

# UNIVERSIDAD NACIONAL "PEDRO RUIZ GALLO"

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



## DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

**EFFECTO INHIBITORIO *In Vitro* DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE  
*Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major* Y *Verbena officinalis*, SOBRE  
EL CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus* Y *Pseudomonas aeruginosa*.**

**TESIS:**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN  
BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. CARLA ALEJANDRA RAVINES ARRIAGA**

**LAMBAYEQUE – PERÚ  
2019**

# **UNIVERSIDAD NACIONAL "PEDRO RUIZ GALLO"**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



## **DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**EFFECTO INHIBITORIO *In Vitro* DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE  
*Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major* Y *Verbena officinalis*, SOBRE  
EL CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus* Y *Pseudomonas aeruginosa*.**

**TESIS:**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN  
BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**AUTORA:**

**Bach. CARLA ALEJANDRA RAVINES ARRIAGA**

**LAMBAYEQUE – PERÚ  
2019**

# **UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO**

## **FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

### **DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**EFFECTO INHIBITORIO *In Vitro* DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE  
*Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major* Y *Verbena officinalis*, SOBRE  
EL CRECIMIENTO DE *Staphylococcus aureus* Y *Pseudomonas aeruginosa***

**Ravines Arriaga, Carla Alejandra.**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADA EN:  
BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**APROBADA POR**

---

**Dra. Martha Arminda Vergara Espinosa**

**Presidenta**

---

**MSc. Consuelo Rojas Idrogo**

**Secretaria**

---

**Lic. Julio César Silva Estela**

**Vocal**

---

**Lic. Mario Cecilio Moreno Mantilla**

**Asesor**

A lo largo de mi vida he contado con el apoyo incondicional y la inigualable presencia de mi padre, Carlos Edmundo Ravines Zapatel, y por eso es a él a quien dedico esta tesis; la dedico en acto de reconocimiento por su esfuerzo y compromiso con mi vida y con mis metas.

Te admiro, papá; estaré eternamente agradecida contigo.

Agradezco a mi familia y amigos por el cariño y apoyo incondicional brindado durante esta etapa; a Mario Moreno Mantilla, mi maestro, asesor y guía durante la ejecución y elaboración de la presente tesis, muchas gracias por su confianza; a Stell Paico Marín, gracias por su cooperación.

## TABLA DE CONTENIDO

Índice de Tablas.....	i
Índice de Figuras.....	iv
Índice de Anexos.....	vii
Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	4
2.1. Extracto Etanólico Vegetal.....	5
2.2. Plantas Medicinales.....	6
2.3. Tara ( <i>Caesalpinia spinosa</i> ).....	7
2.4. Cúrcuma ( <i>Curcuma longa</i> ).....	10
2.5. Llantén ( <i>Plantago major</i> ).....	12
2.6. Verbena ( <i>Verbena officinalis</i> ).....	14
2.7. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	16
2.8. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	17
3. Materiales y Métodos.....	18
3.1. Población y Muestra.....	19
3.2. Materiales.....	19
3.2.1. Material Botánico.....	19
3.2.2. Material Microbiológico.....	19
3.3. Métodos y Técnicas.....	20

3.3.1.	Obtención del Material Vegetal de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara), <i>Curcuma longa</i> (Cúrcuma), <i>Plantago major</i> (Llantén) y <i>Verbena officinalis</i> (Verbena).....	20
3.3.2.	Obtención del Extracto Etanólico a Partir de <i>Caesalpinia spinosa</i> (Tara), <i>Curcuma longa</i> (Cúrcuma), <i>Plantago major</i> (Llantén) y <i>Verbena officinalis</i> (Verbena).....	20
3.3.3.	Reconstitución y Estandarización del Inóculo Bacteriano.....	21
3.3.4.	Preparación de los Discos de Sensibilidad.....	21
3.3.5.	Realización de las Pruebas de Sensibilidad Bacteriana.....	21
4.	Resultados y Discusión.....	24
4.1.	Resultados.....	25
4.1.1.	Efecto Inhibitorio del Extracto Etanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> Sobre el Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	25
4.1.2.	Efecto Inhibitorio del Extracto Etanólico de <i>Curcuma longa</i> Sobre el Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ...	28
4.1.3.	Efecto Inhibitorio del Extracto Etanólico de <i>Plantago major</i> Sobre el Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ...	31
4.1.4.	Efecto Inhibitorio del Extracto Etanólico de <i>Verbena officinalis</i> Sobre el Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ...	34
4.1.5.	Análisis de Varianza de los Promedios de los Halos de Inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por Efecto del Extracto Etanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	37

4.1.6. Análisis de Varianza de los Promedios de los Halos de Inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por Efecto del Extracto Etanólico de <i>Curcuma longa</i> .....	39
4.1.7. Análisis de Varianza de los Promedios de los Halos de Inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por Efecto del Extracto Etanólico de <i>Plantago major</i> .....	42
4.1.8. Análisis de Varianza de los Promedios de los Halos de Inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por Efecto del Extracto Etanólico de <i>Verbena officinalis</i> .....	44
4.2. Discusión.....	47
Conclusiones.....	55
Recomendaciones.....	56
Referencias Bibliográficas.....	57
Anexos.....	64



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> sobre las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (SA101, SA102 y SA103).....	26
Tabla 2. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> sobre las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AR102, AR103 y AR104).....	26
Tabla 3. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Curcuma longa</i> sobre las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (SA101, SA102 y SA103).....	28
Tabla 4. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Curcuma longa</i> sobre las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AR102, AR103 y AR104).....	29
Tabla 5. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Plantago major</i> sobre las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (SA101, SA102 y SA103).....	31
Tabla 6. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Plantago major</i> sobre las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AR102, AR103 y AR104).....	32
Tabla 7. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Verbena officinalis</i> sobre las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (SA101, SA102 y SA103).....	34
Tabla 8. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Verbena officinalis</i> sobre las cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AR102, AR103 y AR104).....	35
Tabla 9. Análisis de Varianza (ANOVA) de los promedios de los halos de inhibición (mm) generados en los cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por efecto de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	37

Tabla 10. Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los halos de inhibición según las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (SA101, SA102 y SA103) y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AR102, AR103 y AR104) por efecto del extracto etanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	38
Tabla 11. Análisis de Varianza (ANOVA) de los promedios de los halos de inhibición (mm) generados en los cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por efecto de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Curcuma longa</i> ....	39
Tabla 12. Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los halos de inhibición según las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (SA101, SA102 y SA103) y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AR102, AR103 y AR104) por efecto del extracto etanólico de <i>Curcuma longa</i> .....	40
Tabla 13. Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de halos de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por el extracto etanólico de <i>Curcuma longa</i> en relación a sus concentraciones.....	41
Tabla 14. Análisis de Varianza (ANOVA) de los promedios de los halos de inhibición (mm) generados en los cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por efecto de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Plantago major</i> ...	42
Tabla 15. Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los halos de inhibición según las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (SA101, SA102 y SA103) y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AR102, AR103 y AR104) por efecto del extracto etanólico de <i>Plantago major</i> .....	43
Tabla 16. Análisis de Varianza (ANOVA) de los promedios de los halos de inhibición (mm) generados en los cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	

por efecto de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Verbena officinalis*.....44

Tabla 17. Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los halos de inhibición según las cepas de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103) y *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104) por efecto del extracto etanólico de *Verbena officinalis*.....45

Tabla 18. Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* por el extracto etanólico de *Verbena officinalis* en relación a sus concentraciones.....46

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. (a) Filtración del macerado (b) Aceleración del proceso de evaporación del etanol del macerado filtrado en una estufa a 37°C (c) Obtención del extracto seco.....	22
Figura 2. (a) Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> (a1) colonias grandes, cremosas, convexas y de bordes lisos, con presencia de $\beta$ hemólisis en agar sangre (a2) prueba de coagulasa positiva (a3) prueba de oxidasa positiva y fermentación del manitol en placa de agar manita sal, colonias amarillas con bordes amarillos. (b) Identificación de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (b1) prueba de producción de pigmento Píocianina o Píorubrina positiva (b2) test de citrato de Simmons positivo (b3) medio TSI k/k. (c) Cepas bacterianas de (c1) <i>Staphylococcus aureus</i> y (c2) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , identificadas y rotuladas.....	23
Figura 3. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> (a1) primera repetición (b1) segunda repetición y (c1) tercera repetición; y sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (a2) primera repetición (b2) segunda repetición (c3) tercera repetición.....	27
Figura 4. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Curcuma longa</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> (a1) primera repetición (b1) segunda repetición y (c1) tercera repetición; y sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (a2) primera repetición (b2) segunda repetición (c3) tercera repetición.....	30
Figura 5. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Plantago major</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> (a1) primera repetición (b1) segunda repetición y (c1) tercera repetición; y sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (a2) primera repetición (b2) segunda repetición (c3) tercera repetición.....	33

Figura 6. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Verbena officinalis</i> sobre <i>Staphylococcus aureus</i> (a1) primera repetición (b1) segunda repetición y (c1) tercera repetición; y sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (a2) primera repetición (b2) segunda repetición (c3) tercera repetición.....	36
Figura 7. Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los halos de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> sometidos al extracto etanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> en relación a sus concentraciones.....	37
Figura 8. Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los halos de inhibición según las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (SA101, SA102 y SA103) y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AR102, AR103 y AR104) por efecto del extracto etanólico de <i>Curcuma longa</i> .....	40
Figura 9. Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de halos de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por el extracto etanólico de <i>Curcuma longa</i> en relación a sus concentraciones.....	41
Figura 10. Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los halos de inhibición según las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (SA101, SA102 y SA103) y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AR102, AR103 y AR104) por efecto del extracto etanólico de <i>Plantago major</i> .....	43
Figura 11. Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los halos de inhibición según las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (SA101, SA102 y SA103) y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AR102, AR103 y AR104) por efecto del extracto etanólico de <i>Verbena officinalis</i> .....	45

Figura 12. Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de halos de inhibición de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por el extracto etanólico de <i>Verbena officinalis</i> en relación a sus concentraciones.....	46
---	----

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Constancia de validación de los especímenes botánicos <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze, <i>Plantago major</i> L. y <i>Verbena officinalis</i> L.....	66
Anexo 2. (a) Hojas y tallos de <i>Caesalpinia spinosa</i> (b) Rizoma de <i>Curcuma longa</i> (c) Hojas y espigas de <i>Plantago major</i> (d) Tallos, hojas e inflorescencias de <i>Verbena officinalis</i> .....	67
Anexo 3. Constancia de validación de las cepas bacterianas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	68
Anexo 4. (a) Microscopía óptica a 1000 aumentos de la tinción gram de <i>Staphylococcus aureus</i> , cepa SA101. Se observan cocos gram positivos dispuestos en racimo. (b) Microscopía óptica a 1000 aumentos de la tinción gram de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , cepa AR102. Se observan bacilos gram negativos, rectos y ligeramente curvados, aislados, en parejas y en cadenas.....	69
Anexo 5. (a) Soluciones madre de <i>Caesalpinia spinosa</i> , <i>Curcuma longa</i> , <i>Plantago major</i> y <i>Verbena officinalis</i> (b) Diluciones de 900 a 600 mg/ml de <i>Caesalpinia spinosa</i> (c) Diluciones de 900 a 600 mg/ml de <i>Curcuma longa</i> (d) Diluciones de 900 a 600 mg/ml de <i>Plantago major</i> (e) Diluciones de 900 a 600 mg/ml de <i>Verbena officinalis</i> .....	70
Anexo 6. Modelo de Ficha de Recolección de Datos.....	71
Anexo 7. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Caesalpinia spinosa</i> sobre las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (SA101, SA102 Y SA103) y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AR102, AR103 y AR104).....	72
Anexo 8. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Curcuma longa</i> sobre las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (SA101, SA102 Y SA103) y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AR102, AR103 y AR104).....	72

Anexo 9. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Plantago major</i> sobre las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (SA101, SA102 Y SA103) y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AR102, AR103 y AR104).....	73
Anexo 10. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de <i>Verbena officinalis</i> sobre las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> (SA101, SA102 Y SA103) y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (AR102, AR103 y AR104).....	73



## RESUMEN

El presente estudio experimental se hizo en base a la determinación del efecto inhibitorio *In Vitro* de los extractos etanólicos de *Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major* y *Verbena officinalis*, a concentraciones de 900, 800, 700 y 600 mg/ml cada una, sobre el crecimiento de tres cepas distintas de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103) y *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104). Para esto, el extracto etanólico se obtuvo tomando como referencia el método utilizado por Altamirano Fernández & Castro Bruno (2017). El Método de Difusión en Agar (Método de Kirby-Bauer) fue el elegido para realizar las pruebas de susceptibilidad. Los resultados demostraron que el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* tuvo efecto inhibitorio tanto en las cepas de *Staphylococcus aureus* como en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, generando halos de inhibición con promedios de hasta 14.2 mm en la máxima concentración. *Curcuma longa* inhibió el crecimiento de todas las cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* estudiadas, generando promedios de los halos de inhibición de hasta 7.2 mm. En *Plantago major* el efecto inhibitorio fue reducido, generando promedios máximos de hasta 5.7 mm en *Staphylococcus aureus*. Resultados similares se dieron con el extracto etanólico de *Verbena officinalis*, en dónde el efecto inhibitorio máximo se evidenció en *S. aureus*, con un promedio máximo de 7.22 mm. Con el presente estudio se concluye que los extractos etanólicos de *Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major* y *Verbena officinalis* tienen efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Palabras Claves: Efecto inhibitorio, *Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major*, *Verbena officinalis*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

## ABSTRACT

The present experimental study was made based on the determination of the In Vitro inhibitory effect of the ethanolic extracts of *Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major* and *Verbena officinalis*, at concentrations of 900, 800, 700 and 600 mg / ml each, on the growth of three different strains of *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 and SA103) and *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 and AR104). For this, the ethanolic extract was obtained taking as reference the method used by Altamirano Fernández & Castro Bruno (2017). The Method of Diffusion in Agar (Kirby-Bauer Method) was chosen to perform the susceptibility tests. The results showed that the ethanolic extract of *Caesalpinia spinosa* had an inhibitory effect both on the strains of *Staphylococcus aureus* and on the strains of *Pseudomonas aeruginosa*, generating halos of inhibition with averages of up to 14.2 mm in the maximum concentration. *Curcuma longa* inhibited the growth of all strains of *S. aureus* and *P. aeruginosa* studied, generating averages of inhibition halos of up to 7.2 mm. In *Plantago major* the inhibitory effect was reduced, generating maximum averages of up to 5.7 mm in *Staphylococcus aureus*. Similar results were obtained with the ethanolic extract of *Verbena officinalis*, where the maximum inhibitory effect was evidenced in *S. aureus*, with a maximum average of 7.22 mm. With the present study it is concluded that the ethanolic extracts of *Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major* and *Verbena officinalis* have an inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

Key Words: Inhibitory effect, *Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major*, *Verbena officinalis*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*.

# **1. INTRODUCCIÓN**

## INTRODUCCIÓN

En múltiples regiones del mundo, incluyendo el Perú, *Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major* y *Verbena officinalis* suelen ser las opciones más factibles en la cura de diversas enfermedades. Es de conocimiento empírico que los componentes de dichas plantas tienen acción directa sobre diversos órganos de nuestro sistema, así como también sobre agentes infecciosos que causan múltiples enfermedades, por ello se les otorga diversas propiedades curativas, entre ellas destacan la antiinflamatoria, analgésica, cicatrizante, antioxidante y antibiótica. *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* fueron las especies bacterianas utilizadas en la presente investigación; debido a que están involucradas en infecciones de la piel y mucosas, tracto respiratorio superior, e incluso llegan a generar infecciones sistémicas. En la actualidad estos microorganismos presentan un alto índice de resistencia a los antimicrobianos, siendo este el motivo por el cual la medicina contemporánea ha empezado a interesarse por los tratamientos alternativos, dentro de los cuales encontramos el uso de plantas con propiedades medicinales. Como consecuencia, hoy en día existe mayor interés en determinar si realmente son ciertas las propiedades antibacterianas atribuidas empíricamente. Diversos estudios indican que la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de estas plantas se debe a Taninos y Flavonoides (*Caesalpinia spinosa*), curcuminoides y flavonoides (*Curcuma longa*), flavonoides, alcaloides y terpenoides (*Plantago major*), iridoides, flavonoides y derivados del ácido fenólico (*Verbena officinalis*). Escasas son las investigaciones realizadas en las plantas en cuestión con respecto al efecto inhibitorio que provocan los derivados de sus productos, tales como extractos o aceites esenciales. Siendo este el panorama, se tomaron como referencia investigaciones previas, en las cuales se determinó la inhibición del crecimiento de bacterias tanto gram positivas como gram negativas, entre ellas destacan *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*,

*Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*, utilizando los extractos etanólicos de dichas especies vegetales, obteniéndose resultados variables en la inhibición de su crecimiento. A partir de lo expuesto se planteó como objetivo determinar el efecto inhibitorio *in vitro* de los extractos etanólicos de *Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major* y *Verbena officinalis* a concentraciones de 900, 800 700 y 600 mg/ml sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103), *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104).

