

UNIVERSIDAD PRIVADA ANTENOR ORREGO

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA



EFECTO INHIBITORIO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE “*Caesalpinia spinosa*” SOBRE *Pseudomonas aeruginosa*

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICO CIRUJANO

AUTOR:

GEAN PAUL ZURITA RUIZ

ASESOR:

DR. MARCO ANTONIO ZÁRATE ARCE

Trujillo – Perú

2018

FIRMAS DEL JURADO, ASESOR Y AUTOR

EFECTO INHIBITORIO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE “*Caesalpinia spinosa*” SOBRE *Pseudomonas aeruginosa*

PRESIDENTE DEL JURADO

SECRETARIO DEL JURADO

VOCAL DEL JURADO

ASESOR

DR. MARCO ANTONIO ZÁRATE ARCE

DEDICATORIA

A DIOS:

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

A MIS QUERIDOS PADRES:

LUIS Y ELSA

Quienes me han conducido por el camino del bien durante toda la vida. A pesar del gran sacrificio que han hecho por mí, hoy pueden sentirse orgullosos y ver que sus esfuerzos no fueron en vano. A ustedes les debo todo, no hubiera podido hacerlo sin su paciencia, cariño y sobre todo por su gran apoyo incondicional que me brindaron durante toda mi carrera profesional. Les dedico el presente trabajo de investigación y todos los éxitos que logre alcanzar en mi vida si Dios me lo permite.

AGRADECIMIENTOS

**EXPRESO MI GRATITUD A MI
ASESOR:**

DR. MARCO ANTONIO ZÁRATE ARCE

Gracias por haberme brindado su valioso tiempo, no solo como asesor sino como amigo, por compartir sus conocimientos y experiencias en Microbiología y sobre todo por escuchar y corregir mis errores.

**MI SINCERO AGRADECIMIENTO AL
PERSONAL DEL LABORATORIO DE
MICROBIOLOGÍA Y AL DR. JULIO
AMÉRICO MANAY BARRERA:**

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

RESUMEN

Objetivo: Demostrar el efecto antibacteriano In Vitro de cuatro concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

Material y métodos: Se llevó a cabo un estudio de tipo experimental. La población estuvo conformada por un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*, a la que se le aplicó el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (tara) para observar su efecto antibacteriano.

Resultados: Se observó que el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) presentó efecto inhibitorio In Vitro sobre *Pseudomonas aeruginosa* al usar las diferentes concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%) y este efecto se incrementó en relación directamente proporcional a las concentraciones usadas. En relación a los halos de inhibición, al medirlos según la escala de Durafford se obtuvo sensibilidad límite para 25%, sensibilidad media para 50% y 75% y sumamente sensible para 100%.

Conclusiones: Demostramos que el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) presentó efecto inhibitorio In Vitro sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

Palabras clave: *Caesalpinia spinosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, halos de inhibición.

ABSTRACT

Objective: Demonstrate the in vitro antibacterial effect of four concentrations of the ethanolic extract of *Caesalpinia spinosa* on *Pseudomonas aeruginosa*.

Material and methods: An experimental study was carried out. The population consisted of a culture of *Pseudomonas aeruginosa*, to which the ethanolic extract of *Caesalpinia spinosa* (tara) was applied to observe its antibacterial effect.

Results: It was observed that the ethanolic extract of *Caesalpinia spinosa* (Tara) showed inhibitory effect in vitro on *Pseudomonas aeruginosa* when using the different concentrations (25%, 50%, 75% and 100%) and this effect increased in relation directly proportional to the concentrations used. In relation to the inhibition zones, when measured according to the Durafford scale, limit sensitivity was obtained for 25%, mean sensitivity for 50% and 75% and extremely sensitive for 100%.

Conclusions: We demonstrate that the ethanolic extract of *Caesalpinia spinosa* (Tara) presented an inhibitory effect in vitro on *Pseudomonas aeruginosa*.

Key words: *Caesalpinia spinosa*, *Pseudomonas aeruginosa*, halo of inhibition.

ÍNDICE

| | |
|---------------------------------|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| MATERIAL Y MÉTODOS..... | 6 |
| RESULTADOS..... | 15 |
| DISCUSIÓN..... | 18 |
| CONCLUSIONES..... | 20 |
| RECOMENDACIONES..... | 20 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 21 |
| ANEXOS..... | 26 |

1. INTRODUCCIÓN:

1.1. Antecedentes:

El uso indiscriminado de antibióticos ha contribuido a la aparición de bacterias resistentes a los antibióticos en las comunidades. Sin embargo, existen plantas medicinales con propiedades antimicrobianas que evitan el desarrollo de bacterias resistentes a múltiples fármacos, actuando por diferentes mecanismos ¹. Las hierbas han sido un factor determinante en la atención de la salud a lo largo de muchos años y en muchas culturas. Actualmente, 80% de la población mundial usan medicamentos tradicionales basados en plantas para mantener su salud ². El Perú posee una gran diversidad de plantas medicinales con propiedades terapéuticas, siendo una de las más estudiadas la *Caesalpinia spinosa* ³. Pertenece a la familia *Fabaceae*, género *Caesalpinia*, especie *Caesalpinia Spinosa* y su nombre binominal es *Caesalpinia Spinosa* (Molina) Kuntze ⁴.

Caesalpinia spinosa, conocida como tara o taya, es una leguminosa nativa de Perú y ampliamente utilizada en medicina tradicional desde la época prehispánica debido a su efecto antibacteriano ⁵. El efecto antibacteriano se define como la muerte e inhibición del crecimiento de las bacterias por el uso de diferentes agentes químicos ⁶. La Tara es un árbol de 5 m. de altura, posee un tronco corto, ramificado desde la base y con ramas cortas cuya corteza rugosa es de color gris ⁷. La *Caesalpinia spinosa* se encuentra en la costa del Perú y en la cordillera de los departamentos de Cajamarca, Cuzco, Lima, La Libertad, Huánuco, Junín, Ayacucho y Tacna, además muchas de sus comunidades la han usado habitualmente en medicina tradicional ^{3,8}.

El principio activo de la Tara está en la composición de polisacáridos derivados de la manosa (mucílagos neutros), Galactomanano soluble con una relación galactosa – manosa intermedia entre la goma de algarroba y el guar ⁹. Considerada la *Caesalpinia* una especie forestal oriunda de Perú con grandes propiedades terapéuticas, se ha registrado en nuestro país más del 80% de la producción mundial

¹⁰. En un estudio fitoquímico de *Caesalpinia spinosa* se encontró que posee metabolitos como taninos y flavonoides, los cuales son solubles en agua, etanol y acetona ¹¹.

