el efecto medicinal de fenoles y alcaloides sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* demostrando la actividad inhibitoria contra estos tipos de bacterias patógenas, para lo cual evaluaron diferentes concentraciones: 10%, 25%, 50% y 100%, solo encontrando efecto inhibitorio a una concentración al 100%.<sup>29</sup>

Condori K, Apaza M (2018). Quienes investigaron efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico e infusión de *Tiquil tiquil* (*Aloysia triphylla*) vs manzanilla (*Matricaria chamomilla*) sobre las cepas de *Prevotella intermedia* PUNO, concluyendo que todos los tratamientos tienen efecto inhibitorio in vitro, el mejor efecto inhibitor se da con el tratamiento de extracto etanólico de manzanilla al 100% a las 24 horas siendo (12.53 mm su promedio de halo inhibitorio) en relación al tratamiento con extracto etanólico *Tiquil tiquil* al 100% a las 24 horas (cuyo promedio de halo inhibitorio fue 11.48mm). El menor efecto del halo de

inhibición se dio con el tratamiento de infusión de *Tiquil tiquil* al 25% a las 48 horas con un promedio de 6.24mm.<sup>28</sup>

Ocaras M. (2014), quien investigó la acción antimicrobiana de extractos crudos de especies de plantas nativas sobre *Escherichia coli* y *Salmonella spp* concluyeron que los extractos etanólicos de hoja de Lingue (*Persea lingue*), Ñirre (*Nothofagus antártica*), Manzanilla (*Matricaria chamomilla*), Picha (*Myrceugenia planipes*) y Meli (*Amomyrtus meli*) presentaron actividad antimicrobiana frente a todas las cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella* utilizados en este estudio.<sup>30</sup>

Borja V. (2017), demostró que existe efectividad inhibitoria del extracto de manzanilla, extracto de llantén y la combinación del extracto de manzanilla y llantén sobre cepa de *Porphyromona gingivalis*; comparando así su potencial inhibitorio en la medición de sus halos de inhibición, obteniendo un promedio de efectividad de 10,20mm para el extracto de manzanilla, 12,47mm para el extracto de llantén, y 16,57mm para la combinación del extracto de manzanilla y llantén; así como una media de 17,60mm para el control positivo clorhexidina al 0.12%.<sup>31</sup>

## 1.2. JUSTIFICACIÓN:

En estas últimas décadas existe alarma en la población por resistencia a los antibióticos para tratar infecciones con *Escherichia coli*, En general, la multirresistencia se ha desarrollado debido al uso indiscriminado de antibióticos comúnmente utilizados para tratar las enfermedades infecciosas. Esta situación, así como la aparición de efectos indeseables de ciertos antibióticos, han motivado a investigar nuevas sustancias antimicrobianas a partir de plantas consideradas popularmente medicinales, considerando importante la realización de esta investigación con la finalidad de comprobar si existe efecto inhibitorio de *Matricaria chamomilla* sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922.<sup>32</sup>

Teniendo en cuenta que algunos fármacos antimicrobianos como penicilinas, cefalosporinas, entre otros, pueden causar alergias o intoxicaciones, por lo que es necesario buscar otra alternativa terapéutica basada en el uso de plantas medicinales como es *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” que tiene efecto antibacteriano para tratar infecciones con *Escherichia coli*.

## 2. FORMULACIÓN DE PROBLEMA CIENTÍFICO:

¿Existe efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922?

## 3. OBJETIVOS:

### 3.1. OBJETIVO GENERAL:

- Evaluar si existe efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922.

### 3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Evaluar la actividad inhibitoria del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a través de la prueba de difusión en agar Müller Hinton.
- Calcular la concentración mínima bactericida del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922.

## 4. HIPOTESIS

### 4.1. HIPOTESIS NULA (H<sub>0</sub>):

No existe efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922.

### 4.2 . HIPÓTESIS ALTERNATIVA (H<sub>1</sub>):

Si existe efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922.

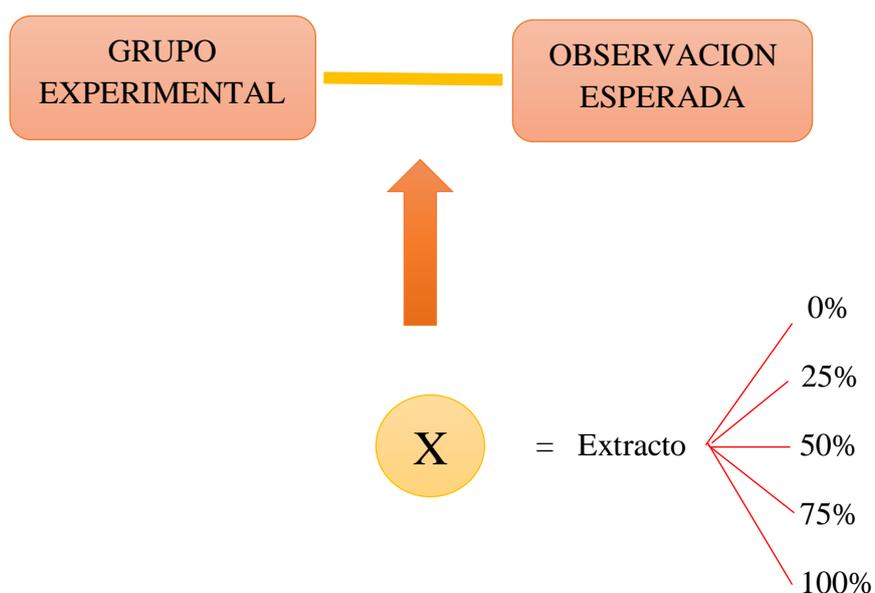
## II. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. DISEÑO DEL ESTUDIO

El estudio fue de tipo Experimental, Transversal prospectivo.

<b>TIPO DEL ESTUDIO</b>	En función de la interferencia del investigador en el fenómeno que se realiza.	Mide una o más variables en un momento dado.	En relación al periodo de captación de la información.
	EXPERIMENTAL	TRANSVERSAL	PROSPECTIVO

### 2.2. DISEÑO ESPECIFICO:



## 2.3. POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO:

### ➤ POBLACIÓN:

- **POBLACIÓN DIANA O UNIVERSO:** Conjunto de cultivos de la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922.

### CRITERIOS DE SELECCIÓN:

- **CRITERIOS DE INCLUSIÓN:**

Placas Petri y tubos con cultivos de *Escherichia coli* ATCC 25922 con unidades formadoras de colonia.

Cultivos que no se contaminaron.

- **CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:**

Placas Petri con cultivos en las que no hubo crecimiento bacteriano.

Frascos, discos y tubos de ensayo que se rompan durante la investigación.

Cultivos que se contaminaron.

### ➤ MUESTRA Y MUESTREO

- **UNIDAD DE ANALISIS**

Cada placa Petri y tubo de ensayo con cultivo de *Escherichia coli* expuesto a *Matricaria chamomilla*.

- **UNIDAD DE MUESTREO**

Placa con unidades formadoras de colonias de *Escherichia coli* expuesta al extracto etanólico de *Matricaria chamomilla*.

- **TAMAÑO MUESTRAL**

El número de muestra se calcula con la siguiente fórmula estadística:

$$n = \frac{2 (Z\alpha + Z\beta)^2 S^2}{(X1 - X2)^2}$$

Siendo  $n$  = el número de repeticiones a efectuar en cada investigación.

$$Z_{\alpha} = 1.96 \text{ para } \alpha = 0,05$$

$$Z_{\beta} = 0.84 \text{ para } \beta = 0.20$$

$S = 0.8 (X1 - X2)$ , valor asumido por no haber estudios previos.

$n = 10$ , siendo “ $n$ ” el número de observaciones totales, por lo tanto, se utilizarán 10 repeticiones para cada concentración de *Matricaria chamomilla* “manzanilla”, al igual que para el control interno Gentamicina 10ug.