En base a lo expuesto, se planteó el siguiente problema: ¿Existe efecto inhibitorio *in vitro* de los extractos etanólicos de *Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major* y *Verbena officinalis* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*? Siendo la hipótesis, que: Los extractos etanólicos de *Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major* y *Verbena officinalis* inhiben el crecimiento *in vitro* de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. El objetivo principal de la presente investigación fue determinar el efecto inhibitorio *in vitro* de los extractos etanólicos de *Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major* y *Verbena officinalis* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*; mientras que los objetivos específicos fueron obtener extractos etanólicos a partir de las hojas de *Caesalpinia spinosa*, *Plantago major* y *Verbena officinalis*, y rizomas de *Curcuma longa* y así comparar el efecto inhibitorio provocado por las diferentes concentraciones de los extractos etanólicos de *Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major* y *Verbena officinalis*, mediante la medida del diámetro de los halos de inhibición generados sobre los cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

## **2. ANTECEDENTES**

En Japón, 60 a 70% de los médicos alopáticos (convencionales) usan medicamentos tradicionales para sus pacientes. En China, alrededor de 40% del tratamiento médico es proveído por la Medicina Tradicional. En Estados Unidos, el número de visitas a proveedores de Medicina Alternativa Complementaria (MAC) ahora excede al número de visitas a médicos de atención primaria; por otro lado, en América Latina, la Oficina Regional de la Organización Mundial de Salud de las Américas (OMS/OPS) reporta que 71% de la población de Chile y 40% de la población de Colombia ha usado la Medicina Tradicional (Rainer & Douglas, 2015). Además, un estudio reciente sobre el costo-eficacia de la medicina tradicional, llamada también complementaria y alternativa, realizado por el Gobierno del Perú y respaldado por la Oficina Regional de la OMS concluyó que los costos directos del uso de esa medicina eran inferiores a los de la terapia convencional, y que su eficacia era superior, con menos efectos secundarios (Organización Mundial de la Salud (OMS), 2009).

La medicina tradicional se utiliza globalmente y tiene una importancia económica que está creciendo rápidamente. En los países en vías de desarrollo la medicina tradicional a menudo es el único modo de tratamiento accesible y económicamente factible. En muchos países asiáticos la medicina tradicional es usada ampliamente a pesar de que la medicina occidental frecuentemente está disponible (Bussmann & Sharon, 2015).

## **2.1. EXTRACTO ETANÓLICO VEGETAL**

Los extractos vegetales pertenecen a uno de los métodos farmacéuticos más antiguos. Se conoce como extracto a un producto sólido o espeso obtenido por evaporación de un zumo o de una disolución de sustancias vegetales o animales (Real Academia Española, 2019). En el caso de los extractos etanólicos vegetales, la disolución está compuesta por el soluto, la sustancia vegetal, y el etanol que vendría a ser el solvente. Esta disolución pasa por un previo proceso de maceración. La extracción consiste,

principalmente, en la obtención de principios biológicamente activos, a partir del empleo de solventes seleccionados y de un proceso adecuado de extracción.

En cuanto a su consistencia, los extractos pueden ser líquidos, ligeramente espesos (extractos fluidos o tinturas); pueden ser semisólidos, con una consistencia similar a la miel (extractos blandos o densos); y también los hay sólidos (extractos secos). La diferencia entre las consistencias se debe a que en cada extracción se obtiene un complejo sistema de sustancias activas de diferente procedencia, lo que los hace relativamente impuros, tomando entonces el aspecto de los compuestos predominantes.

La maceración es uno de los procedimientos de extracción más simples y más usados. En este proceso se protege de la luz a la disolución, esto para evitar posibles reacciones y debe agitarse continuamente (tres veces por día, aproximadamente); el tiempo de maceración es diverso, las distintas Farmacopeas prescriben tiempos que oscilan entre cuatro y diez días. Es necesario mencionar que a partir de este método no es posible conseguir el total agotamiento de las sustancias extraídas (Voigt, 1982).

## **2.2. PLANTAS MEDICINALES**

Los pueblos indígenas, sobre todo los pueblos peruanos, poseen un vasto conocimiento sobre plantas medicinales. Es bien conocido que esta información es transmitida a las nuevas generaciones de forma oral y, en aras de la globalización, es cada vez más reducido el número de lenguas indígenas vigentes, por lo que estos conocimientos ancestrales corren peligro. Por lo tanto, es necesario que el estudio de estas plantas se convierta en una necesidad orientada a salvaguardar y proteger estos saberes tradicionales (Rainer & Douglas, 2015).



Según Santibáñez & Cabrera (2013), es un error frecuente asumir que las plantas medicinales, por el hecho de ser “naturales”, son totalmente inocuas. Se debe tener en consideración que la difusión de los usos tradicionales tiene por finalidad dar a conocer los diversos saberes ancestrales; además, permite contar con una fuente referencial para emprender estudios que validen dicha información y para iniciar los estudios clínicos correspondientes. Por lo tanto, es necesario realizar investigaciones más amplias para poder validar el conocimiento empírico.

Mejía & Rengifo (2000), recopilaron en su estudio a 105 especies que corresponden a 51 familias botánicas que tienen un extendido uso en el tratamiento popular de las enfermedades. Las más representativas fueron las Solanáceas con nueve especies, Fabáceas con siete y las Euforbiáceas con 6 especies. En un estudio más reciente, Rainer & Douglas (2015) al estudiar plantas de los Andes y de la Amazonía encontraron que 510 plantas con propiedades medicinales que se registraron en el norte del Perú, con un total de 2599 usos encontrados. Estas especies son utilizadas para aliviar diversas afecciones médicas, las cuales se aplican de manera diferente para la misma condición.

### **2.3. TARA (*Caesalpinia spinosa*)**

*Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze es un arbusto o árbol siempre verde. Presenta una altura de 3 a 5 metros de altura, pudiendo alcanzar los 8 metros como máximo, y es conocido por diversos nombres comunes, tales como: tara, taya, algarroba, huarango, tanino, guaranga y caranca (Ulibarri, 1996).

*Caesalpinia spinosa* pertenece al Reino Vegetal, División Espermatofita, Clase Angiosperma, Orden Fabales, Familia *Caesalpinieae* (*Fabaceae*) y Especie *Caesalpinia Spinosa* Kuntze.

Mundialmente, su distribución predomina en regiones estacionalmente secas de Perú, Bolivia y el norte de Chile, dispuesta tanto en los Andes como en los valles interandinos. También ha sido encontrada en Venezuela, Colombia, Ecuador, en Cuba y las Antillas, dónde es cultivada. *Caesalpinia spinosa* ha sido introducida y cultivada en Brasil, Argentina, África y Estados Unidos (Roque Gamarra, Echeverría Cano, & Brockamp, 2009). Específicamente en el Perú, podemos encontrar que su distribución recorre todo el largo de la costa, desde Piura hasta Tacna, y en la sierra en los departamentos de Ancash, Apurímac, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Huancavelica, Junín y Pasco (Brako & Zarucchi, 1993). También existen reportes de avistamientos de *C. spinosa* en Madre de Dios, pero podría tratarse de especímenes cultivados. Se encuentra en las laderas andinas, valles y orillas de ríos de la vertiente occidental de los Andes, desde el nivel del mar hasta los 3.000 msnm (De la Cruz, 2004).

Este vegetal presenta como metabolito secundario predominante a los Taninos, los cuales le otorgan propiedades antimicrobianas. Las cualidades antimicrobianas de los taninos se debe en gran parte a las propiedades estructurales que posee, tales como: solubilidad al agua, masa molecular entre 300 y 5000, estructura y carácter polifenólico (12 a 16 grupos fenólicos y de 5 a 7 anillos aromáticos por cada 1000 unidades de masa molecular relativa), complejación intermolecular (astringencia), capacidad de conformar estructuras mayores como los taninos condensados y también grupos menores como los taninos hidrolizados y florotaninos (Isaza, 2007). Por las cualidades antibióticas mencionadas es que *Caesalpinia spinosa* es utilizada comúnmente en casos de laringitis, faringitis y amigdalitis; también es aplicado sobre infecciones a la piel producidas por hongos, amebas y bacterias transmitidas a través de mordeduras de animales y demás lesiones dérmicas; una aplicación adicional

encontrada fue sobre los órganos reproductores femeninos, como desinflamante de ovarios, útero y vagina (Rainer & Douglas, 2015).

Dostert, Roque, Brokamp, Cano, Weigend y La Torre (2009), realizaron un estudio en el cual hallaron que los taninos y flavonoides son metabolitos encontrados en el estudio fitoquímico del extracto de *Caesalpinia spinosa*, que se encuentran en diferentes partes de la planta. Estos son solubles en agua, etanol, acetona y otros disolventes orgánicos. Además, encontraron que tienen acción farmacológica como antihemorrágico local, antidiarreico, antihepatóxica y antibacteriano.

Por otro lado, Cano & Quispe (2017), investigaron el efecto que ejercía la infusión y el aceite esencial de *Cesalpinia spinosa* (Tara) sobre distintas cepas de *Streptococcus mutans*. Las concentraciones de infusión fueron de 50, 75 y 100%. Los resultados obtenidos fueron que la infusión de *Caesalpinia spinosa* tiene un efecto inhibitorio sobre las cepas de *Streptococos mutans* en sus concentraciones de 50, 75 y 100% con un promedio de 14.20mm, 16.57mm y 17.11mm a las 24 horas y un promedio de 12.30 mm, 13.39 mm y 14.63 mm a las 48 horas respectivamente. El aceite esencial de *Caesalpinia spinosa* tiene un efecto inhibitorio mayor con respecto a la infusión con un promedio de 18.09 mm a las 24 horas y con 15.04 mm a las 48 horas. Concluyeron que la infusión tiene un efecto inhibitorio sobre las cepas de *Streptococos mutans*, y a mayor concentración mayor efectividad. El efecto del aceite esencial de *Caesalpinia spinosa* es mayor en comparación a la infusión. Los grupos experimentales son más efectivos a las 24 horas que a las 48 horas.

En la investigación de Huarino & Ramos (2013), se trató de inhibir la flora mixta salival empleando distintas concentraciones de extracto alcohólico de las vainas de *Caesalpinia spinosa* “tara”. Mediante el método de difusión en placa se usó la flora mixta salival, para enfrentarlas a las soluciones de 6,25, 12,5, 25, 50 y 75 mg/mL del

EACS y compararlas con los controles positivo Clorhexidina 0.12 % y Alcohol 70°. Los resultados mostraron que el extracto alcohólico de *Caesalpinia spinosa* sobre la flora mixta salival tiene actividad antibacteriana in vitro sobre dichos cultivos, siendo la media de los diámetros de los halos de inhibición 12,32, 13,8, 14,92, 15,48 y 17,32 mm para 6,25, 12,5, 25, 50 y 75 mg/mL de EACS respectivamente, concluyendo que el extracto alcohólico de las vainas de la *C. spinosa* tiene efecto antibacteriano sobre la flora bacteriana mixta salival.

## 2.4. CÚRCUMA (*Curcuma longa*)

Se trata de una planta perenne herbácea, cuyo vástago aéreo llega a medir hasta 1 metro de altura, y es conocido por diversos nombres comunes, tales como polluelo, azafrán cimarrón; yuquilla (Cuba), turmérico, jengibrillo (Puerto Rico), palillo cholón, palillo chuncho, guisador, palillo (Perú, Bolivia) (Nazeema & Rema, 1994).

*Curcuma longa* pertenece al Reino Vegetal, División Magnoliophyta, Clase Liliopsida, Orden Zingiberales, Familia Zingiberaceae, Género *Curcuma*, especie *Curcuma longa* L.

El origen exacto de la cúrcuma es desconocido, pero se cree que se origina en el sur o sureste Asiático, probablemente en la India (Rethinam, Sivaraman, & Sushama, 1994). Perú es el productor más importante de cúrcuma en América del sur. Además, también se cultiva en el Caribe, y en América Central (Nair & Prabhakaran, 2013).

Es importante resaltar que el rizoma de la cúrcuma fue adoptado como producto medicinal por el Comité de Productos Medicinales Herbales (Committee on Herbal Medicinal Products) el 12 de noviembre de 2009. Son muchas las propiedades atribuidas a los extractos de *C. longa* y a su principal componente, la curcumina. Esta planta ha sido usada en una gran cantidad de sistemas de medicina tradicional (China,

Hindú y Ayurvédica) para aliviar problemas digestivos, como un antiinflamatorio y en uso tópico por su capacidad de cicatrización (Blumenthal, Goldberg, & Brinckmann, 2000). Actualmente es utilizada como aromatizante de alimentos, como componente de productos cosméticos, también ha sido utilizada en la protección y tratamiento de afecciones cutáneas, hepáticas, digestivas y contra parásitos intestinales, como remedio de venenos y de picaduras de serpientes, además de ser un potente bactericida (Mesa, Ramirez Tortosa, Aguilera, Ramirez Boscá, & Gil, 2000).

La curcumina tiene varios efectos medicinales comprobados científicamente, los responsables son los curcuminoides, especialmente la curcumina, compuesto fenólico del metabolismo secundario que tiene una poderosa acción antimicrobiana, característica que le permite inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, virus y hongos (Witkin, 2013).

En cuanto a los reportes bibliográficos existentes sobre los compuestos fitoquímicos del rizoma de la cúrcuma, se destaca la presencia de saponinas, taninos, alcaloides y flavonoides (Chairman, Jayamala, Christy, & Singh, 2015), siendo estos últimos responsables de la actividad antibacteriana en varias plantas (Cordell, Quinn, & Farnsworth, 2001).

García, Olaya, Sierra, Padilla (2017) purificaron tres curcuminoides (curcumina, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina) desde el rizoma de la planta, en estado seco, por cromatografía en columna. Posteriormente evaluaron la actividad antimicrobiana en bacterias y hongos por el método modificado de pozos de agar, obteniendo como resultado la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

En un trabajo de investigación realizado por García et al. (2011), descubrieron que el extracto etanólico de las hojas y fracciones de diferente polaridad (hexano, acetato de etilo, butanol y etanol) presentaron actividad antimicrobiana contra *S. aureus*, *E. coli* y *Aspergillus niger*, mientras que los curcuminoides (curcumina, demetoxicurcumina y bisdemetoxicurcumina) tuvieron actividad frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*.

## 2.5. LLANTÉN (*Plantago major*)

Se trata de una hierba perenne que desarrolla su ciclo de vida entre seis y siete meses. Posee una altura entre los 15 cm a 30 cm; sin embargo, su longitud puede variar según hábitat de crecimiento (Berit, 2000). Es conocido comúnmente como Llantai, Llantén macho, Llantén mayor, o simplemente como Llantén (Blanco, Saborío, & Garro, 2008).

*Plantago major* es una planta que pertenece a la división Magnoliópsida, clase Magnoliópsida, orden Plantaginales y a la familia Plantaginaceae (INBio, 2005).