Caesalpinia spinosa ha sido útil en el tratamiento de infecciones del tracto respiratorio, debido a que posee metabolitos con actividad antimicrobiana habiéndose llevado a cabo diferentes investigaciones en bacterias como frente a *Staphylococcus aureus* ^{9,12}. En 1988, López C. y colaboradores demostraron que *Caesalpinia spinosa* presentaba acción antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* ¹³. Mediante el método de Kirby-Bauer se demostró que el extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) tiene efecto inhibitorio sobre cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* ¹⁴.

Santiago J. (2012), usó extracto de Tara para elaborar apósitos para el tratamiento de las quemaduras, aplicándola directamente en humanos, consecuentemente se determinó que en un 85% dicha preparación brindaba efectos benéficos en la retracción de quemaduras y en el proceso de cicatrización de heridas ¹⁵. Añanca (2009) demostró el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* sobre *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* usando las concentraciones 17,5, 16,25, 15, 13,75, 12,5, 11,25, 10, 8,75, 7,5, 6,25 µg/mL ¹⁶. Sampaio, F. (2009) usó frutos de *Caesalpinia ferrea Martius* como antimicrobiano para curar infecciones orales y concluyó que el extracto de *C. ferrea Martius* inhibió el crecimiento In Vitro de las bacterias patógenas orales ¹⁷.

Kloucek (2005) determinó que la CMI de *Caesalpinia spinosa* contra *Enterococcus faecalis* era 0,5 ug/ml, 8 ug/ml para *Bacillus cereus* y 16 ug/ml para *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacteroides fragilis* ¹⁸. De la Cruz, M (2006) determinó el efecto del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “Tara” sobre la viabilidad de *Streptococcus β Hemolítico* ¹⁹. Iannacone, J. (2005) evaluó el efecto biocida de extracto acuoso de *Caesalpinia*

spinosa al 20% sobre adultos de *Sitophilus zeamais* Moyschulsky y *Stegobium paniceum*, sin embargo, no mostró efecto significativo ²⁰.

Kondo, K. (2006) evaluó In Vitro el extracto etanólico, acetato de etilo, butanólica y acuosa de las vainas de Tara y fueron, con o sin oxacilina, contra la bacteria *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. Determinó que el compuesto más activo fue el (3,4,5-tri-O-galloylquinicacid methyl ester) seguido del (3,4,5-tri-Ogalloylquinic acid), los cuales intensificaron hasta 500 veces la actividad de la oxacilina contra diferentes cepas de *S. aureus* meticilino resistentes ²¹.

Se realizaron diversos estudios que pretendieron evaluar la actividad antibacteriana de algunas especies de plantas usadas como medicina tradicional en el Norte del Perú, y se llegó a la conclusión que la *Caesalpinia spinosa*, fue la única de las especies que mostró alta actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* entérica y *Pseudomonas aeruginosas*, cuando el extracto fue etanólico ²².

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa, oxidasa positiva que causa numerosas infecciones, principalmente relacionadas con el ambiente hospitalario ²³. El potencial patogénico de *Pseudomonas aeruginosa* se debe a la producción de innumerables factores de virulencia, la formación de biofilms y la resistencia a los antibióticos ²⁴. *Pseudomonas aeruginosa* es un patógeno nosocomial cuyo interés clínico se debe a sus extraordinarios mecanismos de resistencia ²⁵.

El tratamiento de las infecciones por *Pseudomona aeruginosa* a menudo es muy difícil debido a la resistencia cruzada de estas bacterias con un gran grupo de antibióticos ²⁶. La resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* frente al imipenem y meropenem se debe a la producción de carbapenemasas. Un estudio experimental en el que se evaluó la eficacia del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* frente a cepas de *Staphylococcus* resistentes a la meticilina (SARM) brindó resultados muy favorables ²⁷.

Pseudomonas aeruginosa posee una resistencia intrínseca debido a la presencia de su barrera de membrana externa, transportadores de eflujo de múltiples fármacos y la inactivación endógena de antimicrobianos ²⁸. Se determinó que *Pseudomonas aeruginosa* presentó elevados niveles de resistencia frente a Aminoglucósidos, Fluoroquinolonas y Penicilinas ²⁹. *Pseudomonas aeruginosa* es responsable del 10% al 20% de las infecciones nosocomiales como la bacteriemia y la sepsis en la UCI, la fibrosis quística, la neumonía, las infecciones del tracto urinario, la infección por quemaduras y la infección de heridas ³⁰. En el siglo XXI, los efectos farmacológicos de las plantas medicinales han sido considerados como una futura droga prometedora para la gestión de la atención de la salud ³¹.

1.2. Identificación del problema:

El uso de plantas medicinales data desde los albores de la humanidad, asimismo las comunidades locales poseen conocimientos ancestrales sobre sus propiedades medicinales adquiridas a través de la experimentación y que han sido transmitidas a sus generaciones a través de la comunicación oral, esto ha generado que en los últimos años se esté avanzando en materia de investigación sobre dichas plantas medicinales en el Perú, motivando a que se realicen estudios experimentales como el presente para contribuir con este tipo de conocimiento ³².

Considerando que la “*tara*” ha sido usada desde la época prehispánica por sus propiedades terapéuticas, esto ha despertado mi interés para investigar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

1.3. Justificación:

Las infecciones causadas por *Pseudomonas aeruginosa* constituyen un problema de salud importante en los diferentes hospitales de nuestro medio. En los últimos años, los antibióticos usados contra estos microorganismos de forma indiscriminada, han generado mecanismos de resistencia. Aparte de esto, los

hospitales gastan considerablemente en la adquisición de estos fármacos. Ante esta problemática hemos creído conveniente realizar un estudio con la finalidad de buscar una alternativa de tratamiento más económica y que no genere resistencia, motivo por el cual este estudio experimental está dirigido a insertar a la “tara” como una opción de tratamiento frente a *Pseudomonas aeruginosa* bajo la forma de cremas o tabletas. Dentro de los constituyentes del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* se encuentran los flavonoides, péptidos y alcaloides que son los que ejercen la acción antibacteriana ¹³.

2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA CIENTÍFICO:

¿Cuál es el efecto In Vitro del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* “Tara” sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*?

3. OBJETIVOS:

3.1. OBJETIVO GENERAL:

- Demostrar el efecto antibacteriano In Vitro del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Medir el efecto antibacteriano In Vitro del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara) a las concentraciones 25%, 50%, 75% y 100% frente a *Pseudomonas aeruginosa*.
- Comparar el efecto antibacteriano de *Caesalpinia spinosa* en relación a la acción de Carbenicilina 100ug.