10 repeticiones para un control (-) etanol

10 repeticiones a una concentración de 25%

10 repeticiones a una concentración de 50%

10 repeticiones a una concentración de 75%

10 repeticiones a una concentración de 100%

10 repeticiones para un control interno Gentamicina 10ug.

## 2.4. DEFINICIÓN OPERACIONAL DE VARIABLES

VARIABLE	VARIABLES	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICION	INDICADOR
<b>INDEPENDIENTE</b>	Extracto etanólico de <i>Matricaria chamomilla</i> “Manzanilla”	CUANTITATIVA	NOMINAL	25 % 50 % 75 % 100 %
<b>DEPENDIENTE</b>	<i>Crecimiento de Escherichia coli</i>	CUANTITATIVA	DE RAZON	UFC/ml

## DEFINICIONES CONCEPTUALES Y OPERACIONALES

	CONCEPTUAL	OPERACIONAL
<b>INDEPENDIENTE</b>		
<b>EXTRACTO ETANOLICO DE MATRICARIA CHAMOMILLA “MANZANILLA”</b>	Un extracto es una sustancia obtenida por extracción de una parte de <i>Matricaria chamomilla</i> , a menudo usando un solvente como etanol o agua.	Sustancia capaz de producir una alteración en las estructuras de <i>Escherichia coli</i> capaz de inhibir su crecimiento alterando su viabilidad y capacidad de supervivencia.

<b>DEPENDIENTE</b>		
<b>CRECIMIENTO DE <i>ESCHERICHIA COLI</i></b>	Propagación de una bacteria Gram negativo en condiciones in vitro proporcionándole temperatura y nutrientes necesarios para proliferar.	Número de unidades formadoras de colonias y turbidez en medio líquido como los caldos.

### **EFECTO INHIBITORIO ANTIBACTERIANO IN VITRO SOBRE CEPA DE *ESCHERICHIA COLI***

Capacidad para inhibir el crecimiento o producir la muerte de la bacteria en condiciones experimentales, determinado mediante la medición del crecimiento del microorganismo en placas Petri y comparado por halos de inhibición.

#### **HALOS DE INHIBICIÓN**

Zona alrededor del disco donde una sustancia antibacteriana es capaz de impedir el crecimiento de *Escherichia coli* al cabo de 18 a 24 horas de incubación.

## **2.5. PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS:**

### **a) De la aprobación del proyecto:**

Para la realización del presente estudio experimental fue necesario la obtención del permiso para la ejecución mediante la aprobación del proyecto por el Comité Permanente de Investigación Científica de la Escuela de Medicina de la Universidad Privada Antenor Orrego con la correspondiente Resolución Decanal.

### **b) Autorización para la ejecución:**

Se solicitó la autorización de la Facultad de Medicina de la Universidad Privada Antenor Orrego para ejecutar el proyecto y utilizar el Laboratorio de Microbiología y Parasitología. (ANEXO N°1)

### **c) Obtención de la manzanilla:**

Se recolectaron 8 kg de flores de manzanilla, del distrito de Otuzco, provincia de Otuzco, región La Libertad.

La recolección de la manzanilla se realizó por el método convencional de herborización, seleccionando el material en el campo, a horas de la mañana, verificando que este en buenas condiciones.

### **d) Identificación y determinación taxonómica de la especie vegetal:**

Un ejemplar completo de la especie vegetal se llevó al Herbario de la Universidad Privada Antenor Orrego para su identificación taxonómica según el sistema filogenético de la especie. (ANEXO N°2)

e) **Preparación de la muestra vegetal** <sup>33</sup>

- **Selección:** Una vez recolectadas las flores de manzanilla, se procedió a seleccionar las flores que estén en buenas condiciones, que no tengan ataques de hongos, ni estén decoloradas y marchitadas.
- **Lavado y Secado:** Se lavaron las flores con agua destilada y se extendió en papel Kraft. Posteriormente se llevó a una estufa de circulación de aire por convección forzada (40 °C) por 48 horas.
- **Tamizaje:** Una vez secas las flores se procedió a desmenuzar manualmente y se pasó a través de un set de tamices hasta obtener el tamaño de partículas adecuadas
- **Almacenamiento:** Las flores tamizadas se almacenaron adecuadamente en frascos de vidrio ámbar en un lugar desprovisto de humedad y luz directa, hasta su posterior utilización.

f) **Obtención del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla”:**

En un envase estéril de vidrio ámbar de boca ancha de 1 litro de capacidad, se colocaron 100 g de flores desecadas y tamizadas. Luego, se añadió etanol al 70% cantidad suficiente hasta cubrir la muestra por sobre 2 cm de altura. Se mezcló bien, teniendo en cuenta que la mezcla debe ocupar como máximo las  $\frac{3}{4}$  partes del recipiente. Se tapó el recipiente y se maceró en ausencia de luz por 7 días, agitándose 10 minutos, dos veces al día.

Transcurrido el tiempo de maceración, se filtró el líquido al vacío, con papel de filtro Whatman N°1. A continuación, el extracto etanólico se concentró en un rotavapor a presión reducida y temperatura controlada, no mayor a 40°C. Finalmente, el extracto se colocó en cápsulas de porcelana y se llevó a secar a la estufa a 40°C. Al producto resultante se le denominó extracto seco. A partir de este extracto seco se prepararon las concentraciones de 25%, 50%, 75% y 100% disueltas en etanol al 70%. Finalmente, los extractos etanólicos

se guardaron en frascos de vidrio de color ámbar y en refrigeración (4-8°C) hasta su utilización microbiológica.

### **PRUEBAS DE SUSCEPTIBILIDAD:**

#### **a) Obtención de la cepa:**

En este estudio se utilizó una cepa estandarizado de *Escherichia coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25922 la cual se obtuvo de Genlab del Perú y se conservó en la nevera del laboratorio de microbiología de la facultad de medicina de la Universidad Privada Antenor Orrego. (ANEXO N°3)

#### **b) Preparación del inóculo:**

Una vez obtenida la cepa, con un hisopo estéril, se cultivó en tubos de ensayo el cual contuvo caldo pectonado, activando así la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Activada la cepa, esta se cultivó en placa Petri conteniendo el medio de Agar McConkey para aislamiento de la cepa.

Se sembró la cepa en McConkey y se incubó a 37° por un tiempo de 24 horas, realizando la lectura y observando crecimiento de colonias grosella (lactosa +). A partir de las colonias que crecieron se realizó la resiembra hacia el medio de TSI para favorecer la identificación de *Escherichia coli* ATCC 25922.

#### **c) Estandarización del inóculo:**

Con un asa bacteriológica se tomaron muestras del medio Agar McConkey (colonias), realizando una suspensión homogénea en solución salina fisiológica estéril 2ml y se comparó con nefelómetro del patrón 0,5 de la escala McFarland equivalente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml de *Escherichia coli*, esta comparación se llevó a cabo visualmente utilizando un fondo blanco, fuente de luz adecuada.

**d) Inoculación en placas:**

Se introdujo un hisopo estéril en la suspensión, se embebió con la cepa aislada, se eliminó el exceso (apretando el algodón contra la pared del tubo de ensayo) mediante un movimiento rotatorio por encima del nivel del líquido.

A una distancia de 10 cm alrededor de la llama del mechero, se sembró en toda la superficie del medio en placas Petri conteniendo Agar Müller Hinton, se sembró uniformemente sobre toda la superficie del agar, girando cada placa 30 grados 10 veces aproximadamente, hasta conseguir una siembra uniforme. Las placas recién sembradas fueron incubadas a 37° por 24 horas.

**e) Prueba del efecto antibacteriano:**

Para determinar la susceptibilidad se utilizó el método de difusión en pozo de Agar, el cual consistió en realizar pocitos de 4 mm de diámetro en el Agar Müller Hinton por medio de un sacabocado.

Posteriormente se adicionó a cada pocito por medio de pipetas Pasteur 0,5 ml del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” en sus diversas concentraciones sobre las placas con el cultivo de *Escherichia coli*, se mantuvo la placa en la misma posición por un periodo de 1 hora.

A continuación, las placas se invirtieron y luego se incubaron a una temperatura de 37°C por un tiempo de 24 horas.