Las especies del género *Plantago* crecen desde el nivel del mar hasta los 3500 msnm y se distribuyen en casi todos los tipos de hábitats, incluidos desiertos, acantilados, bosques, áreas perturbadas y montañas tropicales (Sagar & Harper, 1964). *Plantago major* es una especie originada en Eurasia, que actualmente se encuentra naturalizada en casi todo el mundo (Primack, 1978).

El llantén contiene varios constituyentes químicos que incluyen flavonoides, alcaloides, terpenoides, derivados de ácido fenólico, glucósidos iridoides, ácidos grasos, polisacáridos y vitaminas que contribuyen con sus efectos terapéuticos específicos. Estos fitoquímicos se encuentran distribuidos en sus hojas, semillas y raíces, las cuales son preparadas comúnmente en infusiones para el tratamiento de

diversas afecciones (Samuelson, 2000). Correspondientemente, estudios han encontrado que *Plantago major* es efectivo como curador de heridas, así como como agente antiulcerativo, antidiabético, antidiarreico, antiinflamatorio, antibacteriano y antiviral (Bahrain, Taher, & Fathiy, 2017).

Castillo, Trejo, Caballero, Meza, Domínguez, Olivier y Pulido (2016) evaluaron la capacidad antibacteriana de los extractos acetónicos de varios tipos de plantas, incluyendo *Plantago major*, enfrentándola con *E. coli* y *Bacillus cereus*. 10 µL de extracto acetónico previamente preparado con 1µg del extracto seco disuelto completamente en 1mL de disolvente fue la concentración única usada. Para la prueba de actividad antimicrobiana se utilizó la técnica de difusión en agar con discos de papel filtro de 7 mm de diámetro. Como resultado se obtuvieron halos de 1 cm en *Bacillus cereus*, y halos de 0.5 en *E. coli*, concluyendo que *Plantago major* tiene un bajo efecto inhibitorio en *E. coli* y *Bacillus cereus*.

Resultados muy distintos a los anteriores se obtuvieron en las investigaciones realizadas por Crisanto y Reaño (2016), ya que ellos demostraron que el extracto etanólico de hojas de *Plantago major* enfrentado a cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, mediante el método de difusión en placa, generaron notables halos de inhibición de 20.6 mm y 24 mm a una concentración de 12mg y 6 mg respectivamente, concluyendo de esta forma que el extracto de *Plantago major* posee propiedades antimicrobianas por el método de difusión de disco frente a gram positivas (*Staphylococcus aureus* con halos de inhibición promedio de 21 mm) y gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa* con halos de inhibición promedio de 24 mm) concluyendo que se pueden utilizar como una fuente potencial de principios activos para la generación de productos farmacéuticos.

Por otro lado, se encuentran los resultados de Lapenna (2003), quién evaluó la eficacia inhibitoria entre el extracto metanólico de *Plantago major* (llantén) y clindamicina sobre colonias de *Staphylococcus aureus*. El trabajo se realizó mediante el método de disco difusión en agar, utilizando concentraciones de 25, 50 y 100% del extracto metanólico de las hojas de llantén y discos con clindamicina de 2µg, realizando el ensayo por triplicado. Los resultados mostraron que el extracto metanólico no presentó efecto inhibitorio (halos promedio de 6 mm) sobre el crecimiento de la cepa en estudio; sin embargo con la clindamicina sí se obtuvo la inhibición de la cepa (halos promedio de 12,7mm). Por lo tanto, concluyó que el extracto metanólico de *Plantago major* no inhibe el crecimiento de *S. aureus*.

## **2.6. VERBENA (*Verbena officinalis*)**

La verbena es una hierba perenne erecta, anual o de corta duración, casi glabra, con tallos de sección cuadrangular de ángulos escábridos (con pelos cortos, rígidos y ásperos), extendida y ondulada que puede crecer hasta 80 cm de altura (Tobyn, Denham, & Whitelegg, 2011).

Se trata de una planta perteneciente a la División Magnoliophyta, a la Clase Magnoliopsida (dicotiledóneas), al Orden Lamiales, Familia Verbenaceae (Naturalista, 2019).

*Verbena officinalis* es comúnmente usado como tratamiento antitumoral, antioxidante y antifúngico; posee eficacia anti radicales libres, analgésica, efectos neuroprotectores, actividad antiinflamatoria, cicatrizante de heridas, actividad anti tripanozoma cruzi, actividad anticonceptiva y antioxidante, antiinflamatoria, anti-rinusitis, actividad antibiótica contra infecciones dérmicas (Sepideh & Sadegh, 2016).



Diversos estudios se han centrado en caracterizar los componentes bioquímicos de *Verbena officinalis*, dentro de ellos destaca la investigación realizada por Rehechoa, Hidalgo, Iñiguez, García, Ansorenab, Caverod, Calvoa (2011) obtuvieron y caracterizaron extractos acuosos e hidroalcohólicos obtenidos de *Verbena officinalis* L. y les permitió la detección e identificación de tres iridoides, quince flavonoides y cuatro derivados del ácido fenólico. El verbascósido, un heterósido de un feniletanoide y el ácido cafeico, ha sido encontrado en diversos géneros de la familia Verbenaceae, incluyendo el género *Verbena* (Wang, Zhi, Zhang, Wang, Suo, Xie, Li, Zhang, Du, Gu & Sun, 2017). Recientemente se han reportados propiedades analgésicas y antimicrobianas para el verbascósido y han sido estudiados algunos iridoides como potenciales agentes antimicrobianos. Estos estudios han demostrado que los iridoides, como glucósido, no tiene actividad alguna, sin embargo, bajo hidrolisis enzimática potencia la actividad antimicrobiana y antitumoral. Las plantas con elevado contenido en verbascósido se han utilizado tradicionalmente para el tratamiento de infecciones microbianas, como por ejemplo frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. Se ha demostrado que esta molécula junto a otros polifenoles reducen el número de UFC/mL en las salmueras de aceitunas manzanilla. Por este motivo se ha empezado a utilizar como conservante alimenticio, reduciendo la carga microbiana de los alimentos (Aligiannis, Mitaku, Tsitsa-Tsardis, Harvala, Tsaknis, Lalas & Haroutounian 2003). El verbascósido tiene efectos antiplasmídicos, inhibiendo así la transferencia de resistencia a antibióticos, como se ha demostrado en cepas de *Escherichia coli* (Molnár, Gunics, Mucsi, Koltai, Petri, Shoyama, Matsumoto & Nishioka, 1989).

En un estudio realizado por Ahmed (2017), se evaluó el potencial antimicrobiano de los extractos etanólicos sus tallos, hojas y raíces, y sus fracciones en dichos solventes,

frente a 24 cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Los tallos demostraron ser más potentes contra todas las cepas, e incluso presentaron mayor actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* que el antibiótico Amoxicilina. Las Hojas y raíces mostraron la misma efectividad, inclusive frente a un rango más amplio de especies bacterianas.

Sahile, Habtamu y Chandrodyam (2015) probaron el efecto antibacteriano de los extractos metanólicos de *V. officinalis* en seis ensayos, utilizando pozos de difusión en agar y métodos de difusión en disco; concluyeron que los extractos de las hojas inhiben el crecimiento de *S. boydii*, *S. pneumoniae* y *S. aureus*, y que el extracto de raíz tiene un efecto antibacteriano moderado frente a *S. aureus*; por lo tanto, las cepas de *S. boydii*, *S. pneumoniae* y *S. aureus* fueron más sensibles a los extractos metanólicos que las cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa*.

## **2.7. *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* se trata de una bacteria comensal e importante patógeno humano causante de una amplia gama de infecciones clínicas. Aproximadamente el 30% de la población humana está colonizada por *S. aureus* (Wertheim; Melles; Vos; Leeuwen, Van; Belkum, Van; Verbrugh & Nouwen 2005). Simultáneamente, es una de las principales causas de bacteriemia y endocarditis infecciosa, así como infecciones osteoarticulares, de piel y tejidos blandos, pleuropulmonares y relacionadas con dispositivos de ventilación.

*Staphylococcus aureus* es sumamente resistente a la meticilina (MRSA) y otros antibióticos que antes eran eficaces contra el tratamiento de las infecciones. Desde el punto de vista genómico, la resistencia se produce por selección natural a través de mutaciones producidas al azar; sin embargo, también se pueden inducir

artificialmente mediante la aplicación de una presión selectiva a una población, como sería el abuso o la utilización de antibióticos (Zendejas, Avalos, & Soto, 2014).

## **2.8. *Pseudomonas aeruginosa***

Se trata de un patógeno oportunista que es la causa principal de morbilidad y mortalidad en pacientes con fibrosis quística e individuos inmunocomprometidos. También es responsable de numerosos casos de infección nosocomial, afectando principalmente a pacientes con quemaduras graves, heridas quirúrgicas, neutropenia o con infecciones pulmonares subyacentes. Puede ocasionar, entre otros: neumonía, meningitis, sobreinfección de heridas, ectima gangrenoso, infecciones urinarias, infecciones osteoarticulares, endocarditis, infecciones oculares o septicemias (Chiriac, Brzezinski, Foia, & Marincu, 2015).

Mensa, Barberán, Soriano, Linares, Marco, Cantón & Bou (2018), señalan que la erradicación de *P. aeruginosa* se ha vuelto cada vez más difícil debido a su notable resistencia intrínseca a los antibióticos mediada fundamentalmente por la expresión de  $\beta$ -lactamasas cromosómicas inducibles y la producción constitutiva o inducible de bombas de expulsión. Además de esta resistencia intrínseca, *P. aeruginosa* posee una extraordinaria capacidad para desarrollar resistencia a prácticamente todos los antimicrobianos disponibles a través de la selección de mutaciones. El aumento progresivo de la resistencia en *P. aeruginosa* ha llevado a la aparición de cepas que, de acuerdo con el grado de resistencia frente a los antibióticos habituales, se han definido como multirresistentes, extensamente resistentes y panresistentes. Estas cepas se están diseminando mundialmente, complicando progresivamente el tratamiento de las infecciones por *P. aeruginosa*.

### **3. MATERIALES Y METODOS**

### **3.1. POBLACIÓN Y MUESTRA**

El tamaño de la muestra está constituida por un número de 96 unidades experimentales; las cuales corresponden a 2 especies bacterianas procedentes de muestras clínicas, 3 cepas por especie; 4 tipos de extracto a 4 concentraciones diferentes. Realizándose 3 repeticiones en el experimento, resultando finalmente un total de 288 unidades experimentales. Las hojas y tallos de las especies vegetales de *Caesalpinia spinosa* (Tara), *Plantago major* (Llantén), *Verbena officinalis* (Verbena), y rizomas de *Curcuma longa* (Cúrcuma), constituyen el material biológico. Estas muestras proceden de diversos puntos de recolección, siendo adquiridas en el mercado modelo del distrito de Chiclayo, departamento de Lambayeque.

### **3.2. MATERIALES**

#### **3.2.1. Material Botánico**

Estuvo constituido por hojas de *Caesalpinia spinosa* (Tara), rizomas de *Curcuma longa* (Cúrcuma), hojas y espigas de *Plantago major* (Llantén), y hojas, tallos e inflorescencias de *Verbena officinalis* (Verbena).

#### **3.2.2. Material Microbiológico**

Estuvo conformado por tres cepas de *Staphylococcus aureus*, y tres cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, procedentes del laboratorio de Microbiología Humana de la especialidad de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo de Lambayeque.

### **3.3. MÉTODOS Y TÉCNICAS**

#### **3.3.1. Obtención del Material Vegetal de *Caesalpinia spinosa* (Tara), *Curcuma longa* (Cúrcuma), *Plantago major* (Llantén) y *Verbena officinalis* (Verbena).**

El material vegetal fue adquirido en el centro de expendio del Mercado Modelo de la ciudad de Chiclayo, departamento de Lambayeque. La identificación taxonómica fue realizada por el Msc. José Ayasta Varona, y las muestras botánicas se encuentran depositadas en el Herbario Pedro Ruiz Gallo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo con los códigos 18725 para *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, 18726 para *Plantago major* L., y 18727 para *Verbena officinalis* L. (Anexo 1; Anexo 2). Con el fin de realizar una deshidratación que facilite la trituration de las hojas, tallos y rizomas, estos fueron puestos a secar en una estufa a 60 °C durante 48 horas, con ventilación y sin exposición solar, dentro del área donde se realizará la extracción (Altamirano & Castro, 2017).

#### **3.3.2. Obtención del Extracto Etanólico a Partir de *Caesalpinia spinosa* (Tara), *Curcuma longa* (Cúrcuma), *Plantago major* (Llantén) y *Verbena officinalis* (Verbena)**

Se procedió a escoger, entre la totalidad de hojas y tallos, aquellos que se encuentren libres de hongos y lesiones. Posteriormente fueron triturados y envasados en frascos de vidrio esterilizados hasta su procesamiento. La técnica de extracción de elección fue la maceración, en la cual se utilizó etanol al 96° como disolvente; esta solución fue agitada y dejada en reposo por un periodo de dos semanas.

Para la obtención del extracto, el producto fue filtrado y llevado a estufa a una temperatura de 37 °C para acelerar la total evaporación del etanol y así obtener el extracto puro (Figura 1). Posteriormente el producto fue disuelto en etanol al 40% en proporción 1:1 (g/ml), y al resultado se le denominó solución madre, a partir del cual se realizaron las concentraciones correspondientes de 900, 800, 700 y 600 mg/ml, mediante la incorporación de agua destilada esterilizada (Altamirano Fernández & Castro Bruno, 2017) (Anexo 5).

### **3.3.3. Reconstitución y Estandarización del Inóculo Bacteriano**

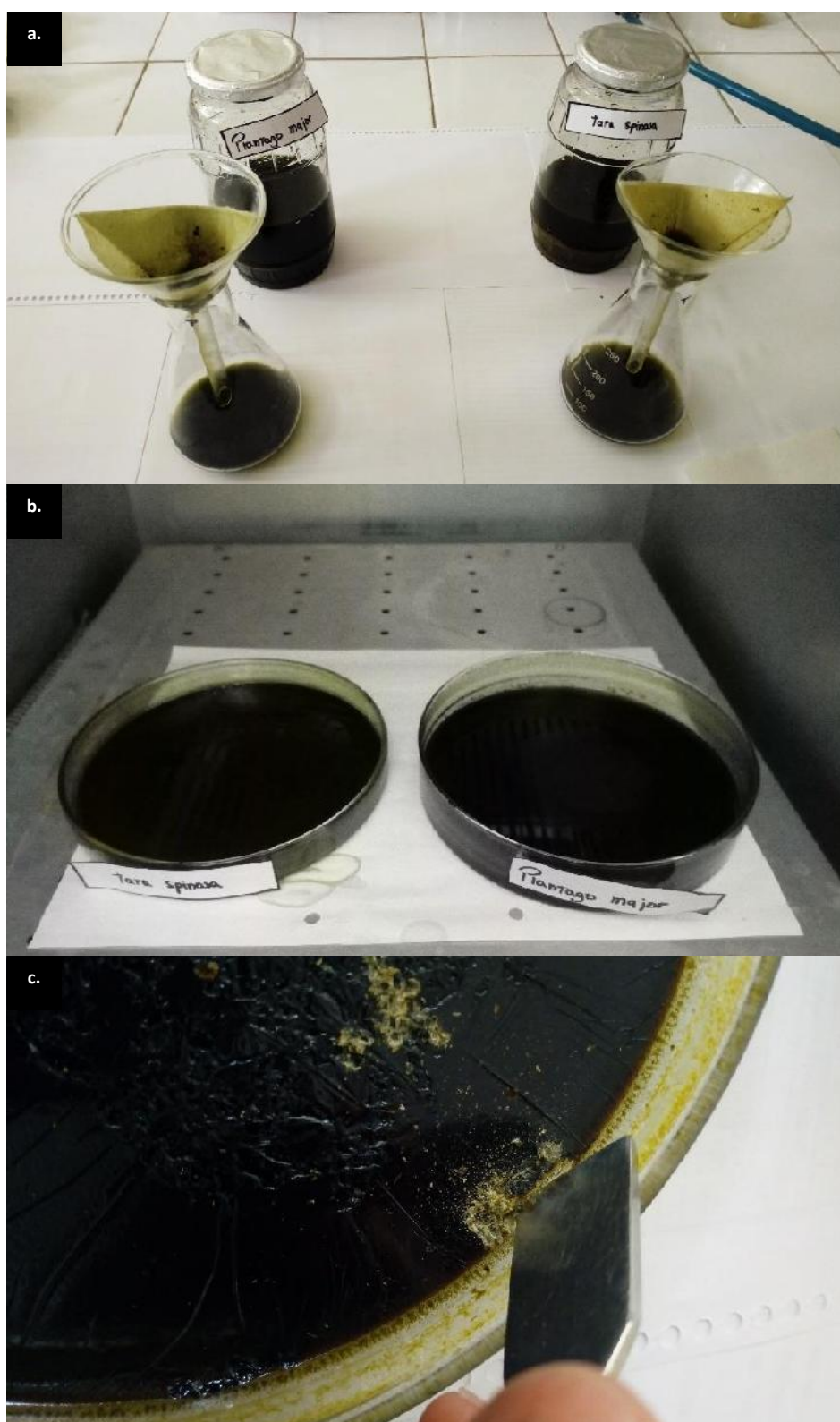
Partiendo de un cultivo axénico, se tomaron de 2 a 4 colonias de cada una de las cepas bacterianas (Figura 2; Anexo 4) e inmediatamente fueron sembradas por separado en 9mL de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) e incubadas a  $36 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 18 a 24 horas. Posterior a la incubación se realizó la estandarización del inóculo de acuerdo a la escala N° 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland, el cual equivale a  $1.5 \times 10^8$  bacterias/ml (Zurita, 2013).