4. HIPÓTESIS:

Hipótesis nula (Ho)

No existe efecto antibacteriano In Vitro del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre *Pseudomonas aeruginosa*.

Hipótesis alterna (Ha)

Existe efecto antibacteriano In Vitro del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre *Pseudomonas aeruginosa*, y el efecto es proporcional a la concentración utilizada.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Poblaciones:

5.1.1. Población Diana o Universo

Cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas en el Hospital Belén de Trujillo.

5.1.2. Población de Estudio

Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* obtenido en el Hospital Belén de Trujillo y que fue identificado en el laboratorio de Microbiología de la Universidad Privada Antenor Orrego.

CRITERIOS DE SELECCIÓN

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* aislado de un paciente del Hospital Belén de Trujillo.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Contaminación de los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa*.

5.1.3. Muestra

Unidad de análisis:

Constituido por las placas Petri que contienen el medio de cultivo correspondiente del microorganismo y el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa*.

Unidad de muestreo:

Constituido por las unidades formadoras de colonias de *Pseudomonas aeruginosa* producto del efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara).

Tamaño muestral:

Para darle mayor solidez científica la muestra estuvo conformada por 10 aplicaciones (repeticiones) de cada concentración y de los controles, haciendo un total de 100 aplicaciones (repeticiones) para el microorganismo, distribuidas de la siguiente manera:

Caesalpinia spinosa al 25%: 10 aplicaciones (repeticiones)

Caesalpinia spinosa al 50%: 10 aplicaciones (repeticiones)

Caesalpinia spinosa al 75%: 10 aplicaciones (repeticiones)

Caesalpinia spinosa al 100%: 10 aplicaciones (repeticiones)

Control (Carbenicilina 100 ug): 10 aplicaciones (repeticiones)

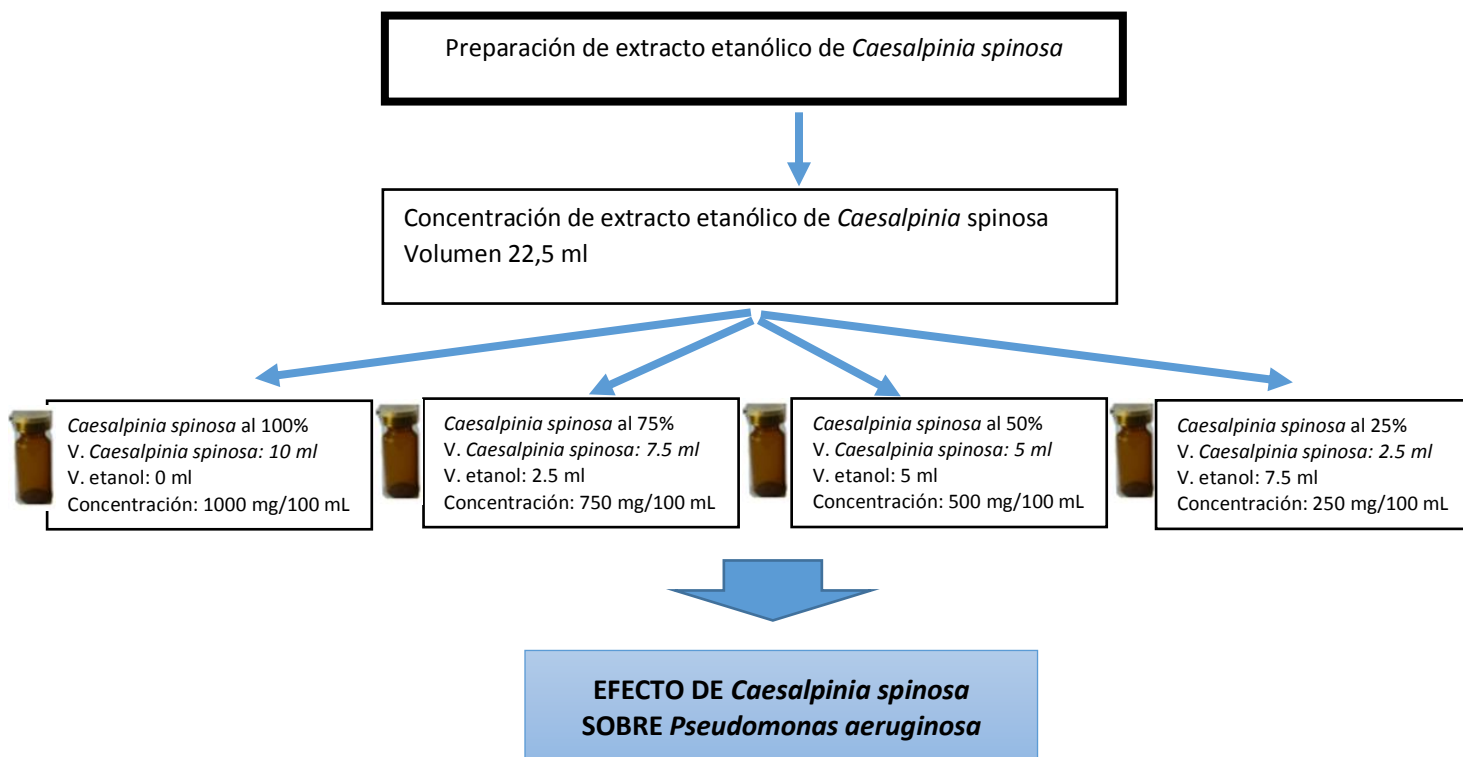
Se comparó con control positivo de Carbenicilina 100 ug para determinar la eficacia antibacteriana.

6. DISEÑO DE ESTUDIO:

6.1. TIPO DE ESTUDIO:

El estudio es experimental.

6.2. DISEÑO ESPECÍFICO



6.3. VARIABLES:

- **VARIABLE DEPENDIENTE:** Efecto inhibitorio sobre cultivo de *Pseudomonas aeruginosa*.
- **VARIABLE INDEPENDIENTE:** Concentración de *Caesalpinia spinosa*.