La lectura se llevó a cabo a las 24 horas haciendo uso de una regla milimetrada. Se efectuó tomando el registro en milímetros de los halos de inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*.

## **DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB):**

Para determinar la concentración mínima bactericida del *Matricaria chamomilla* “manzanilla” se realizó los siguientes pasos. Se prepararon diluciones en tubos de ensayo conteniendo solución salina más las concentraciones de *Matricaria chamomilla* “manzanilla” 25%, 50%, 75% y 100%.

Después del proceso de dilución se colocaron en tubos de 13 por 100 ml, 0.8 ml de cada concentración más un inóculo de 0.2 ml de los cultivos con la cepa preparada. También se prepararon los grupos control interno con 0.8 ml de Gentamicina y 0.2 ml de la cepa de *Escherichia coli*.

Todos los tubos se llevaron a incubación a 37°C por un tiempo de 24 horas. La determinación de la concentración mínima bactericida se realizó luego de 24 horas empleando Agar Müller Hinton para *Escherichia coli* tomando 0.1 ml de cada uno de los tubos y dispersándolo en toda la placa para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC) utilizando el asa de Driglasky.

Después del sembrado todos los cultivos fueron llevados a incubación a 37°C por 48 horas, después se realizó el conteo de las colonias en cada una de las placas. La concentración mínima bactericida fue aquella en la que se inhibía completamente el desarrollo de los gérmenes.

### **5.5. PLAN DE ANÁLISIS DE DATOS**

El procesamiento de la información fue automático y se utilizó una computadora Pentium IV con Windows SEVEN y el Software estadístico SPSS versión 22.

- **Estadística descriptiva:** Para analizar la información se construyeron tablas de distribución de frecuencias de una entrada con sus valores absolutos. Se calculó su media y su desviación estándar.

- **Estadística analítica:** Para determinar el efecto *in vitro* del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* sobre cepa de *Escherichia coli*, se utilizó un análisis de varianza de un diseño completamente aleatorizado con la prueba de Kruskal-Wallis, luego se hizo una prueba de comparaciones múltiples: Prueba Mann - Whitney con ajuste de Bonferroni, ambas con un nivel de significancia del 5%. Todos estos datos fueron procesados de manera automatizada con el soporte del software estadístico SPSS versión 22.

#### **CONSIDERACIONES ÉTICAS:**

- Se solicitó aprobación previa para la ejecución del proyecto de investigación por parte del comité de Bioética de la Universidad Privada Antenor Orrego.
- Para la realización de la investigación se tendrá en cuenta las medidas de bioseguridad de los investigadores, así como los principios 11 y 13 de la declaración de Helsinki, los artículos 49 y 50 de la ley general de salud que establecen normas para los recursos terapéuticos naturales y se tomaran en cuenta los artículos 42 – 48 del código de ética y deontología del Colegio Médico del Perú, al respecto de los trabajos de investigación.<sup>34, 35, 36</sup> (ANEXO N° 4)

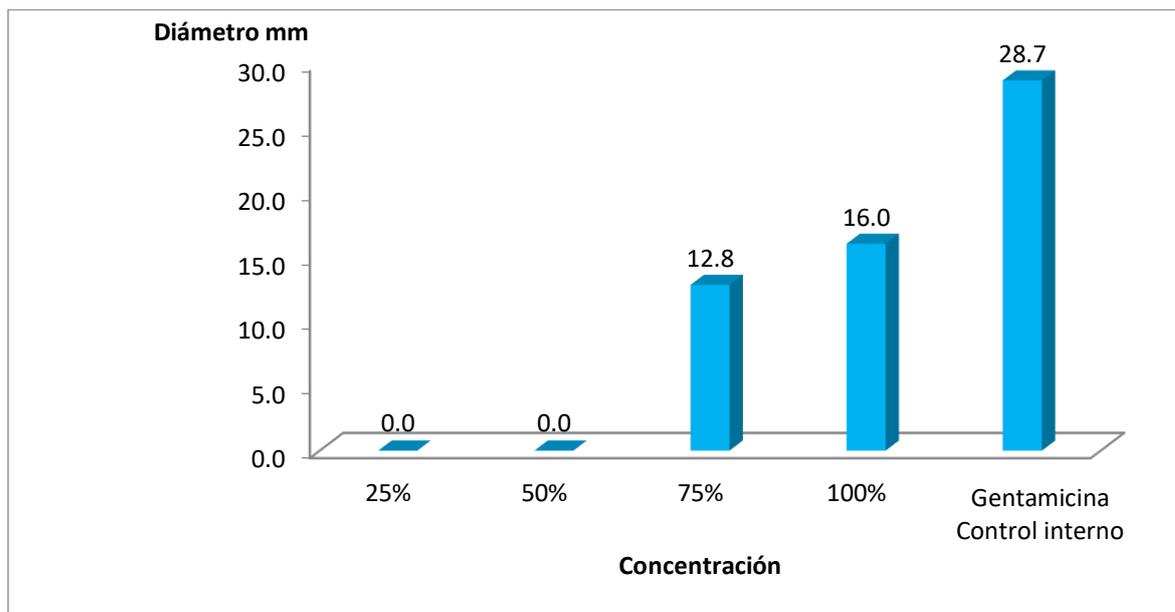
### III. RESULTADOS

En primer lugar; se procedió a evaluar de forma cualitativa el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922; para ello, se emplearon placas petris con Agar Müller Hinton ante lo cual se expusieron distintas concentraciones de los extractos etanólicos y los resultados son los que se muestran en la Figura 1.

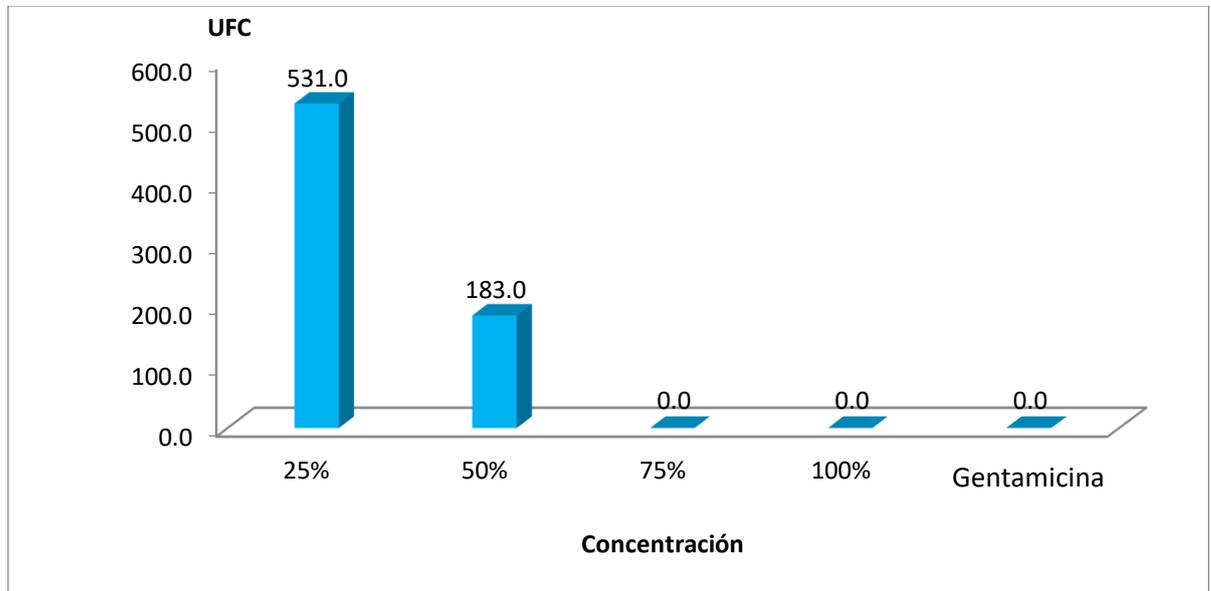
Consecuencia de lo anterior, observamos que a las 24 horas se genera un mayor halo de inhibición para el control interno que fue establecido con Gentamicina 10µg siendo de  $28,70 \pm 0.79$ mm para la media y desviación estándar respectivamente; sin embargo, no obstante de los extractos etanólicos, el que mostró mayor actividad en función al halo de inhibición fue para las concentraciones de 75% y 100%, obteniendo  $12.80 \pm 0.79$ mm y  $16.00 \pm 1.05$ mm para la media y desviación estándar respectivamente.