### **3.3.4. Preparación de los Discos de Sensibilidad**

La técnica de elección fue la de difusión en disco, se emplearon discos elaborados a base de papel filtro con 5mm de diámetro, los cuales fueron impregnados con extracto crudo y secados en un horno de aire caliente a 60 °C durante 5 minutos.

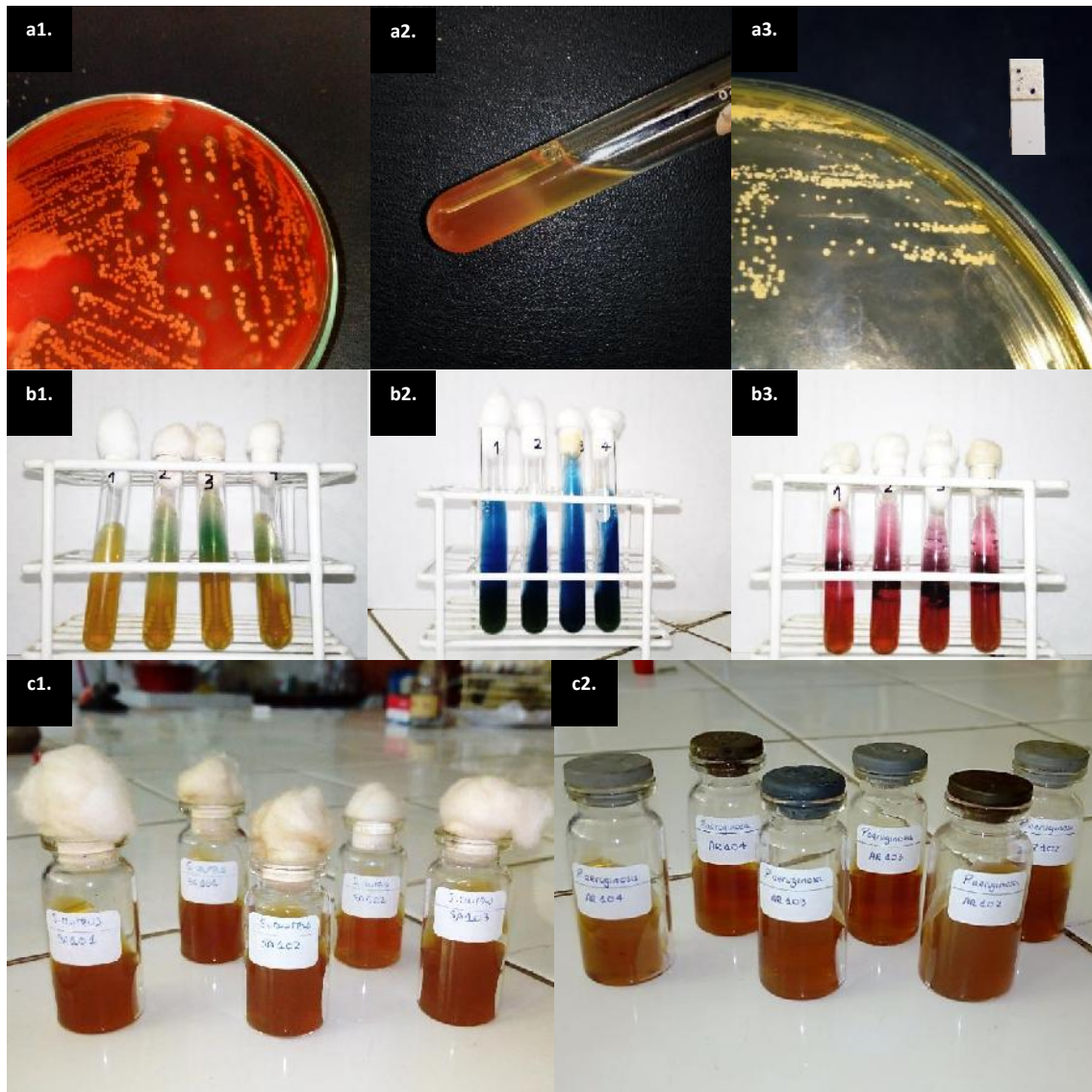
### **3.3.5. Realización de las Pruebas de Sensibilidad Bacteriana**

Los inóculos obtenidos a partir de las diferentes cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa* fueron sembrados, con ayuda de hisopos estériles, sobre la superficie de placas con agar Müller Hinton (de 4mm de grosor). Posteriormente se depositaron los discos de sensibilidad sobre la superficie del agar, cuatro discos distintos conteniendo las concentraciones crecientes del extracto a evaluar (Zurita, 2013).



**Figura 1.** (a) Filtración del macerado (b) Aceleración del proceso de evaporación del etanol del macerado filtrado en una estufa a 37°C (c) Recuperación del Extracto Crudo.





**Figura 2.** (a) Identificación de *Staphylococcus aureus* (a1) colonias grandes, cremosas, convexas y de bordes lisos, con presencia de  $\beta$ -hemólisis en agar sangre (a2) prueba de coagulasa positiva (a3) prueba de oxidasa positiva y fermentación del manitol en placa de agar manita sal, colonias amarillas con bordes amarillos. (b) Identificación de *Pseudomonas aeruginosa* (b1) prueba de producción de pigmento Piorubrina o Piorubrina positiva (b2) test de citrato de Simmons positivo (b3) medio TSI k/k. (c) Cepas bacterianas de (c1) *Staphylococcus aureus* y (c2) *Pseudomonas aeruginosa*, identificadas y rotuladas.

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4.1. RESULTADOS

El presente trabajo de investigación de tipo experimental “*In vitro*” tuvo como objetivo principal la determinación del efecto inhibitorio *in vitro* de los extractos etanólicos de *Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major* y *Verbena officinalis* sobre el crecimiento de las cepas SA101, SA102, SA103 de *Staphylococcus aureus* y de las cepas AR102, AR103 y AR104 de *Pseudomonas aeruginosa*, el cual fue evidenciado por medio la aparición de halos de inhibición. Los resultados son mostrados a continuación en tablas y gráficos con sus respectivas interpretaciones.

### 4.1.1. Efecto Inhibitorio del Extracto Etanólico de *Caesalpinia spinosa* Sobre el Crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

Los resultados obtenidos demostraron que tanto *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103) como *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104) fueron sensibles al extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* (Tara), evidenciándose por la generación de halos de inhibición, cuyos diámetros promedio se incrementan a medida que aumenta la concentración del extracto etanólico.

De la misma forma, se pudo determinar que *Staphylococcus aureus* demostró ser más sensible, cuyo tamaño promedio de los halos de inhibición frente a la concentración del extracto etanólico de 900 mg/ml fue de 15.3 mm en la cepa SA102, llegando a un diámetro de 18 mm en la primera y tercera repetición (Tabla 1; Figura 3; Anexo7).

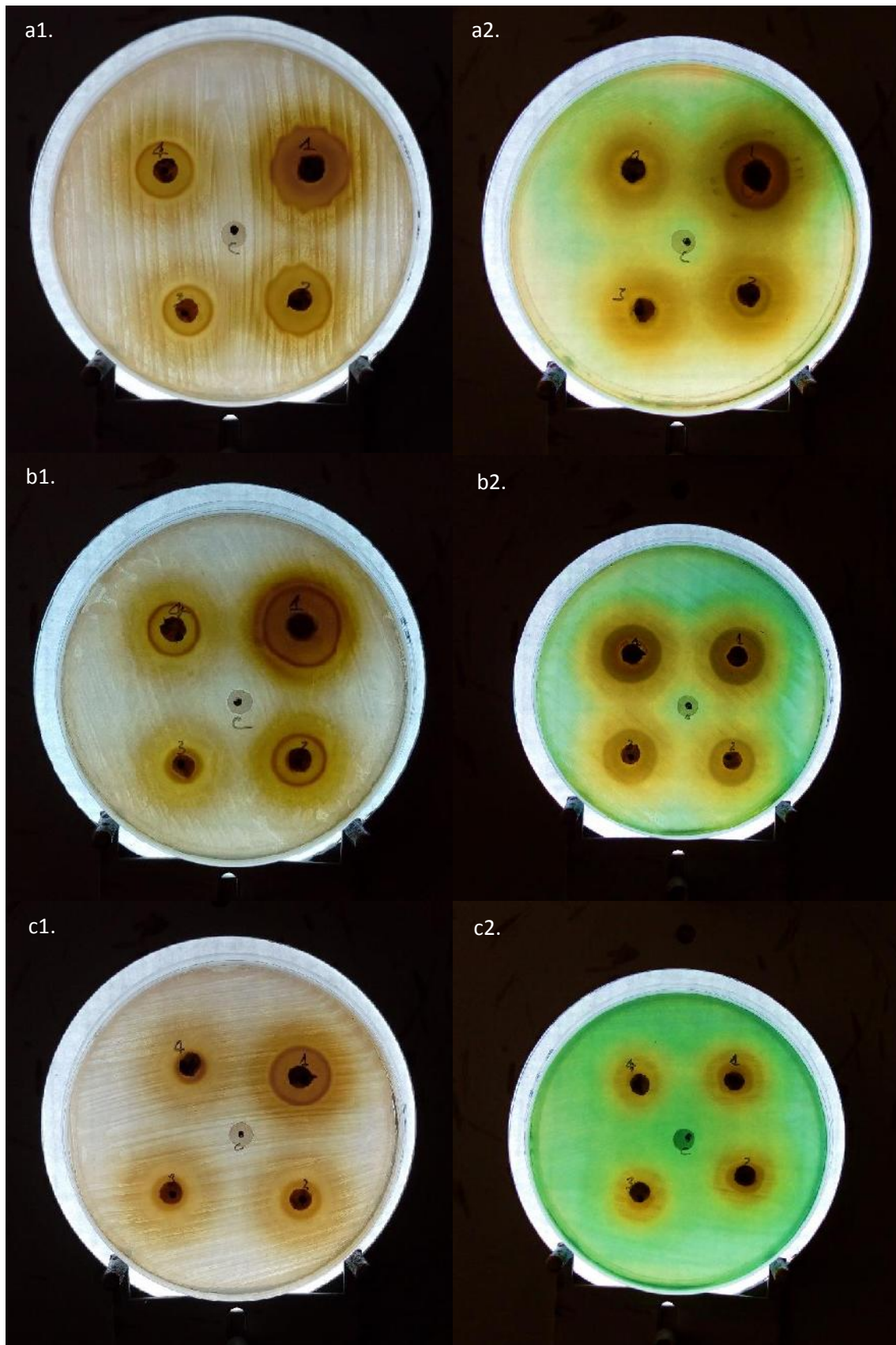
**Tabla 1.** Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103).

Concentración del Extracto Etanólico (mg/ml)	Promedio de los Halos de Inhibición (mm)			
	<i>Staphylococcus aureus</i>			
	SA101	SA102	SA103	PROM
900	13.333	15.333	14	14.2
800	12	12.667	12	12.222
700	9.667	11.333	11.333	10.777
600	9	11.333	11.333	10.555
PROMEDIO	11	12.667	12.166	

Con respecto a *Pseudomonas aeruginosa*, el rango promedio de los halos de inhibición fluctúa entre 11.5 mm a 8.8 mm. En relación al efecto inhibitorio global, la cepa AR102 tuvo un promedio de 10.8 mm en el diámetro de sus halos de inhibición, la cepa AR103 tuvo un promedio de 9.2 mm y la cepa AR104 9.6 mm (Tabla 2; Figura 3).

**Tabla 2.** Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104).

Concentración del Extracto Etanólico (mg/ml)	Promedio de los Halos de Inhibición (mm)			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
	AR102	AR103	AR104	PROM
900	12.667	12	10	11.556
800	10.667	9.6667	9.3333	9.889
700	10	8	10	9.333
600	10	7.333	9.333	8.866
PROMEDIO	10.833	9.249	9.666	



**Figura 3.** Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre *Staphylococcus aureus* (**a1**) primera repetición (**b1**) segunda repetición y (**c1**) tercera repetición; y sobre *Pseudomonas aeruginosa* (**a2**) primera repetición (**b2**) segunda repetición (**c3**) tercera repetición.

#### 4.1.2. Efecto Inhibitorio del Extracto de *Curcuma longa* Sobre el Crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

Los resultados obtenidos demostraron que tanto *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103) como *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104) fueron sensibles al extracto etanólico de *Curcuma longa* (Cúrcuma), evidenciándose por la generación de halos de inhibición, cuyos diámetros promedio aumentaban de manera proporcional a la concentración del extracto.

De igual manera, se pudo determinar que *Staphylococcus aureus* demostró tener una mayor sensibilidad, teniendo en cuenta que el diámetro promedio de los halos de inhibición frente a la concentración del extracto etanólico de 900 mg/ml fue de 8 mm en la cepa SA102, llegando a un diámetro de 10 mm en la tercera repetición. Por otro lado, el rango promedio de los halos de inhibición fluctúa entre 7.2 mm a 5.4 mm, y en relación al efecto inhibitorio global, la cepa SA101 tuvo un promedio de 5.8 mm en el diámetro de sus halos de inhibición, la cepa SA102 tuvo un promedio de 6.1 mm, y la cepa SA103 6.3 mm (Tabla 3; Figura 4; Anexo 8).

**Tabla 3.** Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Curcuma longa* sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103).