6.4. DEFINICIÓN OPERACIONAL

| VARIABLE | DEFINICIÓN CONCEPTUAL | DEFINICIÓN OPERACIONAL | TIPO Y ESCALA DE MEDICIÓN | INDICADOR |
|---|--|--|--|----------------------------|
| DEPENDIENTE EFEECTO INHIBITORIO SOBRE CULTIVO DE <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Evita el desarrollo de un microorganismo, llámese <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . | (Indicadores) Efecto evidenciado mediante halo de inhibición obtenido en laboratorio. | CUALITATIVO: NOMINAL DICOTÓMICA | -Halos de inhibición en mm |
| INDEPENDIENTE Concentración de <i>Caesalpinia spinosa</i> | <i>Caesalpinia spinosa</i> pertenece a la familia <i>Fabaceae</i> , leguminosa nativa de Perú y ampliamente utilizada en medicina tradicional desde la época prehispánica debido a su efecto antibacteriano. | Extracto etanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> al 25%, 50%, 75% y 100% obtenidos en el laboratorio | CUALITATIVO ORDINAL | 25% 50% 75% 100% |

7. PROCEDIMIENTOS

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 permiso para poder trabajar en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad Privada Antenor Orrego

c) Obtención de la tara:

Se recolectó 2 Kg de vainas de *Caesalpinia spinosa* procedentes de la provincia de Cajabamba (departamento de Cajamarca).

La recolección de las vainas de *Caesalpinia spinosa* se realizó por el método convencional de herborización, seleccionando el material en el campo, a horas de la mañana, verificando que esté en buenas condiciones ³³.

d) Identificación y determinación taxonómica de la especie:

Un ejemplar completo de la planta se llevó al Herbario de la Universidad Privada Antenor Orrego para su identificación y posterior verificación taxonómica según el sistema filogenético de la especie. (ANEXO N°5)

e) Preparación de la muestra:

- **Selección de la muestra:** El material recolectado fue transportado al laboratorio de Farmacognosia de la Universidad Nacional de Trujillo, donde se eliminó las sustancias extrañas presentes en el material vegetal.

- **Lavado de la vaina de *C. spinosa*:** Luego de la separación de las sustancias extrañas, se procedió a lavar la muestra con agua destilada y desinfectar con hipoclorito de sodio.
- **Secado:** Una vez desinfectada, la muestra, fue secada en estufa a 40°C. por 3 días.
- **Molienda:** Se procedió a separar las semillas de las cáscaras de *Caesalpinia spinosa* y, sólo se pulverizó la vaina con ayuda de un mortero.
- **Tamizaje:** Se pasó la muestra molida por un set de tamices para homogenizar el tamaño de partículas, y luego fue colocada en frascos de vidrio de color ámbar para su posterior utilización.

f) Obtención del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (tara):

Del material pulverizado y tamizado, se pesó 50 gr. de polvo de las vainas de *C. spinosa*. Éste se colocó en un frasco de vidrio de color ámbar y se le agregó 200 ml de alcohol de 70°, y se dejó macerar por 1 semana, agitando todos los días. Al 4to día se agregó 100 ml más de alcohol de 70° y se procedió hasta completar la semana.

El producto fue filtrado 3 veces, primero con papel filtro Whatmann N° 41, un segundo filtrado fue realizado con papel filtro Whatmann N° 2 y por último se realizó un tercer filtrado con papel Whatmann N° 1. Luego se concentró en rotavapor y se llevó a la estufa a 40 °C hasta sequedad.

A partir de la masa de extracto seco de *Caesalpinia spinosa* (tara) se preparó las concentraciones de 25%, 50% 75% y 100%, las cuales fueron guardadas en frascos de color ámbar estéril y conservado en refrigeración hasta el momento de su utilización en el ensayo antibacteriano ³⁴.

g) Obtención del cultivo:

En este estudio se utilizó cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* aislado de un paciente del Hospital Belén de Trujillo. La muestra fue tomada de la secreción de un paciente que presentó heridas postoperatorias y quemaduras.

Se realizó una coloración de Gram para observar bacilos Gram negativos.

La muestra fue sembrada en Agar Cetrimide, incubada a 37°C por un tiempo de 24 horas, haciendo la lectura a las 24 horas, observando la formación de un pigmento azul verdoso, luego se repicó a TSI para evaluar el comportamiento de fermentación de carbohidratos, siendo no fermentadora de carbohidratos. Se realizó la prueba de oxidasa que fue positiva. El cultivo aislado fue conservado en Agar Trypticase Soya (TSA), a partir de la cual se preparó el inóculo.

h) Preparación del inóculo

Obtenido el cultivo, se tomaron colonias que se suspendieron en solución salina fisiológica 5 mL y se comparó con nefelómetro de McFarland, para estandarizar el inóculo que fue al tubo 0.5 equivalente a 1.5×10^8 UFC/ml de *Pseudomonas aeruginosa*. Para realizar este paso con exactitud, se utilizó un equipo fotométrico o se realizó visualmente, una luz adecuada para comparar el tubo del inóculo con el estándar 0.5 de McFarland frente a una tarjeta de fondo blanco y líneas negras.

i) Prueba del efecto antibacteriano

Para determinar la susceptibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* se utilizó el método de difusión de discos de Kirby y Bauer ³⁵, preparando cuatro concentraciones de *Caesalpinia spinosa* (tara). Una vez preparadas las concentraciones se embebieron discos de papel filtro estéril con las concentraciones preparadas y el control con Carbenicilina por 60 minutos, luego se lleva a secar en la incubadora por 30 minutos. Un hisopo estéril fue embebido con el cultivo preparado y a una distancia de 10 cm de la llama del mechero se prosiguió al sembrado en camada en placas Petri conteniendo Agar Müller Hinton, se sembró uniformemente sobre toda la superficie del agar, girando cada placa 30 grados 10 veces aproximadamente.

Luego con una aguja estéril se prosiguió a colocar sobre el cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* en las placas Petri previamente preparados los discos de papel filtro estéril embebidos por 1 hora con las concentraciones preparadas de *Caesalpinia spinosa* y el grupo control con Carbenicilina; las placas se mantuvieron en la misma posición por un periodo de 10 minutos.

Posteriormente las placas se voltearon de posición y se incubaron, a una temperatura de 37°C durante 24 horas.

Todo el procedimiento se llevó a cabo dentro del diámetro de 10 cm de la llama de un mechero.

La lectura se llevó a cabo a las 24 horas mediante la inspección visual de cada placa. Se efectuó tomando el registro en milímetro de los halos de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*. Finalmente se evaluaron los resultados mediante la escala de Durafford.

Escala de Durafford: Escala utilizada para determinar cualitativamente el efecto inhibitorio In Vitro, según el diámetro de inhibición.

Nula (-) para un diámetro inferior a 8 mm.

Sensibilidad limite (sensible = +) para un diámetro comprendido entre 8 y 14 mm.

Medio (muy sensible = ++) para un diámetro entre 14 y 20 mm.

Sumamente sensible (+++) para un diámetro superior a 20 mm.

j) Control:

Se utilizó como control Carbenecilina 100 ug y se procesó de la misma manera que las muestras experimentales.