Así mismo; en la prueba de difusión en Agar Müller Hinton, se determinó que bajo las concentraciones de 25% y 50% del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, no hubo formación de halos de inhibición.

El efecto inhibitorio *in vitro* de concentraciones de extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, en relación a la concentración mínima bactericida como se muestra en la Figura 2; corresponde al 75% ya que las concentraciones del 75%, 100% y el control interno de Gentamicina no reportan crecimiento, mientras que para las concentraciones de 25% y 50% se evidencia crecimiento microbiano, registrándose  $531 \pm 134$  y  $183 \pm 54$  UFC para la media y desviación estándar respectivamente.



**Figura 1. Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 a través del diámetro del halo de inhibición.**



**Figura 2. Determinación de la concentración mínima bactericida del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922.**

#### IV. DISCUSIÓN

Se sabe que la medicina tradicional juega un rol importante en la actualidad, y que es parte de nuestra labor conocer las propiedades de las plantas medicinales. Estas plantas, por medio de sus extractos, han demostrado tener efecto antibacteriano *in vitro*.<sup>37</sup> Por lo cual se han usado diferentes tipos de extractos y a diversas concentraciones para poder evaluar su efecto sobre diversos patógenos.

El presente estudio demostró el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” a concentraciones de 75 % y 100 % sobre cepas ATCC de *Escherichia coli* 25922, utilizando el Método de difusión en Pozo de Agar.

Para las concentraciones del 25% y 50% del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922, no hubo formación de halos de inhibición.

Con respecto a la concentración del 75% del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922, se obtuvo un diámetro del halo de inhibición de  $12.80 \pm 0.79$ mm para la media y desviación estándar respectivamente; así mismo para la concentración del 100% la media y desviación estándar del diámetro del halo de inhibición es de  $16.00 \pm 1.05$ mm respectivamente. La gentamicina reporta valores de un diámetro de  $28.70 \pm 1.34$ mm para la media y desviación estándar respectivamente, se aprecia que el mayor promedio dado fue con la concentración al 100% y con el control interno Gentamicina 10ug.

En este caso se usó la prueba no paramétrica, Kruskal-Wallis, la cual determino que por lo menos uno de estos resultados presentó diferencia significativa con respecto a los demás.

Luego de ello se hizo una comparación de grupos, con la prueba de Mann – Whitney con ajuste de Bonferroni, evidenciándose que no había diferencia significativa entre grupos contiguos, pero si en grupos alejados como de 25% con el de 75% y 100%; y el de 50% con

el de 100%, así mismo la Gentamicina fue significativamente diferente a todos los grupos del extracto etanólico.

El efecto inhibitorio in vitro de concentraciones de extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922, en relación a la concentración mínima bactericida corresponde al 75% ya que las concentraciones del 75%, 100% y el control interno de Gentamicina no reportan casos con UFC, las concentraciones de 25% y 50% se evidencia UFC siendo  $531 \pm 134$  y  $183 \pm 54$  UFC para la media y desviación estándar respectivamente.

El principal efecto inhibitorio de *Matricaria chamomilla* se debería a las diferentes clases de compuestos activos: Sesquiterpenos, flavonoides, cumarinas, y los poliacetilenos los cuales son considerados como los más importantes constituyentes de la manzanilla.<sup>10,11</sup> La propiedad antibacteriana de la manzanilla es atribuida principalmente al bisabolol que forma parte de su composición química, sin embargo, tanto los flavonoides, cumarinas y los sesquiterpenos en general, presentes en la manzanilla, muestran también actividad antimicrobiana.<sup>8</sup>

Condori K. Apaza M. (2018). Mostraron los resultados del halo de inhibición según el tratamiento el extracto etanólico de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) en concentraciones de: 25%, 50%. 75% y 100 a las 24 y 48 horas; sometiendo sus datos a la prueba estadística de t, resultando que el mayor promedio halo de inhibición se registró en el tratamiento con extracto etanólico de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) a una concentración del 100% a las 24 horas con 12.53 mm de halo de inhibición, el menor promedio lo tiene el extracto etanólico de manzanilla (*Matricaria chamomilla*) al 25% a las 48 horas con 7.62 mm de halo de inhibición. Así mismo en el presente trabajo solo se obtuvo efecto inhibitorio del crecimiento de *Escherichia coli* a las concentraciones de 75% y 100% mas no a las concentraciones de 25% y 50% coincidiendo parcialmente con la investigación mencionada anteriormente.<sup>28</sup>

En el trabajo realizado por Ocaras M. (2012), quien investigó la acción antimicrobiana de extractos crudos de especies de plantas nativas sobre *Escherichia coli* y

*Salmonella spp* concluyeron que los extractos etanólicos de hoja de Lingue (*Persea lingue*), Ñirre (*Nothofagus antártica*), Manzanilla (*Matricaria chamomilla*), Picha (*Myrceugenia planipes*) y Meli (*Amomyrtus meli*) presentaron actividad antimicrobiana frente a todas las cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella* utilizados en este estudio. De igual forma en el presente trabajo se encontró actividad antimicrobiana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.<sup>30</sup>

Zuta N. (2014), investigó el efecto medicinal de fenoles y alcaloides sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* demostrando la actividad inhibitoria contra estos tipos de bacterias patógenas, evaluando diferentes concentraciones: 10%, 25%, 50% y 100%, solo encontrando efecto inhibitorio a una concentración al 100%, coincidiendo parcialmente con la presente investigación, ya que los resultados obtenidos demostraron efecto inhibitorio a las concentraciones del 75% y 100%.<sup>29</sup>

El efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre el crecimiento de *Escherichia coli*, ha mostrado ser efectivo, como las elaboradas en otras investigaciones, surgiendo la posibilidad de que existan más variedades de plantas que tengan esta capacidad antimicrobiana, por lo que se inducirá que existe una gran capacidad terapéutica por parte de las plantas, especialmente de la manzanilla, por lo que es necesario realizar más investigaciones sobre las propiedades y principios activos de esta planta.

## V. CONCLUSIONES

1. La evaluación de la actividad inhibitoria del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” por medio de la prueba de difusión en Agar Müller Hinton, resultó un buen método para determinar la Concentración mínima bactericida.
1. La concentración mínima bactericida del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 fue de 75 %.