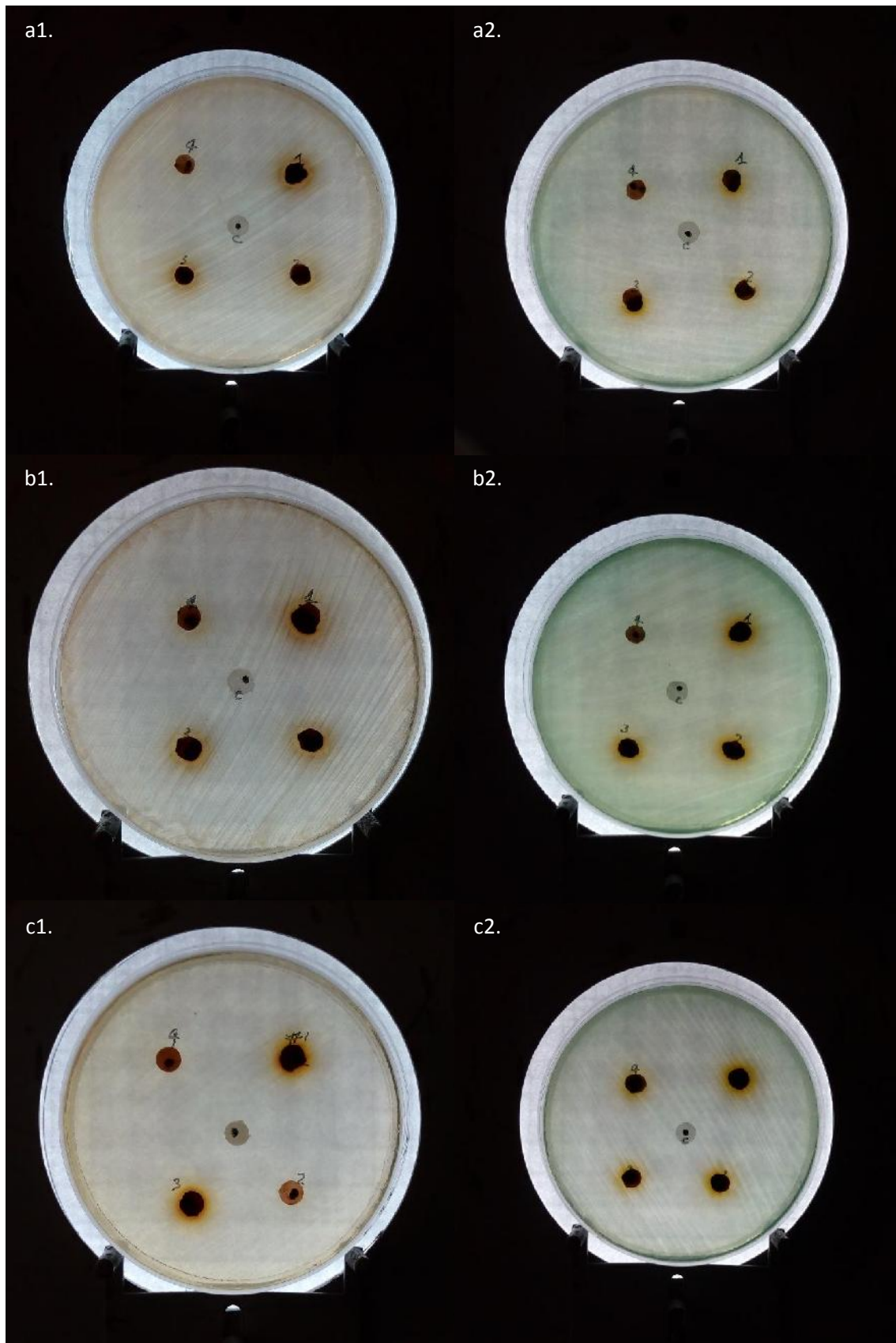
Concentración del Extracto Etanólico (mg/ml)	Promedio de los Halos de Inhibición (mm)			
	<i>Staphylococcus aureus</i>			
	SA101	SA102	SA103	PROM
900	7	8	6.6667	7.2222
800	5.6667	5.6667	6.6667	6
700	5.6667	5.3333	6	5.6666
600	5	5.3333	6	5.4444
PROMEDIO	5.8333	6.0833	6.3333	

Se determinó que *Pseudomonas aeruginosa* demostró tener una menor, teniendo en cuenta que el diámetro mayor de los halos de inhibición frente a la concentración del extracto etanólico de 900 mg/ml fue de 8 mm en la cepa AR104, llegando a un diámetro de 10 mm en la segunda y tercera repetición, mientras que en promedio se obtuvieron 6 mm de diámetro a 900 mg/ml. En el efecto inhibitorio global, la cepa AR104 generó el promedio mayor en diámetro de los halos de inhibición con 7.16 mm (Tabla 4; Figura 4). Por otro lado, las cepas AR102 y AR103 no mostraron inhibición de su crecimiento por efecto del extracto etanólico de *Curcuma longa*.

**Tabla 4.** Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Curcuma longa* sobre las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104).

Concentración del Extracto Etanólico (mg/ml)	Promedio de los Halos de Inhibición (mm)			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
	AR102	AR103	AR104	PROM
<b>900</b>	5	5	8	6
<b>800</b>	5	5	8	6
<b>700</b>	5	5	6.3333	5.4444
<b>600</b>	5	5	6.3333	5.4444
<b>PROMEDIO</b>	5	5	7.1666	





**Figura 4.** Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Curcuma longa* sobre *Staphylococcus aureus* (**a1**) primera repetición (**b1**) segunda repetición y (**c1**) tercera repetición; y sobre *Pseudomonas aeruginosa* (**a2**) primera repetición (**b2**) segunda repetición (**c3**) tercera repetición.



#### 4.1.3. Efecto Inhibitorio del Extracto Etanólico de *Plantago major* Sobre el Crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

Los resultados obtenidos demostraron que tanto *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103) como *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104) fueron ligeramente sensibles al extracto etanólico de *Plantago major* (Llantén), evidenciándose por la presencia de finos halos de inhibición.

*Staphylococcus aureus* presentó ligeras variaciones en los promedios de sus halos de inhibición a diferentes concentraciones, las cuales aumentaban en proporción a la concentración del extracto, siendo el 5.77 mm el promedio mayor, y 5.44 mm el promedio menor, generados en las concentraciones de 900 mg/ml y 800 mg/ml, y a 600 mg/ml respectivamente. En relación al efecto inhibitorio global, la cepa SA103 generó el promedio mayor, con 6.08 mm de diámetro (Tabla 5; Figura 5; Anexo 9).

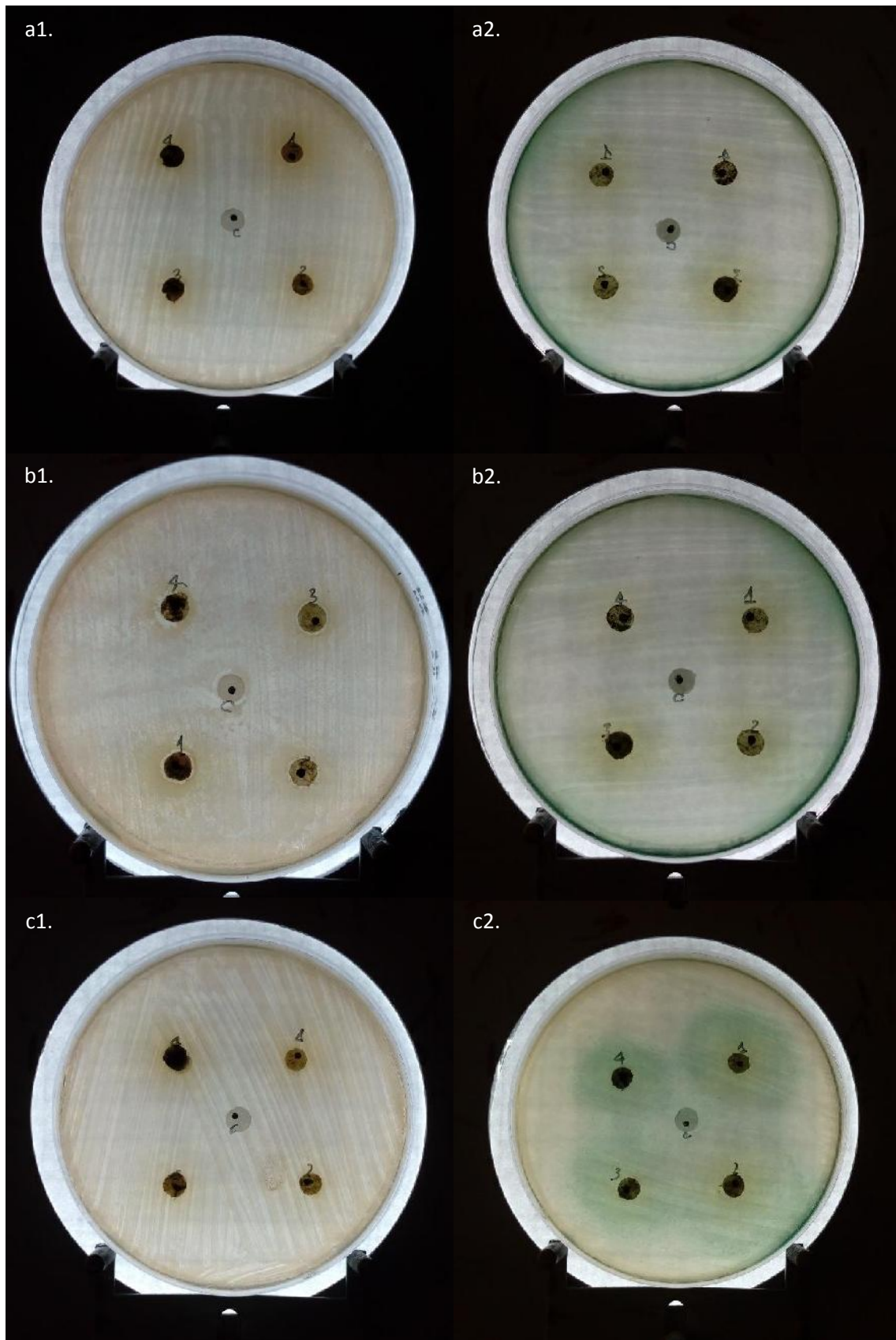
**Tabla 5.** Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Plantago major* sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103).

Concentración del Extracto Etanólico (mg/ml)	Promedio de los Halos de Inhibición (mm)			
	<i>Staphylococcus aureus</i>			
	SA101	SA102	SA103	PROM
900	5.6667	6	5.6667	5.7777
800	5.6667	5.3333	6.3333	5.7777
700	5.3333	5.3333	6.3333	5.6666
600	5.3333	5	6	5.4444
PROMEDIO	5.5	5.4165	6.0833	

En *Pseudomonas aeruginosa* se evidenció que los diámetros promedio se mantuvieron constantes en todas las concentraciones del extracto, con una medida de 5.33 mm. Paralelamente, *Pseudomonas aeruginosa* demostró tener una sensibilidad similar a la de *Staphylococcus aureus*, siendo menor en las cepas AR102 y AR103, las cuales no mostraron inhibición del crecimiento en las concentraciones de 800, 700 y 600 mg/ml. En relación al efecto inhibitorio global, la cepa AR104 generó el promedio mayor en diámetro de los halos de inhibición con 5.8 mm (Tabla 6; Figura 5).

**Tabla 6.** Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Plantago major* sobre las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104).

Concentración del Extracto Etanólico (mg/ml)	Promedio de los Halos de Inhibición (mm)			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
	AR102	AR103	AR104	PROM
<b>900</b>	5.3333	5.3333	5.3333	5.33
<b>800</b>	5	5	6	5.33
<b>700</b>	5	5	6	5.33
<b>600</b>	5	5	6	5.33
<b>PROMEDIO</b>	5.0833	5.0833	5.8333	



**Figura 5.** Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Plantago major* sobre *Staphylococcus aureus* (**a1**) primera repetición (**b1**) segunda repetición y (**c1**) tercera repetición; y sobre *Pseudomonas aeruginosa* (**a2**) primera repetición (**b2**) segunda repetición (**c3**) tercera repetición.

#### 4.1.4. Efecto Inhibitorio del Extracto Etanólico de *Verbena officinalis* Sobre el Crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

Los resultados obtenidos demostraron que tanto *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103) como *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104) fueron sensibles al extracto etanólico de *Verbena officinalis* (Verbena), evidenciándose por la presencia de los halos de inhibición.

*Staphylococcus aureus* presentó en el promedio de los halos de inhibición un rango que fluctuaba desde 7.22 mm a 5.66 mm a una concentraciones de 900 mg/ml y de 600 mg/ml, respectivamente (Tabla 7; Figura 6; Anexo 10). La cepa SA102 no fue inhibida por las concentraciones de 700 y 600 mg/ml de los extractos etanólicos. Por otra parte, en el promedio global de los halos de inhibición se obtuvo el diámetro mayor en la cepa SA101, con 6.5 mm; mientras que el diámetro menor lo obtuvo la cepa SA102 con 5.75 mm.

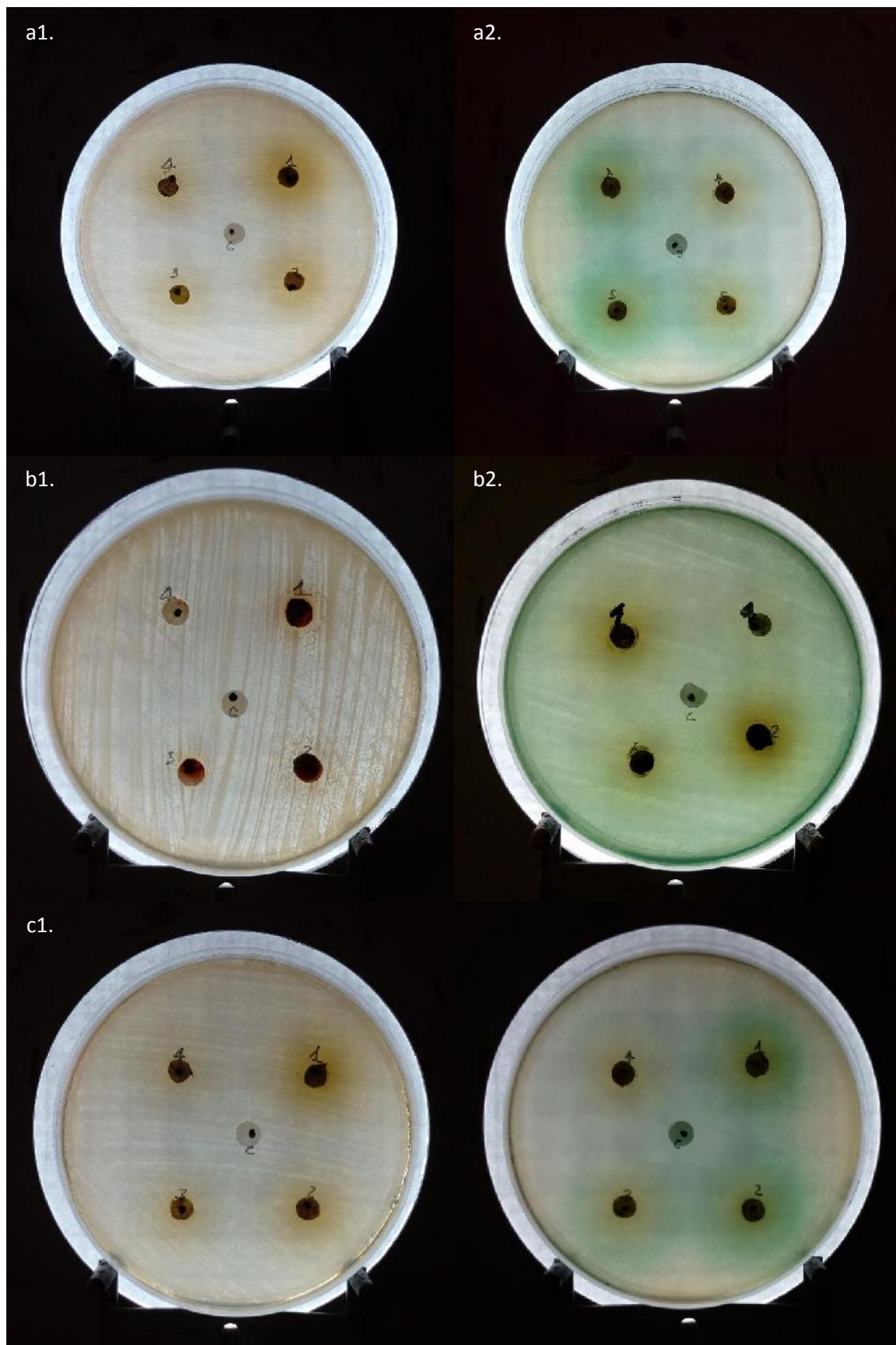
**Tabla 7.** Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Verbena officinalis* sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103).