8. RECOLECCION Y ANALISIS DE DATOS

A) Instrumento de recolección de datos:

Los datos que se obtuvieron fueron registrados en una ficha (**ANEXO N°01**)

B) Análisis de datos:

El procesamiento de la información fue automático y se utilizó una computadora con Windows 10.0 y IBM SPSS Statistics 23.0

- **Estadística descriptiva:** Para analizar la información se construyó 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 *Caesalpinia spinosa* sobre *Pseudomonas aeruginosa*, se utilizó un análisis de varianza de un diseño completamente aleatorizado para el efecto bactericida analizado por el halo de inhibición, luego se realizó una prueba de comparaciones múltiples: Prueba Duncan, ambas con un nivel de significancia del 5%.

Todos estos datos fueron procesados de manera automatizada con el soporte del paquete estadístico SPSS- 23.0.

CONSIDERACIONES ÉTICAS:

El proyecto de investigación se presentó para aprobación a los comités designados por la Facultad de Medicina Humana de la UPAO.

Al llevar a cabo la investigación, se consideró los principios de bioseguridad, así mismo se tuvo en cuenta elementos que puedan generar daño al medio ambiente. Declaración de Helsinki.

A. RESULTADOS

- Al emplear una mínima concentración de extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* al 25% sobre *Pseudomonas aeruginosa* se obtiene una mínima media de diámetro de halo de inhibición de 12.10mm con diferencia significativa para todas las concentraciones.
- Al emplear una máxima concentración de extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* al 100% sobre *Pseudomonas aeruginosa* se obtiene una máxima media de halo de inhibición de 20.60 mm. con diferencia significativa para todas las concentraciones.
- En cuanto al control (Carbenicilina 100ug) se obtiene un halo de inhibición de diámetro similar al que se obtiene al usar el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* al 25%.

TABLA N° 01: Concentración del extracto etanólico a diferentes concentraciones y su diámetro de halos de inhibición

| Extracto etanólico (%) | n | Mínimo | Máximo | Media | Desviación estándar |
|-------------------------------|-----------|---------------|---------------|--------------|----------------------------|
| 25 | 10 | 9 | 14 | 12.10 | 1.37 |
| 50 | 10 | 11 | 18 | 16.60 | 2.07 |
| 75 | 10 | 12 | 21 | 18.10 | 2.85 |
| 100 | 10 | 13 | 23 | 20.60 | 2.99 |
| Total | 40 | 9 | 23 | 16.85 | 4.01 |

TABLA N° 02: Concentración del extracto etanólico a diferentes concentraciones y su diámetro de halos de inhibición

| Control y Extracto etanólico (%) | n | Mínimo | Máximo | Media | Desviación estándar |
|---|-----------|---------------|---------------|--------------|----------------------------|
| Carbenicilina | 10 | 10 | 13 | 11.60 | 0.84 |
| 25 | 10 | 9 | 14 | 12.10 | 1.37 |
| Total | 20 | 9 | 14 | 11.85 | 1.15 |

B. DISCUSIÓN

El conocimiento sobre las propiedades y componentes de las plantas han permitido que en la actualidad su uso sea cada vez más frecuente. Se han realizado numerosos ensayos farmacológicos que fundamentan su empleo en determinadas condiciones y concentraciones. Las plantas como *Caesalpinia spinosa* “Tara” se está usando en forma empírica, así como en base a ensayos con evidencia científica ³⁶.

En esta investigación se evaluó los halos de inhibición de las diferentes concentraciones de *Caesalpinia spinosa* 25%, 50%, 75% y 100% frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Los resultados de la **Tabla 1** demuestran que existe susceptibilidad del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* para todas las concentraciones (25%, 50%, 75% y 100%) sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* de acuerdo a las repeticiones hechas para cada tratamiento.

En relación a los halos de inhibición se determinó una media de 12.10 mm al 25%, 16.60% al 50%, 18.10 mm al 75%, 20.60 mm al 100%, que según la escala Durafford se traduce en lo siguiente: sensibilidad límite (+) para 25%, sensibilidad media (++) para 50% y 75%, y sumamente sensible (+++) para 100%; lo que nos indica que a mayor concentración del extracto etanólico, mayor es el efecto antibacteriano ³⁷.

De lo anterior se infiere que, al aplicar extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* al 100% es el que da mayor promedio de halo de inhibición, sin embargo cuando evaluamos el antibiótico control (Carbenicilina 100ug) obtenemos un resultado similar al extracto etanólico al 25%, sin embargo al evaluar los promedios del halo de inhibición cuando se aplica cada concentración del extracto etanólico, estadísticamente los promedios son iguales o diferentes, para lo cual en la **Tabla 3** se hace uso de un supuesto que es la prueba de homogeneidad de varianzas con el estadístico de Levene, obteniéndose un valor de $p > 0.05$ afirmando que las varianzas son homogéneas es decir que usar un ANOVA con dicho estadístico F es lo correcto.

En la **Tabla 4**, con respecto al ANOVA se tiene que, la hipótesis nula es que todos los promedios para todas las concentraciones de extracto etanólico más el control son estadísticamente iguales y la hipótesis alternativa es que al menos un par de promedios son diferentes. Por lo tanto, al tener un valor F muy grande y un valor p muy pequeño se afirma que existen evidencias suficientes al nivel del 5% ($p < 0,05$) para afirmar que las medias de los halos de inhibición no son las mismas entre tratamientos (extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* y Cabernicilina).

De acuerdo al análisis estadístico de Duncan (**Tabla 5**), no existe diferencia significativa en la inhibición de colonias de *Pseudomonas aeruginosa* entre las concentraciones de *Caesalpinia spinosa* de 25% y Carbenicilina 100ug (subgrupo 1), entre 50% y 75% (subgrupo 2) sin embargo la concentración de 100% (subgrupo 3) es diferente significativamente con relación a las otras concentraciones.

Según la bibliografía, el efecto antibacteriano de la *Caesalpinia spinosa* se debe principalmente a los flavonoides, péptidos y alcaloides que contienen sus vainas³⁸. Los flavonoides forman un complejo con las proteínas solubles y extracelulares y el complejo de la pared de la célula bacteriana, impidiendo el desarrollo de las células bacterianas³⁹.

En investigaciones se encontró que los taninos son metabolitos que se encuentran en diferentes partes de la planta. Éstos son solubles en agua, etanol, acetona; para el hombre es útil como antibacteriano ya que al combinarse con las proteínas de membrana celular la desnaturalizan¹².

En un estudio en 2013 se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* en el Norte del Perú y se llegó a la conclusión de que *Caesalpinia spinosa*, fue la única de las especies que mostró alta actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* y *Pseudomonas aeruginosa*, de igual forma en el presente trabajo se encontró alta actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* frente a *Pseudomonas aeruginosa*²².