## VI. RECOMENDACIONES

- De los resultados obtenidos deberían de ahondar las investigaciones pretendiendo determinar a futuro los principios activos que constituyen la actividad antimicrobiana de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla”.
- Seguir realizando pruebas in vivo para valorar la efectividad y toxicidad de los componentes activos de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” así como la dosis terapéutica y la concentración óptima para ser utilizado como un producto natural para la población humana.
- Realizar otros estudios para ampliar el espectro de actividad antimicrobiana de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla”.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Jauregui G. Efecto antibacteriano in vitro del colutorio a base del colutorio a base de *Matricaria chamomilla* “manzanilla” a diferentes concentraciones sobre la cepa ATCC 2652263 de *Streptococcus*. Tesis para optar el grado de bachiller en estomatología. Trujillo- Perú. Universidad Nacional de Trujillo. 2013
2. Benavides V, Arrigo G, Pino J. Effects of aqueous extract of *Orriganum vulgare* L. on the preimplantational mouse embryos. *Rev. Perú. Biol* 2014; 17(3): 381 – 384.
3. Miraj S, Alesaeidi S. A systematic review study of therapeutic effects of *Matricaria recuita* chamomile (chamomile). *Electronic Physician*. September 2016; 8(9): 3024-3031.
4. Srivastava. J, Shankar E, Gupta S. Chamomile: A herbal medicine of the pastwith a bright future. *Mol Med Report*. 2016 November 1; 3(6): 895–901.
5. Rall A, Arak E, Orav A, et al. Comparación de aceites esenciales de *Matricaria recutita* L. de origen diverso. *Ars Pharmaceutica*, 44:2; 159-165, 2013.
6. Pardo M, Morales R. Manzanillas ibéricas: Historia y usos tradicionales. Facultad de ciencias. Universidad autónoma de Madrid. *Revista de Fitoterapia* 2015; 6(2): 143-153.
7. Pérez L, Macías C, Beatriz B, et al. Efecto *in vitro* de la *Matricaria recutita* L. sobre la respuesta de linfocitos y neutrófilos. *Revista cubana hematología, inmunología y hemoterapia*. 2012; 28(2): 177-184.
8. Cosco D. Actividad inhibitoria del crecimiento de *Streptococcus mutans* y de flora mixta salival por acción de aceite esencial de la *Matricaria chamomilla* “Manzanilla”. Tesis para optar el título de Cirujano Dentista. Lima- Perú. Universidad Mayor de San Marcos. 2010
9. Ugarte M, Reyes s, Paredes L. La manzanilla y sus propiedades medicinales. *Revista de investigación e información en salud*. 2015; 10(23): 54-58.
10. Singh O, Khanam Z, Misra N, et al. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacognosy Reviews*. 2016; 5(9): 82-95.
11. Agatonovic S, Babazadeh K, Ortakand D, et al. Rapid evaluation and comparison of natural products and antioxidant activity in calendula, feverfew, and German chamomile extracts. *Journal of Chromatography A*. 2015; 1385(2): 103-110.

12. Lngianna J, Gambassi E. Mecanismo de la acción antiespasmódica intestinal de las flores de *Matricaria chamomilla* L. *Revista de Biología Tropical*. 2015; 134(23): 85-90.
13. Abbas A. *Academic Scientific Journals*. [Online]. [cited 2014 febrero 15]. Available from: <http://www.iasj.net/iasj?func=fulltext&al d=51574>.
14. Elikagaien N, Fundazioa E. *Escherichia coli*. Fundación Vasca para la seguridad Agroalimentaria. 2013; 56(9): 1-5.
15. Torres A. *Escherichia coli* diseases in Latin America ‘One Health’ multidisciplinary approach. *Journals investing in science*. 2 February 2017; 75(2): 1-7.
16. Gao q, Zhang D, Zhengqin Y, et al. Virulence traits and pathogenicity of uropathogenic *Escherichia coli* isolates with common and uncommon O serotypes. *Microbial pathogenesis*. 2017; 47(2): 1-34.
17. Poolman J. *Escherichia coli*. Elsevier International Encyclopedia of Public Health, 2017; 26(5): 585-593.
18. Makvana S, Krilov L. *Escherichia coli* Infections. *Suny Health Sciences*. 2015; 36(4): 1-8.
19. Contreras G, Jaimes T, Perez E, et al. Comprehensive expression analysis of pathogenicity genes in uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Elsevier Microbial Pathog*. 2017 Feb; 103:1-7.
20. Allocati N, Masulli M, Alexeyev M. *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2013 Nov 25;10(12):6235-54.
21. Bader MS, Loeb M, Brooks AA. An update on the management of urinary tract infections in the era of antimicrobial resistance. *Postgrad Med*. 17 de febrero del 2017; 129 (2): 242 – 58
22. Kar D, Bandyopadhyay S, Dimri U, Mondal DB, Nanda PK, Das AK, et al. Antibacterial effect of silver nanoparticles and capsaicin against MDR-ESBL producing *Escherichia coli*: An in vitro study. *October 2016*; 6 (10): 807 – 10.
23. Korzeniewska E, Korzeniewska A, Harnisz M. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emisión to the environment. *Ecotoxicol Environ Saf*. Mayo del 2013; 91(9): 96 – 102.
24. Croxen M, Law R, Scholz R, et al. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Rev* 2013 Oct;26(4):822-880.

25. Volfredo J, Camacho A. Los antimicrobianos en la práctica médica. Rev de Biología Tropical. 2017; 436(8): 1-172.
26. Chávez M, Salazar M, Cabrera C. et al. Bacterias resistentes a los antibióticos en infecciones nosocomiales de un hospital en Colombia. Enf inf microbiol 2012 33 (1): 19-25.
27. Idil N, Candan ED, Rad AY. High trimethoprim-sulfamethoxazole resistance in ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infection. Minerva Biotecnol. 28 de septiembre del 2016; 28 (3): 159-63
28. Condori K, Apaza M. "Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico e infusión de Tiquil tiquil (*Aloysia triphylla*) vs manzanilla (*Matricaria chamomilla*) sobre las cepas de *Prevotella intermedia*. Tesis para optar el título profesional de cirujano dentista. Puno. Universidad Nacional del Altiplano. 2018.
29. Zuta N. Actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de *Piper angustifolium* (matico) y *Matricaria chamomilla* (manzanilla) en cepas de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple". Facultad de ciencias de salud. Callao. Universidad Nacional del Callao. 2014.
30. Ocares M. Acción antimicrobiana de extractos crudos de especies de plantas nativas sobre *Escherichia coli* y *Salmonella spp*. Tesis para optar al título profesional de Ingeniero en Alimentos. Chile. Universidad Austral de Chile. 2014
31. Borja V. "Efecto inhibitorio del extracto de manzanilla (*Matricaria Chamomilla*), extracto de llantén (*Plantago major* L.) y la combinación del extracto de manzanilla y llantén comparado con la clorhexidina sobre cepa de *Porphyromona gingivalis*". Proyecto de Investigación presentado como requisito para optar por el Título de Odontóloga. Quito. Universidad central del Ecuador facultad de odontología; 2017.
32. Zampini I, Cudmani N, Isla M. Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. clín. latinoam. 2015; 41 (3)
33. Miranda, M. Métodos de Análisis de Drogas y Extractos. Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad Habana de Cuba. 2002.
34. Colegio Médico del Perú. Código de Ética y Deontología. Lima, octubre 2007.
35. Casa de gobierno – Lima. Ley General de Salud. LEY N°26842.
36. Declaración de Helsinki de la AMM – Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. Finlandia, junio 1964.

37. Luthje P, Brauner A. Novel Strategies in the Prevention and Treatment of Urinary Tract Infections. *Pathogens*. 27 de enero del 2016; 5(4):13.

# ANEXOS

ANEXO N° 1

SOLICITA: PERMISO

**DR. RAMEL ULLOA DEZA**  
**DECANO DE LA FACULTAD DE MEDICINA HUMANA**

YO, **VASQUEZ RIVASPLATA LUZ ESTHEFANY**, identificada ID N° 000088134, alumna de la Escuela Profesional, ante Ud. con el debido respeto me presento y expongo:

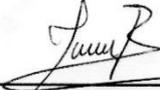
Solicito un permiso para utilizar el laboratorio de Microbiología para así poder hacer un trabajo de investigación de mi tesis titulada: **"EFECTO INHIBITORIO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE MATRICARIA CHAMOMILLA "MANZANILLA" SOBRE EL CRECIMIENTO DE ESCHERICHIA COLI ATCC 25922"**. Con el asesor Dr. Marco Zarate Arce.

**POR TANTO:**

Pido a Ud. acceder a mi solicitud por ser de justicia.

Trujillo, 23 de Marzo del 2018.

  
**Marco A. Zárate Arce**  
MEDICO - CIRUJANO  
C.M.P. 15345

  
**VASQUEZ RIVASPLATA LUZ ESTHEFANY**

**ID N° 000088134**

939370410



## ANEXO N°2



**UPAO**

Museo de Historia Natural y Cultural

### HERBARIO ANTENOR ORREGO (HAO)

CONSTANCIA N° 07-2018-HAO-UPAO

El que suscribe, Director del Museo de Historia Natural y Cultural de la Universidad Privada Antenor Orrego, deja:

### CONSTANCIA

Que **Luz Esthefany Vásquez Rivasplata**, estudiante de la carrera profesional de Medicina Humana de la Universidad Privada Antenor Orrego, ha solicitado la determinación de material vegetal, el cual corresponde a la siguiente especie:

***Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae)**

El mismo que será utilizado para la tesis titulada: "Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* "manzanilla" sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922". La muestra ha sido signada con el código HAO n° 20008.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que correspondan.