Concentración del Extracto Etanólico (mg/ml)	Promedio de los Halos de Inhibición (mm)			
	<i>Staphylococcus aureus</i>			
	SA101	SA102	SA103	PROM
900	6.6667	7.3333	7.6667	7.22
800	6.6667	5.6667	6	6.11
700	6.6667	5	6	5.88
600	6	5	6	5.66
PROMEDIO	6.5000	5.7555	6.4166	

Paralelamente, se determinó que *Pseudomonas aeruginosa* demostró tener una sensibilidad ligeramente menor, teniendo en cuenta que el diámetro promedio mayor de los halos de inhibición fue frente a la concentración del extracto etanólico a 900 mg/ml fue de 6.44 mm, mientras que el promedio de diámetro menor fue de 5.44 a una concentración de 700 mg/ml y 600 mg/ml. De forma individual, no se observó inhibición del crecimiento en la cepa AR102 a ninguna concentración, y la cepa AR103 no fue inhibida en la concentración de 600 mg/ml. En relación al efecto inhibitorio global, la cepa AR103 generó el promedio mayor en diámetro de los halos de inhibición con 6.4 mm (Tabla 8; Figura 6).

**Tabla 8.** Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Verbena officinalis* sobre las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104).

Concentración del Extracto Etanólico (mg/ml)	Promedio de los Halos de Inhibición (mm)			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
	AR102	AR103	AR104	PROM
<b>900</b>	5	8	6.3333	6.44
<b>800</b>	5	7.3333	6	6.11
<b>700</b>	5	5.3333	6	5.44
<b>600</b>	5	5	6.3333	5.44
<b>PROMEDIO</b>	5	6.4166	6.1666	



**Figura 6.** Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Verbena officinalis* sobre *Staphylococcus aureus* (a1) primera repetición (b1) segunda repetición y (c1) tercera repetición; y sobre *Pseudomonas aeruginosa* (a2) primera repetición (b2) segunda repetición (c3) tercera repetición.

#### 4.1.5 Análisis de Varianza de los Promedios de los Halos de Inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* por Efecto del Extracto Etanólico de *Caesalpinia spinosa*.

Se determinó que la variable Concentración (CC) influyó significativamente sobre el efecto producido por el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, tal y como se demuestra en el Análisis de Varianza (Tabla 9), donde se observa que el efecto generado por las concentraciones del extracto etanólico es diferente, mientras que el efecto generado por la variable cepa y su interacción con la variable concentración no presenta diferencias significativas.

##### Hipótesis

**H<sub>01</sub>:** No existen diferencias significativas entre la actividad de las concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa*.

**H<sub>02</sub>:** No existen diferencias significativas en la actividad del extracto etanólico entre las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

**H<sub>03</sub>:** No existen diferencias significativas entre la actividad de las concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

**Tabla 9.** Análisis de Varianza (ANOVA) de los promedios de los halos de inhibición (mm) generados en los cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* por efecto de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa*.

Fuente de Variación	SS	DF	MS	F	P	Decisión
CC (mg/ml)	109.375	3	36.458	3.9121	0.014060	Rechazar H <sub>01</sub>
Cepa	107.736	5	21.547	2.3121	0.058287	Aceptar H <sub>02</sub>
CC x Cepa	28.208	15	1.881	0.2018	0.999250	Aceptar H <sub>03</sub>
Error	447.333	48	9.319			

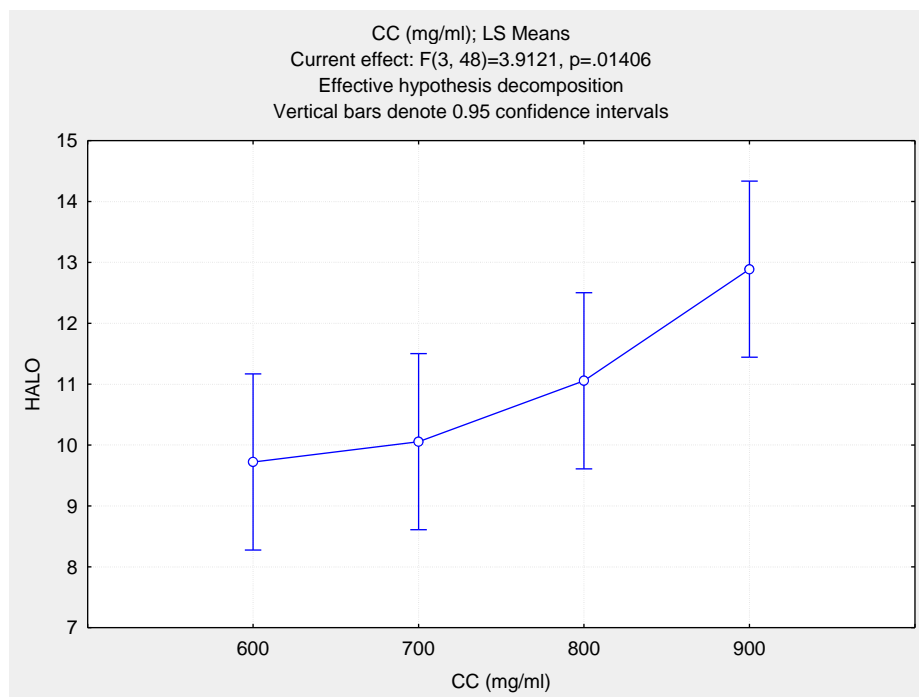
**SS:** Sum of squares (Suma de cuadrados) **DF:** Degree of freedom (grado de libertad)  
**MS:** Middle square (cuadrado medio) **F:** Test **P:** Probability (Probabilidad)



Según la Prueba de Tukey, aplicada sobre el factor Concentración (Tabla 10; Figura 7), se observó que existe un efecto inhibitorio similar al aplicar las concentraciones de 600 mg/ml y 700 mg/ml, siendo diferentes a las concentraciones de 800 mg/ml y 900 mg/ml, cuyo efecto inhibitorio fue mayor, siendo estas dos últimas diferentes entre sí.

**Tabla 10.** Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* por el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* en relación a sus concentraciones.

CONCENTRACIÓN	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA ( $\alpha=0,05$ )
600	9.7222	A
700	10.056	A
800	11.056	B
900	12.889	C



**Figura 7.** Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* sometidos al extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* en relación a sus concentraciones.



#### 4.1.6 Análisis de Varianza de los Promedios de los Halos de Inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* por Efecto del Extracto Etanólico de *Curcuma longa*.

Se determinó que las variables Concentración (CC) y Cepa influyeron significativamente sobre el efecto producido por el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, tal y como se demuestra en el Análisis de Varianza (Tabla 11), donde se observa que el efecto generado por las concentraciones del extracto etanólico es diferente, así como el efecto generado en la variable cepa, mientras que en la interacción entre ambas variables se genera un efecto similar, sin diferencias significativas.

#### Hipótesis

**H<sub>01</sub>:** No existen diferencias significativas entre las concentraciones del extracto etanólico de *Curcuma longa*.

**H<sub>02</sub>:** No existen diferencias significativas entre las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

**H<sub>03</sub>:** No existen diferencias significativas entre las concentraciones del extracto etanólico de *Curcuma longa* y las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

**Tabla 11.** Análisis de Varianza (ANOVA) de los promedios de los halos de inhibición (mm) generados en los cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* por efecto de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Curcuma longa*.

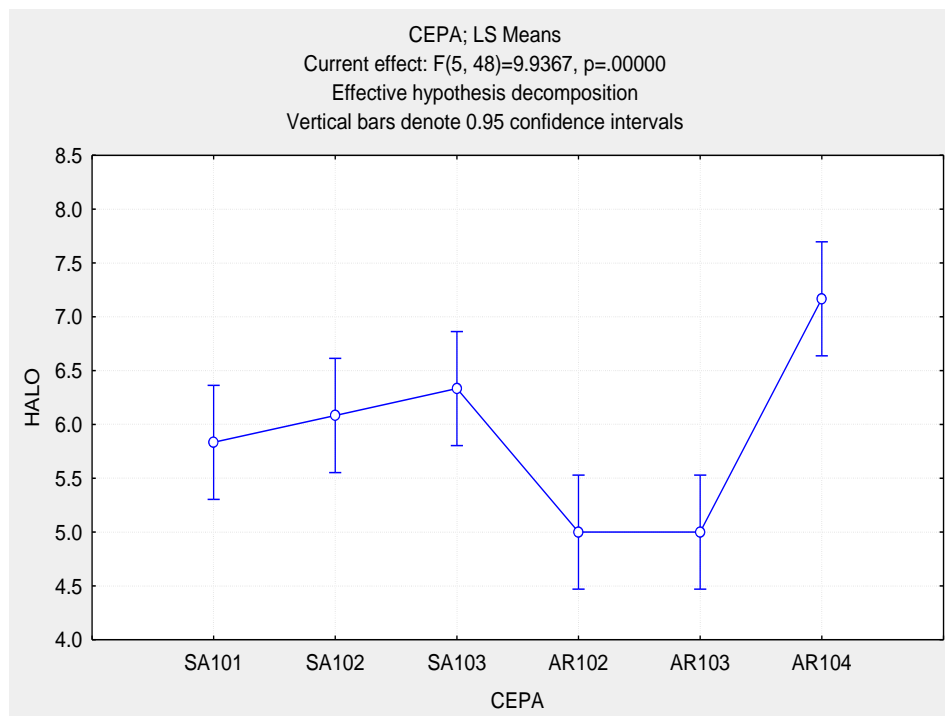
Fuente de Variación	SS	DF	MS	F	P	Decisión
CC (mg/ml)	15.153	3	5.051	6.061	0.001386	Rechazar H <sub>01</sub>
Cepa	41.403	5	8.281	9.937	0.000001	Rechazar H <sub>02</sub>
CC x Cepa	15.765	15	1.051	1.261	0.263119	Aceptar H <sub>03</sub>
Error	40.000	48	0.833			

**SS:** Sum of squares (Suma de cuadrados) **DF:** Degree of freedom (grado de libertad)  
**MS:** Middle square (cuadrado medio) **F:** Test **P:** Probability (Probabilidad)

Al aplicar la Prueba de Tukey sobre el factor Cepa (Tabla 12; Figura 8), notamos que las cepas más sensibles al efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Curcuma longa* fue la cepa AR104 de *Pseudomonas aeruginosa* y las cepas SA102 y SA103 de *Staphylococcus aureus*, mientras que la cepa SA101 de *Staphylococcus aureus* presentaron una débil sensibilidad, y las cepas AR102 y AR103 de *Pseudomonas aeruginosa* fueron resistentes.

**Tabla 12.** Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los halos de inhibición según las cepas de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103) y *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104) por efecto del extracto etanólico de *Curcuma longa*.

CEPA	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA ( $\alpha=0,05$ )
AR102	5.0000	A
AR103	5.0000	A
SA101	5.8333	A
SA102	6.0833	B
SA103	6.3333	B
AR104	7.1667	C

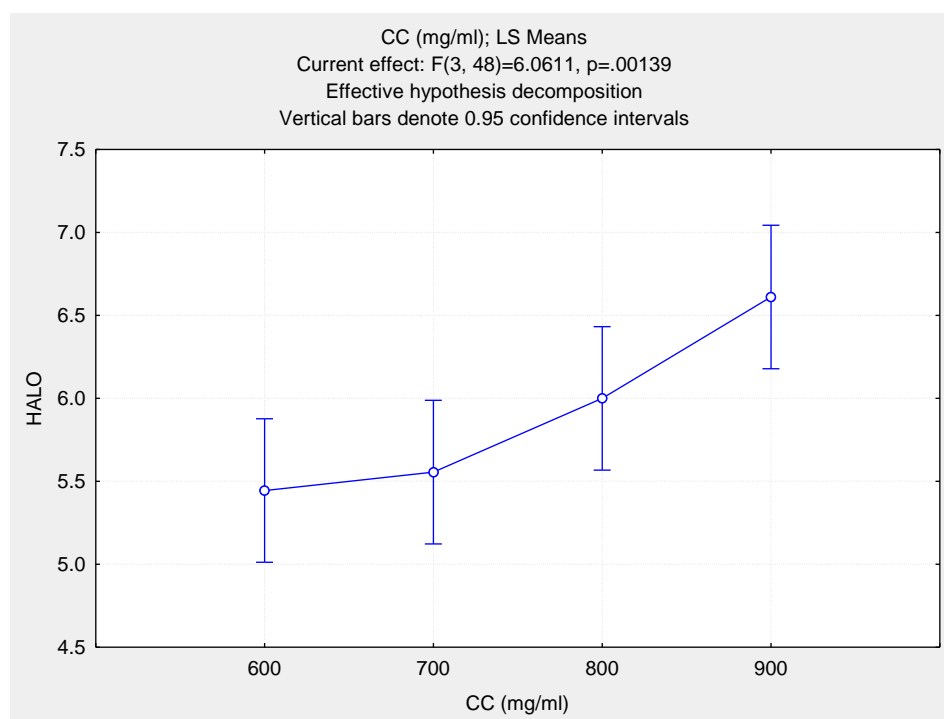


**Figura 8.** Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los halos de inhibición según las cepas de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103) y *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104) por efecto del extracto etanólico de *Curcuma longa*.

Según la Prueba de Tukey, aplicada sobre el factor Concentración (Tabla 13; Figura 9), se observó que existe un efecto inhibitorio similar al aplicar las concentraciones de 600 mg/ml y 700 mg/ml, siendo diferentes a las concentraciones de 800 mg/ml y 900 mg/ml, cuyo efecto inhibitorio fue mayor, siendo estas dos últimas similares entre sí.

**Tabla 13.** Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* por el extracto etanólico de *Curcuma longa* en relación a sus concentraciones.

CONCENTRACIÓN	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA ( $\alpha=0,05$ )
600	5.4444	A
700	5.5556	A
800	6.0000	B
900	6.6111	B



**Figura 9.** Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* por el extracto etanólico de *Curcuma longa* en relación a sus concentraciones.

#### 4.1.7 Análisis de Varianza de los Promedios de los Halos de Inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* por Efecto del Extracto Etanólico de *Plantago major*

Se determinó que la variable Cepa influyó significativamente sobre el efecto producido por el extracto etanólico de *Plantago major* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, tal y como se demuestra en el Análisis de Varianza (Tabla 14), donde se observa que el efecto inhibitorio generado por las concentraciones del extracto etanólico es similar, mientras que el efecto generado en la variable cepa es diferente; también se puede observar que en la interacción entre ambas variables no existen diferencias significativas.

##### Hipótesis

**H<sub>01</sub>:** No existen diferencias significativas entre las concentraciones del extracto etanólico de *Plantago major*.

**H<sub>02</sub>:** No existen diferencias significativas entre las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

**H<sub>03</sub>:** No existen diferencias significativas entre las concentraciones del extracto etanólico de *Plantago major* y las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

**Tabla 14.** Análisis de Varianza (ANOVA) de los promedios de los halos de inhibición (mm) generados en los cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* por efecto de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Plantago major*.