En el trabajo realizado por López C. en 1988 se hace uso del extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* sobre algunas bacterias gramnegativas incluyendo a *Pseudomonas aeruginosa*, y se determinó una acción antimicrobiana para bacterias gramnegativas. Así mismo en el presente trabajo al usar extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* también se logró determinar una gran actividad antimicrobiana frente a *Pseudomonas aeruginosa* 13.

El efecto antibacteriano “In Vitro” del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre *Pseudomonas aeruginosa*, ha mostrado ser tan efectivo como las elaboradas en otras investigaciones sobre otros microorganismos, surgiendo la posibilidad de que existan más variedades de plantas que tengan esta capacidad antimicrobiana, por lo que se induciría que existe una gran capacidad terapéutica por parte de las plantas, especialmente de la Tara y que podría ser utilizada en prevención, por lo que es necesario realizar más investigaciones sobre las propiedades y principios activos de esta planta.

C. CONCLUSIONES

1. A mayor concentración del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa*, mayor es el diámetro del halo de inhibición estadísticamente.
2. A menor concentración del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* menor es el diámetro del halo de inhibición estadísticamente.
3. No hay diferencia significativa al usar extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* al 25% y Carbenicilina 100ug.

D. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar otros estudios para ampliar la eficacia de actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* a concentraciones menores.

2. Se recomienda realizar pruebas In Vivo para determinar la efectividad y toxicidad que puedan generar los principios activos de *Caesalpinia spinosa*.
3. Se recomienda aislar los principios activos causantes de la actividad antibacteriana de la *Caesalpinia spinosa* para su utilización bajo la forma de cremas o tabletas.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Al-Snafi AE. Medicinal plants with antimicrobial activities (part 2): Plant based review. Sch. Acad. J. Pharm., June 2016; 5(6):208-239
2. Benavides V, D'Arrigo G, Pino J. Effects of aqueous extract of *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) on the preimplantational mouse embryos. Rev. Peru. biol. Diciembre 2010; 17(3): 381-384
3. Zárata MA. Efecto in vitro antibacteriano del extracto acuoso de *Caesalpinia spinosa* "Tara" sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* y *Escherichia coli* aisladas de pacientes del Hospital Regional Docente de Trujillo en el año 2014. Pueblo cont. 26[1]
4. Sánchez C, Molinari E, Núñez E, Arista A. Advances on the floral morphology of *Caesalpinia spinosa*. The Biologist (Lima). Enero 2016; 14(1), 35-43
5. Aguilar-Galvez A, Noratto, G., Chambi, F., Debaste, F., Campos, D., Potential of tara (*Caesalpinia spinosa*) galloytannins and hydrolyzates as natural antibacterial compounds, Food Chemistry. 2013
6. Brooks G, Batel J, & Morse S. *Microbiología Médica de Jawest, Meldick y Adelberg*. (16ª ed.). México: El Manual Moderno. 1999
7. Centurión V. "Efecto antibacteriano in vitro de diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (tara) frente a *Streptococcus mutans* ATCC 35668". Tesis para optar el grado de Maestro en Estomatología. Universidad Privada Antenor Orrego. 2015
8. Escobar B. Efecto in vitro de diferentes concentraciones de extracto alcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, sobre la viabilidad de *Corynebacterium diphtheriae*. Rev. Med. Vallejana. 2008; 5(1): 28-37.

9. Liu B H; Lengua VLA; León MG.; La Torre DC.; Huapaya YJ; Chauca, J. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos de *Caesalpinia spinosa* "tara" y el *Eucalyptus* sp. "Eucalipto". *Horizonte Médico*. 2002; 2(1).
10. Ogata K, Arellano C, Zúñiga D. Efecto de diferentes bacterias aisladas de rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la germinación de algunas especies vegetales. *Zonas Áridas* 2008, 12(1)
11. Bornaz VL. Efecto In Vitro De La Solución De *Caesalpinia* Espinosa Al 60% En El Halo Inhibitorio De *Enterococcus Faecalis*. Tesis para optar por el Grado Académico de Doctora en Odontología. 2012
12. Huarino M. Efecto antibacteriano de *Caesalpinia spinosa* (tara) sobre flora salival mixta. Tesis para obtener el título de Cirujano Dentista. 2011
13. López C, Garró V, Yrei V, Gallardo T. Acción antimicrobiana *Caesalpinia tintoria* (Molina) Kuntze o tara, de diferentes regiones del Perú. *CLEIBA*. 1988: 27-31
14. Añanca, ER Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de vainas de *Caesalpinia spinosa* (tara) en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*. Tesis para Título de Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Jorge Basadre, Tacna. 2009
15. Santiago J. Utilización de extractos de Tara (*Caesalpinia spinosa*) en la formulación de apósitos para el tratamiento de quemaduras. Laboratorio de Investigación y Desarrollo de Química Orgánica. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos de Lima. 2012
16. Nicolás D, José R., Grischa B, Asunción C, María I, Maximilian W. *Factsheet: Datos botánicos de Tara* [en línea]. Lima: Billy Víctor Odiaga Franco, 2009. [Consulta: setiembre del 2009]. Disponible en: <http://perubiodiverso.pe/assets/Hoja-Bot%C3%A1nica-Tara-20091.pdf>
17. Sampaio FC. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*. 2009; Volumen 124(2): 289-294
18. Panizo MM, Reviákina V. *Candida albicans* y su efecto patógeno sobre las mucosas. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* [revista en la Internet]. [citado 2013 Oct 17]; 21(2):38-45.

Disponible en: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562001000200011&lng=es.

- 19.**De La Cruz M. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “taya” sobre la viabilidad de *Streptococcus* α -hemolítico. (Tesis Maestral). Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo. 2006
- 20.**Iannacone J., Ayala H., Romàn A. Efectos Toxicológicos de Cuatro Plantas sobre el Gorgojo del Maíz *Sitophilus zeamais* Motschulsky 1855 y sobre el Gorgojo de las Galletas *Stegobium paniceum* en Perú. *Revista Gayana*, 2005, 69(2): 234-240.
- 21.**Kondo K, Takaishi Y, Shibata H, Higuti T. ILSMRs (intensifier of beta-lactamsusceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) from Tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. *Phytomedicine*, 2006, 13: 209-212
- 22.**Rainer WB, “The Globalization of Traditional Medicine in Northern Peru: From Shamanism to Molecules,” *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013: 1-46
- 23.**Luján DA. *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2014; 48 (4): 465-74
- 24.**Balasubramanian D, Schnepfer L, Kumari H, Mathee K. A dynamic and intricate regulatory network determines *Pseudomonas aeruginosa* virulence. *Nucleic Acids Research*. 2013, 41(1): 1–20
- 25.**Meletis G, Bagkeri M. *Pseudomonas aeruginosa*: Multi-Drug-Resistance Development and Treatment Options. *Infection Control*, Dr. Silpi Basak (Ed.), InTech; 2013: 33-56.
- 26.**Radji M, Agustama RA, Elya B, Tjampakasari CR. Antimicrobial activity of green tea extract against isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* *Asian Pac J Trop Biomed*. 2013, 3(8): 663 – 667.
- 27.**Terán Y, Gonzáles J, Gómez K, Reyna L, Avila E. Efecto in vitro del aceite esencial de los frutos de *Caesalpinia spinosa* (molina) Kuntze, tara sobre la viabilidad de cultivos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente. *Pueblo cont*, 2015, 26[1].