Trujillo, 06 de febrero de 2018



  
Segundo Leiva González  
DIRECTOR  
MUSEO DE HISTORIAL NATURAL Y CULTURAL

ANEXO N°3



RAZON SOCIAL: GEN LAB DEL PERU S.A.C.

Jr. Cápac Yupanqui N° 2434 Lince, Lima, Lima - PERU (Alt. Cdra. 8 Av. 2 de Mayo San Isidro)  
 Av. Las Flores de Primavera N° 849 Urb. Las Flores San Juan de Lurigancho, Lima, Lima  
 Central Telf.: 203-7500 Telefax: (51-1) 203-7501  
 e-mail: ventas@genlabperu.com web: www.genlabperu.com

Fecha	Vencimiento	Condiciones de Pago	A.C.
22/02/2018	22/02/2018	CONTADO	68

**R.U.C. 20501262260**

**FACTURA**

**0003- N° 0004135**

Sr(es): **UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO**  
 Dirección: **AV. AMERICA SUR NRO. 3145 URB. MONSERRATE - TRUJILLO TRUJILLO LA LIBERTAD**  
 R.U.C. **20141878477** N° de Guía de Remisión N° **018722**  
 N° de O.C.: Att.: N° Pedido

COD.	DESCRIPCION	CANT.	P. UNIT.	IMPORTE
H05299-A	Escherichia coli derived from ATCC® 25922™	1	231.30000	231.30

PEPEGRAF S.A. R.U.C. 20372514290 SERIE 0003 DEL 4001 al 5000 SUNAT N° 13185286023 F.L. 17-11-2017

**SON: DOSCIENTOS SETENTA Y DOS CON 93/100 SOLES S.E.U.O.**

O/P: ..... CANCELADO / CANJEADO  
 Lima, **22** de **FEBRERO** del **2018**  
 Por: .....  
 p. GEN LAB DEL PERU S.A.C.

<b>SUB TOTAL</b> (18%)	S/ 231.30
<b>I.G.V.</b>	S/ 41.63
<b>TOTAL</b>	S/ 272.93

ADQUIRENTE O USUARIO

## ANEXO N°4



# UPAO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACION

### COMITÉ DE BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN

RESOLUCIÓN COMITÉ DE BIOÉTICA N°310-2018-UPAO

Trujillo, 04 de Junio de 2018

VISTO, el oficio de fecha 31 de Mayo del 2018 presentado por el Sr. Alumno(a), VÁSQUEZ RIVASPLATA, LUZ ESTHEFANY quien solicita autorización para realización de investigación

#### CONSIDERANDO:

Que por oficio, la Srta. VÁSQUEZ RIVASPLATA, LUZ ESTHEFANY solicita se le de conformidad a su proyecto de investigación, de conformidad con el Reglamento del Comité de Bioética en Investigación de la UPAO.

Que en virtud de la Resolución Rectoral N° 3335-2016-R-UPAO de fecha 7 de julio de 2016, se aprueba el Reglamento del Comité de Bioética que se encuentra en la página web de la universidad, que tiene por objetivo su aplicación obligatoria en las investigaciones que comprometan a seres humanos y otros seres vivos dentro de estudios que son patrocinados por la UPAO y sean conducidos por algún docente o investigador de las Facultades, Escuela de Posgrado, Centros de Investigación y Establecimiento de Salud administrados por la UPAO

Que en el presente caso, después de la evaluación del expediente presentado por el alumno, el Comité Considera que el mencionado proyecto no contraviene las disposiciones del mencionado Reglamento de Bioética, por tal motivo es procedente su aprobación.

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

**PRIMERO:** APROBAR el proyecto de investigación "EFECTO INHIBITORIO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE MATRICARIA CHAMOMILLA "MANZANILLA" SOBRE EL CRECIMIENTO DE ESCHERICHIA COLI ATCC 25922".

**SEGUNDO:** dar cuenta al Vice Rectorado de Investigación.

Regístrese, Comuníquese y Archívese.

Dr. Víctor Hugo Chanduví Cornejo

Presidente

Dr. José González Cabeza

Secretario



ANEXO N°5

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO**  
**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**

Trujillo, 06 de julio de 2018

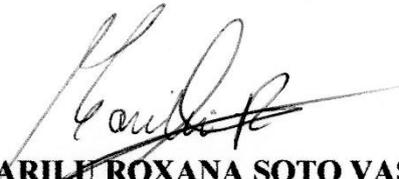
**CONSTANCIA DE ASESORIA**

Yo, **MARILU ROXANA SOTO VASQUEZ**, docente de la Catedra de Farmacognosia del Departamento Académico de Farmacotecnia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo, con código UNT 5727 y acreditada como Docente Investigadora por CONCYTEC con numero de registro REGINA N° 1582.

Dejo constancia de haber asesorado a la alumna **LUZ ESTHEFANY VASQUEZ RIVASPLATA**, en las actividades de preparación del extracto etanólico, preparación de las concentraciones al 25%, 50%, 75% y 100% de *Matricaria chamomilla* (Manzanilla), en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad Nacional de Trujillo. Asimismo, las concentraciones de ensayo preparadas serán utilizadas para el desarrollo de la tesis titulada: “Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* “Manzanilla” sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922”

**Atentamente,**



  
**Dra. MARILU ROXANA SOTO VASQUEZ**

Docente Investigadora de la Facultad de Farmacia y Bioquímica

Laboratorio de Farmacognosia

Universidad Nacional de Trujillo

ANEXO N°6

TABLA N°1:

<b>EFFECTO INHIBITORIO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE MATRICARIA CHAMOMILLA “MANZANILLA” SOBRE EL CRECIMIENTO DE ESCHERICHIA COLI ATCC 25922</b>						
<b>Diámetro de halo (mm)</b>	<b>Gentamicina 10 ug</b>	<b>Concentración del extracto etanólico de <i>Matricaria chamomilla</i></b>				
		<b>0%</b>	<b>25% (250ug/ml)</b>	<b>50% (500ug/ml)</b>	<b>75% (750ug/ml)</b>	<b>100% (1000ug/ml)</b>
<i>Halo 01 (mm)</i>	<i>30mm</i>				<i>13mm</i>	<i>17mm</i>
<i>Halo 02 (mm)</i>	<i>28mm</i>				<i>14mm</i>	<i>15mm</i>
<i>Halo 03 (mm)</i>	<i>27mm</i>				<i>13mm</i>	<i>16mm</i>
<i>Halo 04 (mm)</i>	<i>29mm</i>				<i>12mm</i>	<i>16mm</i>
<i>Halo 05 (mm)</i>	<i>28mm</i>				<i>12mm</i>	<i>18mm</i>
<i>Halo 06 (mm)</i>	<i>28mm</i>				<i>13mm</i>	<i>17mm</i>
<i>Halo 07 (mm)</i>	<i>31mm</i>				<i>14mm</i>	<i>15mm</i>
<i>Halo 08 (mm)</i>	<i>30mm</i>				<i>13mm</i>	<i>15mm</i>
<i>Halo 09 (mm)</i>	<i>29mm</i>				<i>12mm</i>	<i>16mm</i>
<i>Halo 10 (mm)</i>	<i>27mm</i>				<i>12mm</i>	<i>15mm</i>
<b>TOTAL PROMEDIO</b>	<i>287 28,7 mm</i>				<i>128 12,8 mm</i>	<i>160 16,0 mm</i>