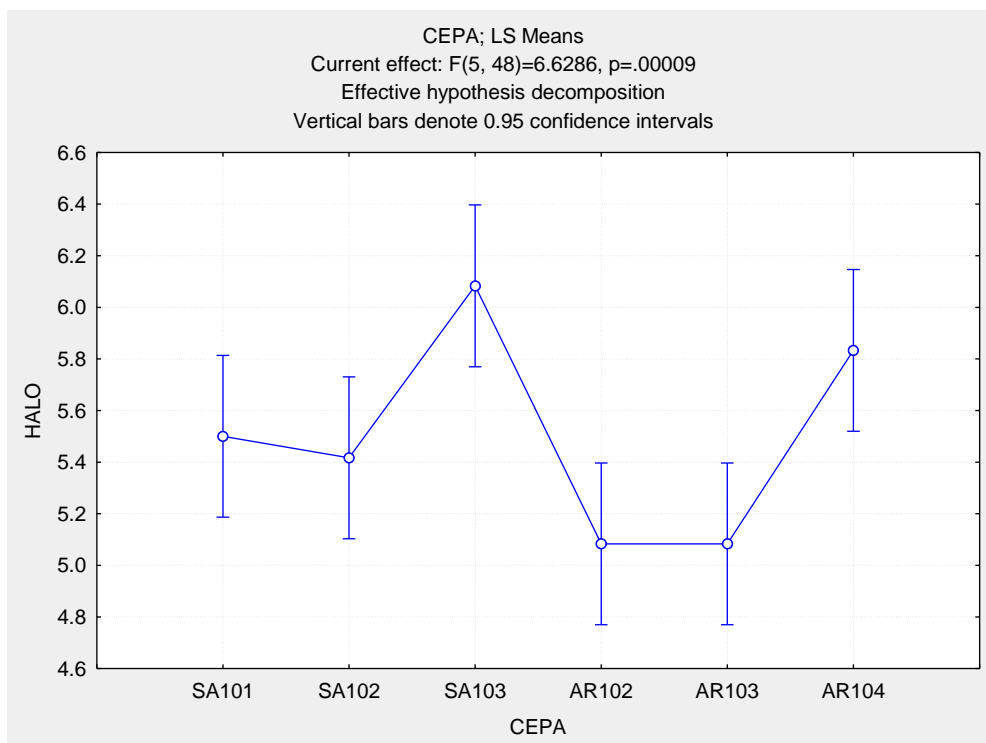
Fuente de Variación	SS	DF	MS	F	P	Decisión
CC (mg/ml)	0.333	3	0.111	0.381	0.767162	Aceptar H <sub>01</sub>
Cepa	9.667	5	1.933	6.629	0.000091	Rechazar H <sub>02</sub>
CC x Cepa	4.000	15	0.267	0.914	0.554536	Aceptar H <sub>03</sub>
Error	14.000	48	0.292			

**SS:** Sum of squares (Suma de cuadrados) **DF:** Degree of freedom (grado de libertad)  
**MS:** Middle square (cuadrado medio) **F:** Test **P:** Probability (Probabilidad)

Al aplicar la Prueba de Tukey sobre el factor Cepa (Tabla 15; Figura 10), notamos que las cepas más sensibles al efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Plantago major* fue la cepa SA103 de *Staphylococcus aureus* y las cepas SA101 y AR104 de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente; mientras que la cepa SA102 de *Staphylococcus aureus* y las cepas AR102 y AR103 de *Pseudomonas aeruginosa* mostraron una sensibilidad casi nula.

**Tabla 15.** Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los halos de inhibición según las cepas de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103) y *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104) por efecto del extracto etanólico de *Plantago major*.

CEPA	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA ( $\alpha=0,05$ )
AR102	5.0833	A
AR103	5.0833	A
SA102	5.4167	B
SA101	5.5000	B
AR104	5.8333	B
SA103	6.0833	B



**Figura 10.** Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los halos de inhibición según las cepas de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103) y *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104) por efecto del extracto etanólico de *Plantago major*.

#### 4.1.8 Análisis de Varianza de los Promedios de los Halos de Inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* por Efecto del Extracto Etanólico de *Verbena officinalis*

Se determinó que las variables Concentración (CC) y Cepa influyeron significativamente sobre el efecto producido por el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, tal y como se demuestra en el Análisis de Varianza (Tabla 18), donde se observa que el efecto generado por las concentraciones del extracto etanólico es diferente, así como el efecto generado en la variable cepa; lo contrario sucede en la interacción entre ambas variables, en donde se genera un efecto similar, sin diferencias significativas.

#### Hipótesis

**H<sub>01</sub>:** No existen diferencias significativas entre las concentraciones del extracto etanólico de *Plantago major*.

**H<sub>02</sub>:** No existen diferencias significativas entre las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

**H<sub>03</sub>:** No existen diferencias significativas entre las concentraciones del extracto etanólico de *Verbena officinalis* y las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

**Tabla 16.** Análisis de Varianza (ANOVA) de los promedios de los halos de inhibición (mm) generados en los cultivos de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* por efecto de las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Verbena officinalis*.

Fuente de Variación	SS	DF	MS	F	P	Decisión
CC (mg/ml)	18.153	3	6.051	3.890	0.014414	Rechazar H <sub>01</sub>
Cepa	20.125	5	4.025	2.587	0.037608	Rechazar H <sub>02</sub>
CC x Cepa	19.931	15	1.329	0.854	0.615894	Aceptar H <sub>03</sub>
Error	14.000	48	0.292			

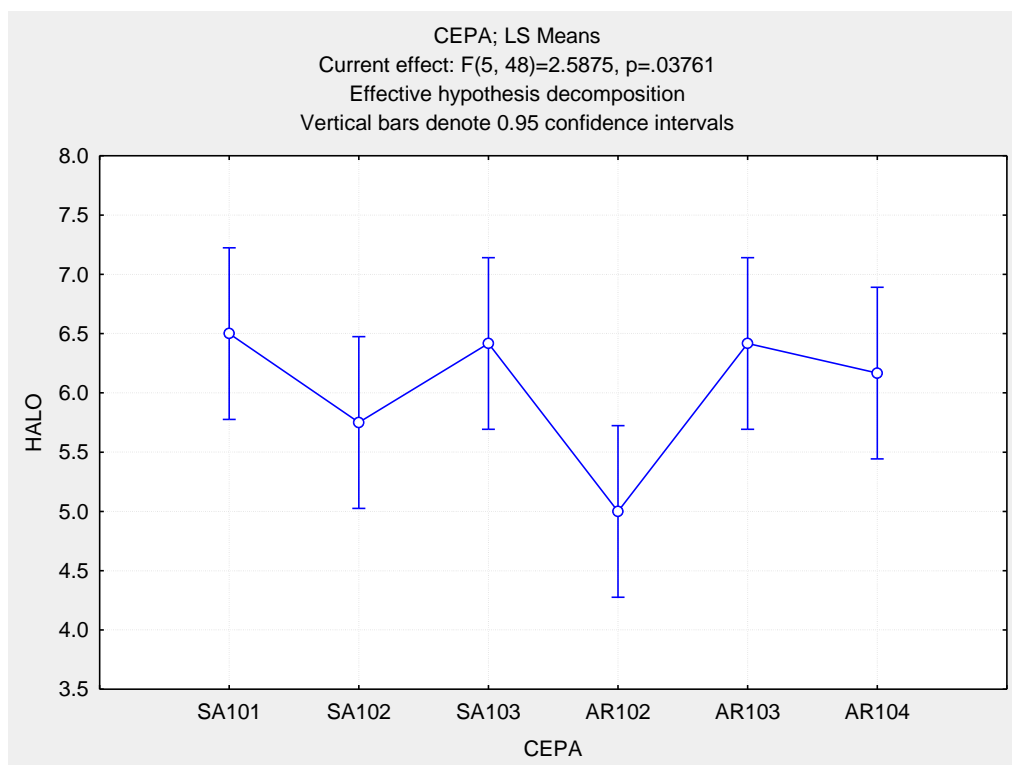
**SS:** Sum of squares (Suma de cuadrados) **DF:** Degree of freedom (grado de libertad)

**MS:** Middle square (cuadrado medio) **F:** Test **P:** Probability (Probabilidad)

Al aplicar la Prueba de Tukey sobre el factor Cepa (Tabla 17; Figura 11), notamos que las cepas más sensibles al efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Verbena officinalis* fue la cepa SA101, SA103 de *Staphylococcus aureus* y las cepas AR103 y AR104 de *Pseudomonas aeruginosa*; mientras que la cepa SA102 de *Staphylococcus aureus* mostró una sensibilidad casi nula, y la cepa AR102 de *Pseudomonas aeruginosa* fue totalmente resistente a los efectos del extracto etanólico.

**Tabla 17.** Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los halos de inhibición según las cepas de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103) y *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104) por efecto del extracto etanólico de *Verbena officinalis*.

CEPA	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA ( $\alpha=0,05$ )
AR102	5.0000	A
SA102	5.7500	B
AR104	6.1667	B
AR103	6.4167	B
SA103	6.4167	B
SA101	6.5000	B

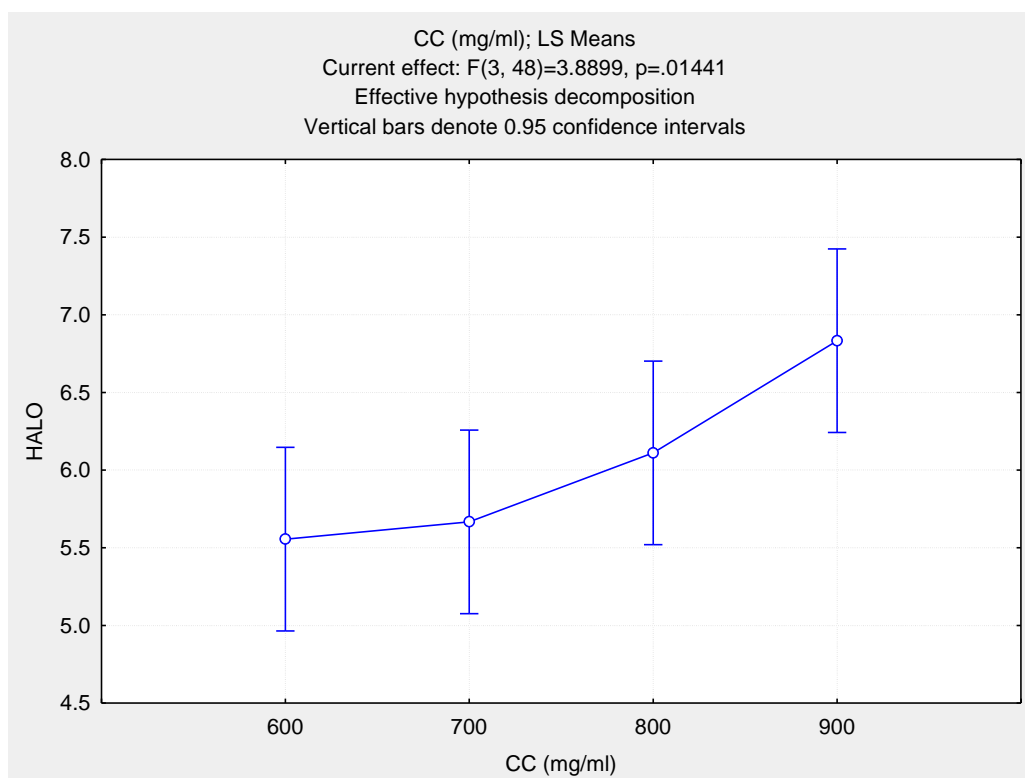


**Figura 11.** Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de los halos de inhibición según las cepas de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103) y *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104) por efecto del extracto etanólico de *Verbena officinalis*.

En la Prueba de Tukey, aplicada sobre el factor Concentración (Tabla 18; Figura 12), se determinó que existe un efecto inhibitorio similar al aplicar las concentraciones de 600 mg/ml y 700 mg/ml, las cuales son ligeramente diferentes a las concentraciones de 800 mg/ml y 900 mg/ml, cuyo efecto inhibitorio fue mayor, siendo estas dos últimas similares entre sí.

**Tabla 18.** Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* por el extracto etanólico de *Verbena officinalis* en relación a sus concentraciones.

CONCENTRACIÓN	PROMEDIO	SIGNIFICANCIA ( $\alpha=0,05$ )
<b>600</b>	5.5556	A
<b>700</b>	5.6667	A
<b>800</b>	6.1111	B
<b>900</b>	6.6833	B



**Figura 12.** Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* por el extracto etanólico de *Verbena officinalis* en relación a sus concentraciones.



## 4.2. DISCUSIÓN

La presente investigación de tipo experimental, aplicada, tuvo como propósito determinar el efecto inhibitorio *In vitro* de los extractos etanólicos de *Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major* y *Verbena officinalis* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. Para esto, fueron empleadas cuatro concentraciones diferentes de 900, 800, 700 y 600 mg/ml de cada uno de los extractos etanólicos, siendo aplicados en forma de discos de sensibilidad sobre los cultivos de tres cepas distintas de *Staphylococcus aureus* y tres cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

Los resultados obtenidos en la presente investigación, mostraron que hubo inhibición del crecimiento tanto en las cepas de *Staphylococcus aureus* como en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* sometidas a las concentraciones de los extractos etanólicos; sin embargo, los diámetros de los halos de inhibición tuvieron variaciones significativas en ambas especies, siendo más sensibles las cepas de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103), mientras que las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104) presentaron una menor sensibilidad. Estas observaciones concuerdan con lo expuesto por Martínez & Sánchez (2007), en donde recalca que la envoltura celular actúa como un mecanismo de resistencia; tanto gram positivos como gram negativos presentan pared celular bacteriana y membrana plasmática; sin embargo, al considerar que las bacterias gram negativas poseen, de forma exclusiva, una membrana externa hidrófoba, podemos asumir que la sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* a los tóxicos será menor en función a la impermeabilidad que le otorgan sus envolturas; por otro lado, *Staphylococcus aureus*, por ser una bacteria gram positiva, carece de membrana externa y presenta una permeabilidad mayor, se muestra más sensible a la acción de los extractos

etanólicos, siendo notoria esta diferencia en los resultados anteriormente expuestos. Existen otras características propias de las gram negativas que fortalecen su resistencia a los efectos tóxicos de los extractos etanólicos, entre ellas tenemos a las bombas de expulsión, las cuales se encuentran en la membrana externa de la célula, ayudando a expulsar hacia el exterior de la bacteria una gran cantidad de moléculas, entre ellas metabolitos, detergentes, solventes orgánicos y antibióticos (Tafur, Torres, & Villegas, 2008); otros mecanismos que potencian la resistencia en gram negativas son la pérdida de porinas y la alteración del sitio de acción de los metabolitos.

Los resultados mostraron que el extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* inhibió el crecimiento de las distintas cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, generando promedios en sus halos de inhibición hasta de 14.2 mm a una concentración de 900 mg/ml; además, los diámetros disminuyeron conforme disminuía la concentración del extracto. Estos datos coinciden con los resultados de Cano Araujo & Quispe Eduardo (2017), en cuya investigación se logró inhibir el crecimiento de la bacteria gram positiva *Streptococcus mutans*, generando halos de inhibición de hasta 18.09 mm al emplear aceite esencial de *Caesalpinia spinosa* al 100%, coincidiendo también con los resultados de Huarino Acho & Ramos Perfecto (2013), en donde las concentraciones de 75 a 6.25 mg/ml de extracto alcohólico de las vainas de *Caesalpinia spinosa* lograron inhibir el crecimiento de bacterias gram positivas y gram negativas de la flora salival mixta, llegando a obtener halos de inhibición de hasta 17.32 mm de diámetro para la mayor concentración.

Tanto *Staphylococcus aureus* como *Pseudomonas aeruginosa* registraron un aumento gradual del halo inhibitorio conforme se incrementaban las concentraciones del extracto, siendo esta diferencia menos notoria en las concentraciones de 700 y

600 mg/ml, cuyos halos de inhibición mostraron diámetros similares. Al ser estas dos concentraciones las menores, difunden muy pobremente en el agar, por lo tanto la precisión de susceptibilidad por el método de difusión va a ser menor que con otras concentraciones (Bernal & Guzman, 1984).

Según Dostert, y otros (2009), dicha actividad antibacteriana se da, principalmente, por la presencia de taninos y flavonoides que se encuentran distribuidos en toda la anatomía de la planta, los cuales fueron los metabolitos encontrados de forma predominante en el estudio fitoquímico que ellos realizaron del extracto de *Caesalpinia spinosa*. Los taninos tienen mayor solubilidad en agua que otros compuestos, la solubilidad en agua puede ser importante para su acción antibacteriana. Según los estudios de Funatogawa, y otros (2004), en donde investigaron los efectos de los taninos sobre cultivos de una bacteria gram negativa, este metabolito posee una actividad perjudicial para la membrana. Sin embargo, queda por aclarar si su actividad perjudicial para la membrana contribuye directamente a su acción antibacteriana. Por otro lado, los flavonoides potencian el grado de liposolubilidad del extracto, lo que le permite atravesar las membranas celulares por difusión pasiva, con ello contribuyen también las saponinas que alteran la tensión superficial de los lípidos de la membrana celular. Estos dos metabolitos son solubles en múltiples disolventes orgánicos como el agua, acetona y el etanol; y por lo visto la solubilidad en agua es uno de los factores más importantes en su acción antibacteriana.