28. Morita Y, Tomida J, Kawamura Y. Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*. January 2014. 14(422).
29. Kamaria P, Aring B, Sinha M. Incidence of Multidrug Resistant *Pseudomonas Aeruginosa* Isolated From Burn Patients Tertiary Care Hospital, Jamnagar, Gujarat, India. 2016; 15(7): 31-34
30. Mahmoud AB, Zahran WA, Hindawi GR, Labib AZ, Galal R, “Prevalence of Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Patients with Nosocomial Infections at a University Hospital in Egypt, with Special Reference to Typing Methods,” *Journal of Virology & Microbiology*. 2013
31. Shakya AK. Medicinal plants: Future source of new drugs. *International Journal of Herbal Medicine*. 2016; 4(4): 59-64
32. Vásquez S. Evaluación del uso e impacto de especies de flora utilizadas en medicina tradicional en la ciudad de Tamshiyacu, Loreto, Perú. Tesis para optar el título profesional de Ingeniero agrónomo. 2016
33. Pamo RO. Características de los trabajos publicados sobre las propiedades de las plantas en revistas médicas peruanas. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 2009; 26(3), 314-23
34. Miranda M, Cuellar A. Manual de prácticas de laboratorio de farmacognosia y productos naturales. Ciudad Habana: Universidad de la Habana. 2000
35. Kirby-Bauer Disk Diffusion Test. Lab Protocol. 2016. URL disponible en: http://2016.igem.org/wiki/images/c/cb/T--Stockholm--Kirby_bauer_protocol.pdf
36. Araujo J., Ramsés A. Actividad antimicrobiana de Plantas. *Rev Perú [revista en línea]* 2008 [fecha de acceso 20 noviembre 2010]; 6(1): 6-7
URL Disponible en: http://www.ucsur.edu.pe/documentos/cientifica_06.pdf
37. Duraffourd C. y Lapraz J. Cuaderno de Fitoterapia Clínica. Editorial Masson; Francia; 1983.
38. Kondo K, Takaishi Y, Shibata H, Higuti T. ILSMRs (Intensifier of beta-Lactam Susceptibility in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*) from *Tara Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. *J Phytotherapy And Phytopharmacology*. 2006; 13; 13: 209-212.

39.Purca T. Efectividad antibacteriana “in vitro” del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* (Romero) sobre flora salival. Tesis para obtener el Título de Cirujano Dentista.2013

ANEXOS

Anexo Nro. 01

Ficha de Recolección de datos

Determinación de la susceptibilidad antimicrobiana

| Repeticiones | Halos de inhibición por concentración de extracto etanólico en (%) y por controles (mm) | | | | |
|---------------------|--|-----------|-----------|-----------|------------|
| | Carbenicilina | 25 | 50 | 75 | 100 |
| 1 | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 2 | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 3 | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 4 | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 5 | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 6 | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 7 | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 8 | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 9 | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| 10 | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

Anexo Nro. 02

TABLA N° 03: Prueba de homogeneidad de varianzas

| Estadístico de Levene | gl1 | gl2 | p |
|-----------------------|-----|-----|-------|
| 1.866 | 4 | 45 | 0.133 |

En la **TABLA 3** al usar el análisis estadístico de varianza, existe evidencia suficiente al nivel del 5% ($p > 0.05$) para afirmar que las varianzas son homogéneas.

TABLA N° 04: ANOVA de los halos de inhibición

| Fuente de variación | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | p |
|---------------------|-------------------|----|------------------|--------|-------|
| Entre grupos | 603.000 | 4 | 150.750 | 31.552 | 0.000 |
| Dentro de grupos | 215.000 | 45 | 4.778 | | |
| Total | 818.000 | 49 | | | |

En la **TABLA 4** al usar ANOVA, existen evidencias suficientes al nivel del 5% ($p < 0.05$) para afirmar que las medias de los halos de inhibición no son las mismas entre tratamientos (Extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* y Carbenicilina)

**TABLA N° 05: Pruebas de comparaciones múltiples de halos de inhibición
Duncan**

| Extracto etanólico en (%) y control | N | Subconjunto para alfa = 0.05 | | |
|--|----|------------------------------|-------|--------------|
| | | 1 | 2 | 3 |
| Carbenicilina | 10 | 11.60 | | |
| 25 | 10 | 12.10 | | |
| 50 | 10 | | 16.60 | |
| 75 | 10 | | 18.10 | |
| 100 | 10 | | | 20.60 |
| p | | 0.612 | 0.132 | 1.000 |

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

La tabla de comparaciones múltiples de Duncan concluye que al usar Carbenicilina y extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* al 25% se tiene igual promedio de halos de inhibición; así mismo que usar porcentajes de 50% y 75%, pero sí existe diferencia entre el primer subconjunto con el segundo.

Sin embargo, el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* al 100% es estadísticamente diferente con los demás, es por ello que forma un solo subconjunto.

Anexo Nro. 03



UPAO

Museo de Historia Natural y Cultural

HERBARIO ANTENOR ORREGO (HAO)

CONSTANCIA N° 12-2017-HAO-UPAO

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

CONSTANCIA

Que **Gean Paul Zurita Ruiz**, 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:

***Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze (Fabaceae)**

El mismo que será utilizado para la tesis titulada: "Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre *Pseudomonas aeruginosa*".

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

Trujillo, 31 de agosto de 2017




Segundo Leiva González
DIRECTOR
MUSEO DE HISTORIA NATURAL Y CULTURAL

Anexo Nro. 04

UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

Trujillo, 14 de Setiembre de 2017


CONSTANCIA DE ASESORÍA

Yo, **MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ**, docente de la Cátedra 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 número de registro REGINA: N° 1582.