*Fuente: Datos obtenidos por el investigador, año 2018*

**TABLA N°2:**

	<b>Concentración inhibitoria mínima según el número de Unidades Formadoras de colonias de cuatro concentraciones del extracto etanólico de <i>Matricaria chamomilla</i> frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</b>				
<b>REPETICIONES</b>	<b>25% (250 ug/ml)</b>	<b>50% (500 ug/ml)</b>	<b>75% (750 ug/ml)</b>	<b>100% (1000ug/ml)</b>	<b>Gentamicina</b>
<i>Placa 01: UFC/mL</i>	<i>580</i>	<i>120</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>Placa 02: UFC/mL</i>	<i>430</i>	<i>240</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>Placa 03: UFC/mL</i>	<i>685</i>	<i>185</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>Placa 04: UFC/mL</i>	<i>320</i>	<i>256</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>Placa 05: UFC/mL</i>	<i>720</i>	<i>130</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>Placa 06: UFC/mL</i>	<i>576</i>	<i>210</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>Placa 07: UFC/mL</i>	<i>460</i>	<i>255</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>Placa 08: UFC/mL</i>	<i>620</i>	<i>140</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>Placa 09: UFC/mL</i>	<i>565</i>	<i>115</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<i>Placa 10: UFC/mL</i>	<i>360</i>	<i>180</i>	<i>0</i>	<i>0</i>	<i>0</i>
<b>TOTAL PROMEDIO</b>	<b>5316 531.6</b>	<b>1831 183.1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

*Fuente: Datos obtenidos por el investigador, año 2018*

## ANEXO N°7

**TABLA 1**

**Prueba kruskal-Wallis sobre diámetro de halos de inhibición**

	<i>Concentraciones</i>				Gentamicina
	25%	50%	75%	100%	
Diámetro mm	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	12.80 ± 0.79	16.00 ± 1.05	28.70 ± 1.34
Prueba Kruskal-Wallis	$X^2 = 47.86 \quad p < 0.01$				

Se aprecia el diámetro del halo de inhibición, como efecto inhibitorio, a diferentes concentraciones de manzanilla; a la concentración del 25% de manzanilla se observa un efecto inhibitorio nulo, al igual que a la concentración del 50%. En la concentración de manzanilla del 75% se observa un diámetro del halo de  $12.80 \pm 0.79$ mm para la media y desviación estándar respectivamente; asimismo para la concentración del 100% la media y desviación estándar del diámetro es de  $16.00 \pm 1.05$ mm respectivamente. La gentamicina reporta valores de un diámetro de  $28.70 \pm 1.34$ mm para la media y desviación estándar respectivamente. La prueba de Kruskal-Wallis encuentra una diferencia estadística altamente significativa, lo que permite señalar que al menos uno de los grupos de estudio reporta una media con una diferencia altamente significativa respecto a los otros grupos ( $p < 0.01$ ).

**Fuente: Ficha de recolección de datos.**

**TABLA 2****Prueba Mann-Whitney con ajuste de Bonferroni para comparar grupos**

	<i>Concentraciones</i>				Gentamicina
	25%	50%	75%	100%	
Diámetro mm	0.00	0.00	12.80	16.00	28.70
Comparación entre grupos+	A	A	B	C	D

+: Dos grupos con la misma letra no difieren estadísticamente, usando la prueba Mann - Whitney con ajuste de Bonferroni.

Se hace la comparación de los diámetros medios por parejas de grupos. Según los resultados de la prueba de Mann-Whitney con ajuste de Bonferroni se puede distinguir que las concentraciones del extracto etanólico de manzanilla al 25% y 50% no difieren en los diámetros medios; sin embargo, las concentraciones del 75% y 100% si difieren ya que no tienen letra en común; asimismo difieren la concentración del 75% con el control positivo; la concentración del 100% difiere con la Gentamicina.

**Fuente: Ficha de recolección de datos.**

**Tabla 3****Prueba Kruskal - Wallis para establecer CMB**

	<i>Concentraciones</i>				Gentamicina
	25%	50%	75%	100%	
Número UFC	531 ± 134	183 ± 54	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
Prueba Kruskal-Wallis	$X^2 = 48.01 \quad p < 0.01$				

En cuanto a las UFC como efecto de las concentraciones del extracto etanólico de manzanilla se puede advertir que los porcentajes al 75%, 100% y control positivo no reportan casos con UFC; sin embargo, las concentraciones al 25% y 50% si presentan UFC siendo  $531 \pm 134$  y  $183 \pm 54$  UFC para la media y desviación estándar respectivamente. La prueba de Kruskal-Wallis detecta una diferencia estadística altamente significativa ( $p < 0.01$ ); es decir al menos uno de los grupos de estudio reporta un promedio diferente de UFC, respecto a cualesquiera de los otros.

**Fuente: Ficha de recolección de datos.**

**Tabla 4****Comparación de UFC/ml para establecer CMB**

	<i>Concentraciones</i>				Gentamicina
	25%	50%	75%	100%	
Número UFC	531	183	0	0	0
Comparación entre grupos+	A	B	C	C	C

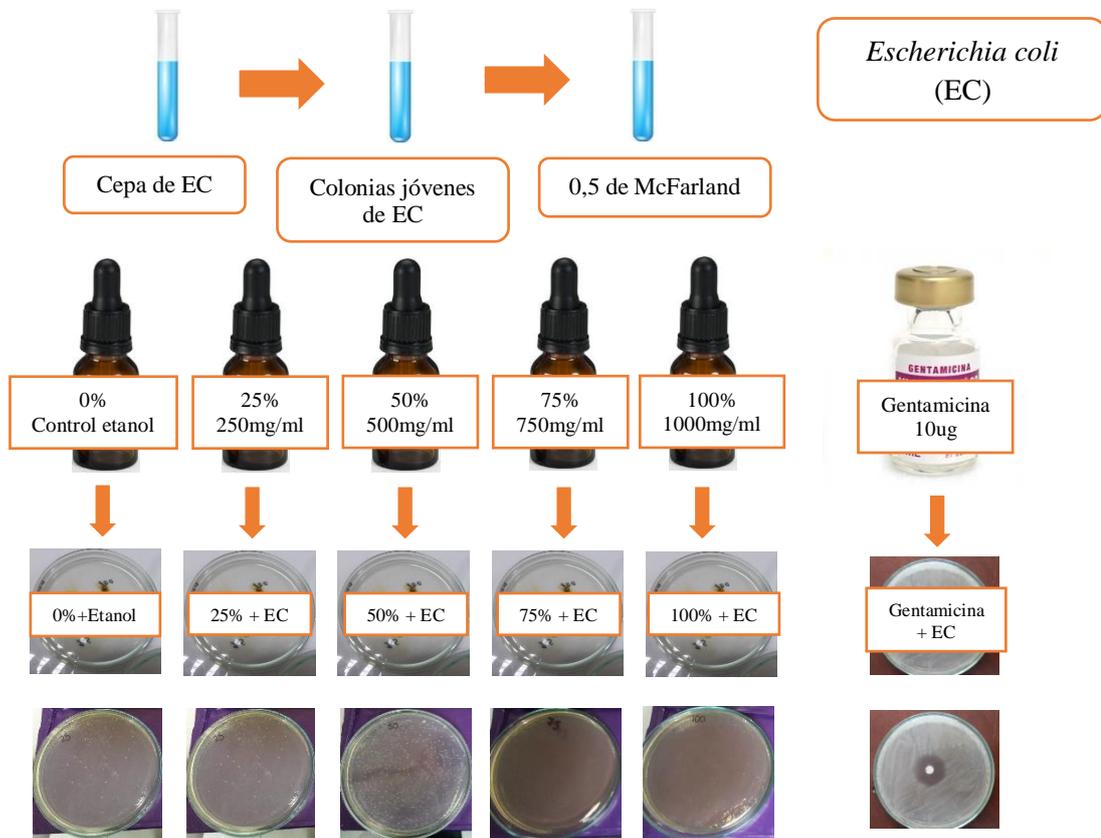
+: Dos grupos con la misma letra no difieren estadísticamente, usando la prueba Mann - Whitney con ajuste de Bonferroni.

Se hace la comparación de los valores medios de UFC por parejas de grupos. Según los resultados de la prueba de Mann-Whitney con ajuste de Bonferroni se puede distinguir que las concentraciones del extracto etanólico de manzanilla al 25% y 50% difieren en los números medios de UFC; sin embargo, las concentraciones del 75%, 100% y Gentamicina no difieren ya que tienen letra en común; se puede señalar que en la evaluación de las UFC a partir de la concentración del extracto etanólico de manzanilla del 75% el efecto es de control total con una eficacia del 100%.

**Fuente: Ficha de recolección de datos.**

## ANEXO N°8

### DISEÑO EXPERIMENTAL:



### UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

GRUPO A: E. coli + control (-) etanol.

GRUPO B: E. coli + extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* a 25%

GRUPO C: E. coli + extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* a 50%

GRUPO D: E. coli + extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* a 75%

GRUPO E: E. coli + extracto etanólico de *Matricaria chamomilla* a 100%

GRUPO F: E. coli + control interno Gentamicina 10ug.

## ANEXO N°9

### OBTENCION DE LA MANZANILLA



### SELECCIÓN



### SECADO



## TAMIZAJE



## ALMACENAMIENTO - MACERACION



## FILTRACION



## OBTENCION DE EXTRACTOS ETANOLICOS AL 25%, 50%, 75% Y 100%



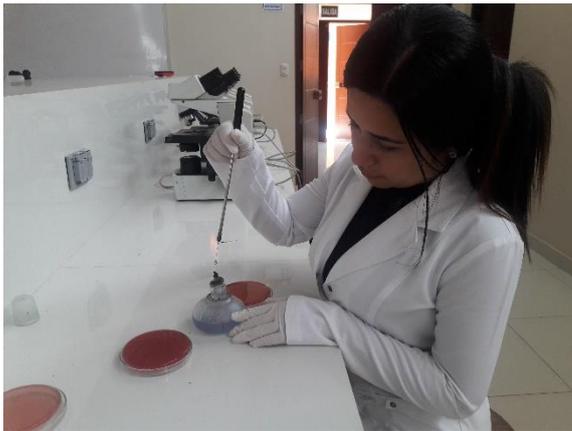
## ESTERILIZACION DE MATERIAL DE LABORATORIO



## PREPARACION DE MUELLER HINTON



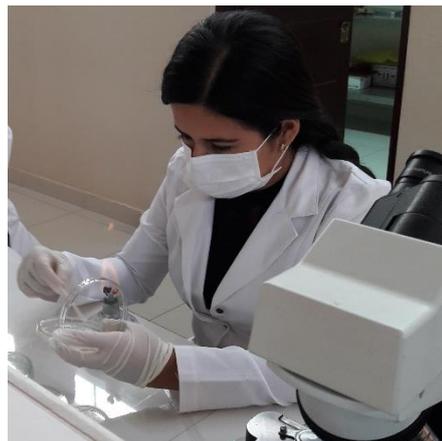
## CRECIMIENTO EN AGAR MACONKEY Y TSI



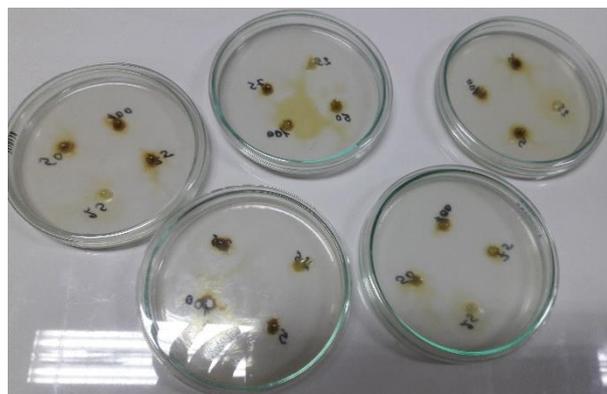
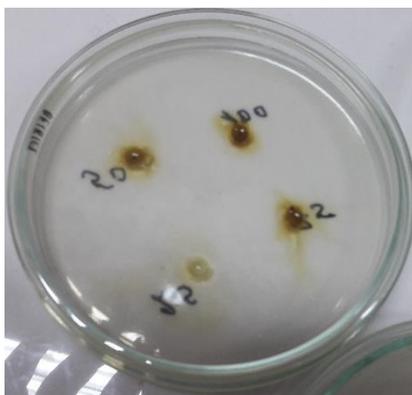
**PREPARACIÓN DEL INÓCULO EN TUBOS Y COMPARACIÓN VISUAL SEGÚN EL ESTÁNDAR DE MAC FARLAND**



**SIEMBRA DE LA BACTERIA EN MEDIO DE CULTIVO MULLER HINTON**



***MÉTODO DEL POZO EN AGAR MULLER HINTON + COLOCACIÓN DEL EXTRACTO ETANOLICO***



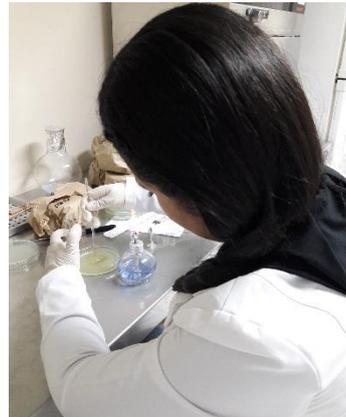
## INOCULACIÓN DE LA BACTERIA + EXTRACTO ETANÓLICO EN TUBOS



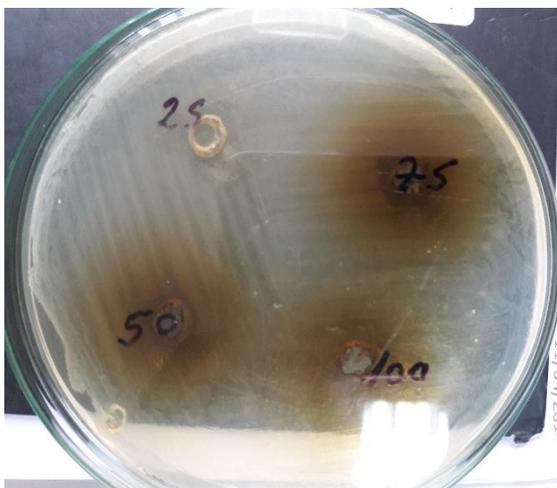
TUBOS Y PLACAS SE LLEVAN A  
INCUBADORA

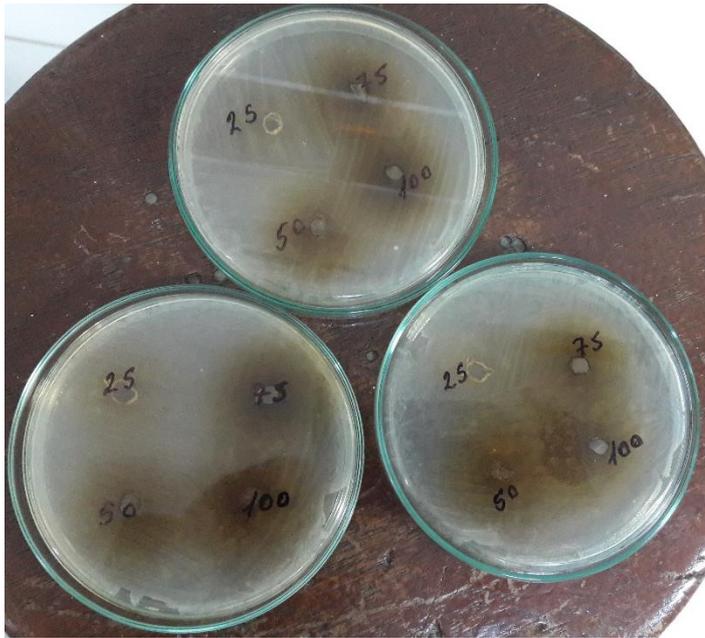


DETERMINACIÓN DE LA  
CONCENTRACIÓN BACTERICIDA



RESULTADOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO *Matricaria chamomilla* Y  
CONTROL INTERNO GENTAMICINA





**CMB: CRECIMIENTO BACTERIANO DE ESCHERICHIA COLI**