Dejo constancia de haber asesorado al alumno **GEAN PAUL ZURITA RUIZ** en las actividades de preparación del extracto etanólico y preparación de las concentraciones 25%, 50%, 75% y 100% en el laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de Trujillo. Así mismo las concentraciones de ensayo preparadas, será utilizadas para el desarrollo de la tesis titulada: "Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre *Pseudomonas aeruginosa*".

Atentamente




Dra MARILÚ ROXANA SOTO VÁSQUEZ
Docente investigadora de la Facultad de Farmacia y Bioquímica
Laboratorio de Farmacognosia
Universidad Nacional de Trujillo

Anexo Nro. 05



UPAO

VICERRECTORADO DE INVESTIGACION

COMITÉ DE BIOÉTICA EN INVESTIGACIÓN

RESOLUCIÓN COMITÉ DE BIOÉTICA N°029-2017-UPAO

Trujillo, 09 de Octubre del 2017

VISTO, el oficio de fecha 06 de Octubre del 2017 presentado por el alumno(a)) ZURITA RUÍZ, GEAN PAUL, quien solicita autorización para realización de investigación.

CONSIDERANDO:

Que por oficio, el alumno(a) ZURITA RUÍZ, GEAN PAUL, 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 resulta procedente su aprobación.

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

PRIMERO: APROBAR el proyecto "EFECTO INHIBITORIO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Caesalpinia spinosa* SOBRE *Pseudomonas aeruginosa*".

SEGUNDO: dar cuenta al Vice Rectorado de Investigación.

Regístrese, Comuníquese y Archívese.



Dr. Víctor Hugo Chanduví Cornejo

Presidente

Dr. José González Cabeza

Secretario



Anexo Nro. 06

OBTENCIÓN DE LA TARA



LAVADO



SECADO



MOLIENDA



TAMIZAJE



PREPARACIÓN DEL ALCOHOL AL 70% (USO DE ALCOHOLÍMETRO)



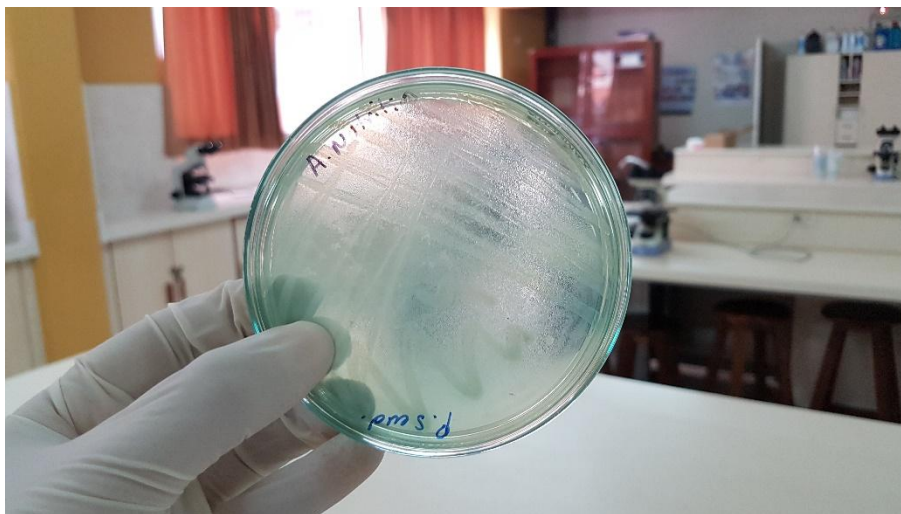
PROCESO DE FILTRACIÓN



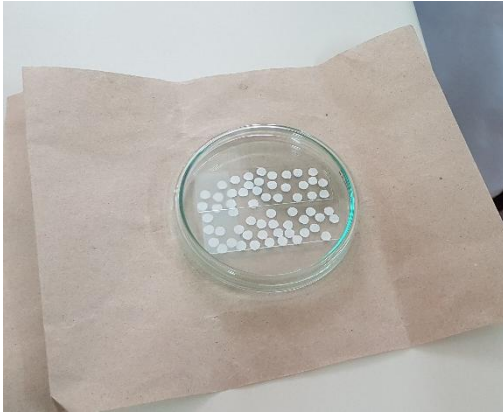
PRESENTACIÓN DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE TARA



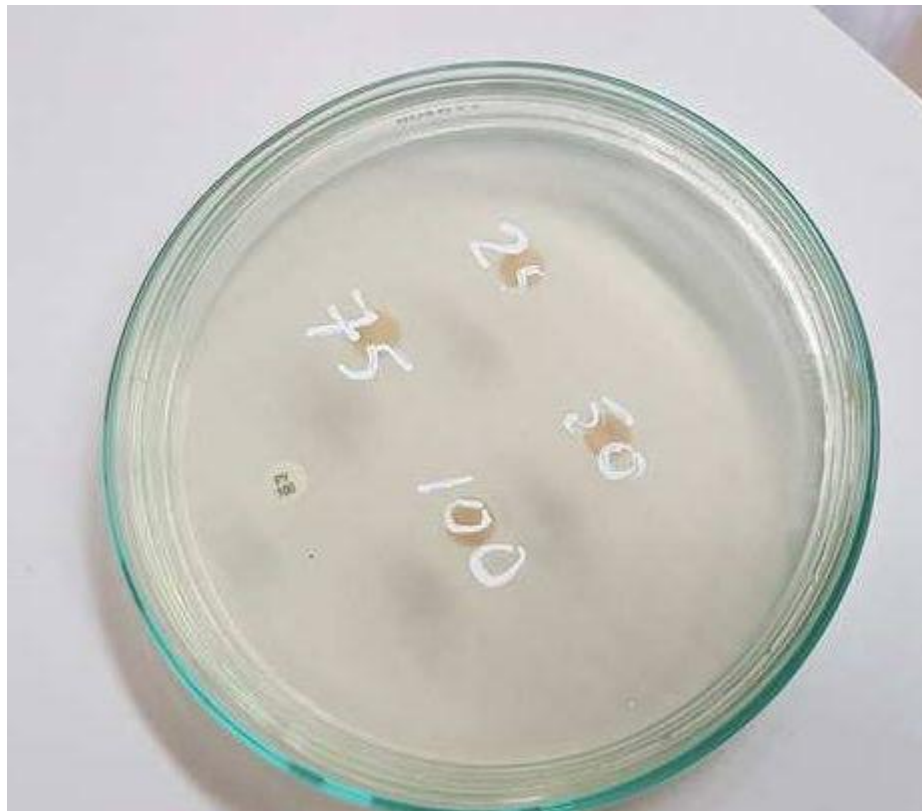
CRECIMIENTO EN AGAR CETRIMIDE



ESTERILIZACIÓN DE DISCOS



PETRI CON DISCOS EMBEBIDOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES



SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