El extracto etanólico de *Curcuma longa* inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, generando un promedio máximo en sus halos de inhibición de 7.2 mm a una concentración de 900 mg/ml en *Staphylococcus aureus*, mientras que en *Pseudomonas aeruginosa* el promedio máximo de los halos de

inhibición fue de 6 mm en la misma concentración; este extracto también generó diámetros directamente proporcionales a la concentración, tal y como sucedió en la investigación realizada por Méndez Álvarez, Angulo Ortiz, & Martínez Contreras (2016), quienes investigaron los efectos que generaba el extracto etanólico de *Curcuma longa* sobre *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, entre otras bacterias, en las cuales lograron disminuir el crecimiento bacteriano conforme aumentaban las concentraciones del extracto.

El aumento gradual de los halos de inhibición se dio tanto en las cepas de *Staphylococcus aureus* como en las de *Pseudomonas aeruginosa*, siendo esta diferencia menos notoria en las concentraciones de 700 y 600 mg/ml, cuyos halos de inhibición mostraron diámetros similares, llegando a ser iguales en ambas concentraciones en *Pseudomonas aeruginosa*, con 5.4 mm de diámetro.

La actividad antibacteriana de *Curcuma longa* se da, principalmente, por las propiedades antibacterianas del extracto etanólico de esta especie, pueden explicarse por el efecto sinérgico entre los diferentes componentes químicos del extracto y/o por la presencia de otros componentes que incluso pueden ser activos a bajas concentraciones. Los metabolitos activos de las plantas pueden exhibir su efecto antimicrobiano, por la degradación de la pared celular, disrupción de la membrana citoplasmática, salida de componentes celulares, alteraciones en la síntesis de ADN y ARN, en el transporte de electrones y en la absorción de nutrientes, afectando la producción de energía y modificando constituyentes en ácidos grasos y fosfolípidos (Shan, Cai, Brooks, & Corke, 2017). Un estudio realizado por Gupta, Mahajan, & Sharma (2015), revela que *Staphylococcus aureus* muestra deformidad morfológica, con pérdida parcial de la membrana citoplasmática, al ser tratado con extractos obtenidos de los rizomas de *Curcuma longa*. Según Méndez Álvarez, Angulo Ortiz,

& Martínez Contreras (2016), del perfil fitoquímico del extracto etanólico evaluado se destaca la presencia de saponinas, taninos, alcaloides y flavonoides, siendo estos últimos responsables de la actividad antibacteriana en varias plantas. Por otro lado García, Olaya, Sierra, & Padilla (2017) evaluaron el efecto de los curcuminoides frente a bacterias gram positivas (entre ellas *Staphylococcus aureus*) y gram negativas (*Pseudomonas aeruginosa*), entre otras especies; los curcuminoides evaluados presentaron actividad frente a *Staphylococcus aureus* y otras bacterias gram positivas, siendo muy distinto el resultado en las bacterias gram negativas, en donde no se obtuvo inhibición del crecimiento.

El siguiente extracto sometido a evaluación fue el de *Plantago major*. Los resultados demostraron que el extracto etanólico tuvo un débil efecto inhibitorio sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, obteniendo en la primera especie bacteriana 5.7 mm como mayor diámetro de inhibición en las concentraciones más altas de 900 y 800 mg/ml; por otro lado no existió una diferencia significativa entre las dos menores concentraciones de 700 y 600 mg/ml, las cuales generaron halos de inhibición de 5.6 mm y 5.4 mm, respectivamente. En *Pseudomonas aeruginosa* se obtuvo el mismo diámetro en todas las concentraciones, siendo este de 5.3 mm. Estos resultados son similares a los obtenidos en la investigación de Castillo Archila, y otros (2016), en donde enfrentaron al extracto etanólico de *Plantago major* con los cultivos de dos bacterias, una gram positiva (*Bacillus cereus*) y una gram negativa (*Escherichia coli*), obteniendo halos de inhibición poco significativos, los cuales variaban de 1 a 0.1 mm, sin contar el diámetro del disco. Resultados muy distintos se obtuvieron en la investigación realizada por Crisanto Ahuite & Reaño Rojas (2016), en donde se evaluó la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Plantago major* frente a

*Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* a concentraciones de 12 y 6 mg, resultando afectado el crecimiento de *Staphylococcus aureus* con diámetros de 20.3 mm y 20 mm, respectivamente; mientras que en *Pseudomonas aeruginosa* no se generó efecto alguno, por ende se consideró a esta última especie como resistente. El autor señala que esta diferencia significativa entre los resultados obtenidos en ambas bacterias se genera a partir de la gran complejidad que poseen las envolturas celulares de las gram negativas en comparación con las gram positivas. En ambas investigaciones citadas se coincide en que los metabolitos con capacidad antibacteriana presentes en *Plantago major* se encuentran en sus hojas, ya que el extracto etanólico obtenido de los tallos no generó efecto alguno sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* (Castillo Archila, y otros, Junio de 2016).

Por lo observado, se infiere que los componentes activos de *Plantago major* a determinadas concentraciones pueden actuar sobre el complejo ciclo celular y de crecimiento de las bacterias, sin dañar el material genético, pero que pueden actuar sobre otras estructuras celulares y funciones metabólicas del microorganismo. Se sabe además, que *Plantago major* contiene glucósidos, estos podrían tener acción similar a la ejercida por Gentamicina, aminoglucósido que actúa sobre los microorganismos inhibiendo la síntesis proteica mediante su ligación con la unidad ribosomal 30s. Se afirma también, que el llantén debe sus propiedades antisépticas a la presencia de taninos y fenoles en la composición de sus hojas, mas no en la composición de su tallo (Peláez, 2006). Debe tenerse en consideración que la actividad inhibitoria del extracto etanólico se debe tanto a los compuestos químicos de *Plantago major* como a las diferencias estructurales existentes entre *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Por último tenemos los resultados del extracto etanólico de *Verbena officinalis*, cuyo efecto se observó ligeramente disminuido en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, especie en la cual generó halos de inhibición que variaban de 6.4 mm en la mayor concentración (900 mg/ml) a 5.4 mm en las dos menores concentraciones (700 y 600 mg/ml). En *Staphylococcus aureus* el extracto etanólico tuvo un mayor efecto, generando halos cuyos diámetros promedio iban desde 7.2 mm a una concentración de 900 mg/ml, disminuyendo a 5.66 mm en la concentración menor de 600 mg/ml. Ahmed (2017), en la investigación que realizó sobre el potencial antimicrobiano de extractos etanólicos de *Verbena officinalis* sobre bacterias gram positivas y gram negativas, obtuvo como resultado una inhibición significativa del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, siendo esta inhibición más notoria en la primera especie. Entre sus observaciones resalta el hecho de que el extracto etanólico de *Verbena officinalis* generó mayor inhibición del crecimiento bacteriano que la Amoxicilina, antibiótico semisintético derivado de la Penicilina, lo que se sobreentiende que se trababa de cepas resistentes a la amoxicilina. Si bien en la presente investigación se logró inhibir el crecimiento de ambos microorganismos, los resultados no fueron tan significativos como los obtenidos por Ahmed (2017). En la investigación realizada por Sahile, Habtamu, & Chandrodyam (2015) también se obtuvieron amplios diámetros en los halos de inhibición producidos por el extracto metanólico de las hojas de *Verbena officinalis*, llegando a medir 20 mm de diámetro en *Staphylococcus aureus* y 15.3 mm de diámetro en *Pseudomonas aeruginosa*. Esta diferencia existente entre los resultados de los autores mencionados y los resultados obtenidos en el presente estudio, puede deberse a múltiples factores, que van desde la procedencia de la especie vegetal en cuestión, pasando por el proceso de obtención del extracto, hasta la procedencia de las cepas bacterianas.

Para la obtención del extracto etanólico de *Verbena officinalis*, el método utilizado consistía en un secado en estufa a una temperatura de 60 °C durante 48h, procedimiento del cual se obtuvo la masa seca para, posteriormente, ser triturada y macerada en etanol al 96° durante dos semanas; después del proceso de maceración se introdujo el extracto a una estufa calibrada en 37°C para acelerar el proceso de volatilización del etanol y así obtener el extracto seco. En el método utilizado por Ahmed (2017) *Verbena officinalis* no fue expuesta a altas temperaturas para acelerar el proceso de secado, si no que se dejó secar bajo sombra durante 15 días, evitando de esta forma la disminución de la concentración de principios activos con actividad antibacteriana. Además el proceso de maceración utilizado por Ahmed (2017) fue más extenso que el empleado en la presente investigación, teniendo una duración de 30 días, 16 días más que el tiempo empleado en este estudio; el mismo autor, posteriormente, filtró el macerado y utilizó un evaporador rotatorio a 45 ° C para obtener el extracto etanólico en bruto, este procedimiento también fue determinante para mantener una concentración alta de los constituyentes de la planta.

Entre los componentes predominantes de *Verbena officinalis* caracterizados por Rehechoa, y otros (2011) a partir de extractos acuosos e hidroalcoholicos, identificaron tres iridoides, quince flavonoides y cuatro derivados de ácido fenólico. Como se ha mencionado con anterioridad, los flavonoides potencian la solubilidad lipídica del extracto, lo que le permite atravesar las membranas celulares por difusión pasiva, y de esta forma ejercer una acción tóxica para los microorganismos, tanto gram positivos como gram negativos.



## CONCLUSIONES

El extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* inhibe el crecimiento *in vitro* de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103) y de *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104); y genera un efecto inhibitorio más intenso sobre *Staphylococcus aureus*.

El extracto etanólico de *Curcuma longa* inhibe el crecimiento *in vitro* de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103) y de *Pseudomonas aeruginosa* (AR104); siendo más intenso el efecto inhibitorio a una concentración de 900 mg/ml.

El extracto etanólico de *Plantago major* genera una escasa inhibición *in vitro* del crecimiento de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103) y de *Pseudomonas aeruginosa* (AR104); generando un efecto inhibitorio ligeramente mayor en las concentraciones de 900 mg/ml.

El extracto etanólico de *Verbena officinalis* inhibe ligeramente el crecimiento *in vitro* de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 y SA103) y de *Pseudomonas aeruginosa* (AR103 y AR104); generando un efecto inhibitorio ligeramente mayor a una concentración de 900 mg/ml.

## RECOMENDACIONES

Realizar una recolección *in situ* de los especímenes vegetales a estudiar, anotar el lugar específico en donde han sido recolectados y en qué ambiente vivían (sustrato, suelo, altitud, estación climática, temperatura, comunidad vegetal, etc.), así como otros datos que puedan ser útiles al exponer y discutir los resultados obtenidos con los resultados de otros autores.

Se sugiere identificar y aislar de forma individual a los principios activos responsables de la actividad antimicrobiana reportada en la presente investigación, con la finalidad de ampliar las alternativas existentes en la obtención de nuevos antibióticos de amplio espectro de origen natural.

Es necesario corroborar, mediante estudios *in vivo*, el grado de toxicidad que provocan los principios activos de los extractos obtenidos, con la finalidad de determinar la estabilidad de estos componentes frente a los diversos agentes físicos y químicos que se encuentran en un organismo vivo, y que además puedan interferir en la actividad antimicrobiana descrita en esta investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A. Ulibarri, (1996). Sinópsis de Caesalpinia y Hoffmanseggia (Leguminosae-Caesalpinoideae) de Sudamérica. *DARWINIANA*, 34(1-4), 299-348.
- Ahmed, (2017). Verbena officinalis a herb with promising broad spectrum antimicrobial potential. *Journal Cogent Chemistry*, Volumen 3.
- Aligiannis, Mitaku, Tsitsa Tsardis, Harvala, Tsaknis, Lalas & Haroutounian, (2003). Methanolic extract of Verbascum macrurum as a source of natural preservatives against oxidative rancidity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 7308-7312.
- Altamirano Fernández & Castro Bruno, (2017). *ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA, In Vitro DEL EXTRACTO ETANOLICO DE Morinda citrifolia L. "Noni" FRENTE A CEPAS DE Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus*. Lambayeque - Perú: Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo - Facultad de Ciencias Biológicas.
- Bahrain, Taher & Fathiy, (2017). Chemical constituents and medical benefits of Plantago major. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 348-360.
- Berit, (2000). The traditional uses, chemical constituents and biological activities of Plantago major L. *Journal Ethnopharmacol*, 1-21.
- Berit Samuelsen, (2000). The traditional uses, chemical constituents and biological. *Journal of Ethnopharmacology* (71), 1-21.
- Bernal & Guzman, (1984). El Antibiógrama de Discos. Normalización de la Técnica de Kirby - Bauer. *BIOMEDICA*, 112-121.

- Blanco, Saborío & Garro, (2008). Descripción anatómica, propiedades medicinales y uso potencial de *Plantago major* (Llantén mayor). *Tecnología en Marcha*, 17-24.
- Blumenthal, Goldberg & Brinckmann, (2000). *Herbal medicine : expanded Commission E monographs*. Texas: American Botanica.
- Brako & Zarucchi Lee, (1993). *Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru = Catálogo de las angiospermas y gimnospermas del Perú* . Missouri Botanical Garden.
- Cano Araujo & Quispe Eduardo, (2017). “*EFEECTO INHIBITORIO IN VITRO DE LA INFUSIÓN Y ACEITE ESENCIAL DE Caesalpinia spinosa (TARA) SOBRE LAS CEPAS DE Streptococos mutans PUNO - 2017*”. Puno: Repositorio Institucional UNA-PUNO.
- Castillo Archila, Trejo Días, Caballero Roque, Meza Gordillo, Domínguez Espinosa, Olivier López & Pulido Gonzáles, (Junio de 2016). Evaluación del Efecto Antibacteriano de Extractos de Ocho Plantas del Estado de Chiapas. *LACANDONIA*, 7-10.
- Chairman, Jayamala, Christy, & Singh. (2015). Phytochemical screening and antimicrobial activity of *Curcuma longa* natural dye. *General Modicine*, 171.
- Chalcha, J.-C., & Gary, R.-P. (1996). Chemical Composition of the Leaf Oil of *Verbena officinalis* L. *Journal of Essential Oil Research*, 3(4), 419-420.
- Chiriac, A., Brzezinski, P., Foia, L., & Marincu, I. (2015). Chloronychia: green nail syndrome caused by *Pseudomonas aeruginosa* in elderly persons. *Clinical Interventions in Aging*, 10, 265-267.

- Cordell, Quinn & Farnsworth (2001). The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytoterapy Research*, 183-205.
- Crisanto & Reaño (2016). *Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de las hojas de Plantago major (Llantén) frente a Pseudomonas aeruginosa y Staphylococcus aureus, por el método de difusión de disco y macrodilución*. Iquitos, Perú: Repositorio Institucional UNAP.
- De la Cruz Lapa, (2004). Aprovechamiento. *Revista del Instituto de Investigación, Universidad Nacional Mayor de San Marcos*, Vol. 7(14), 64-73.
- Dostert, Roque, Brokamp, Cano, Weigend & La Torre, (2009). *Datos Botánicos de Tara*. Berlín, Alemania: Botconsult GmbH.
- García Ariza, Olaya Montes Quim, Sierra Acevedo & Padilla Sanabria, (2017). Actividad Biológica de Tres Curcuminoides de Curcuma longa L. (Cúrcuma) Cultivada en el Quindío - Colombia. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 1.
- Huarino Acho & Ramos Perfecto, (2013). Efecto antibacteriano de Caesalpinia spinosa (Tara) sobre flora salival mixta. *Odontología Sanmarquina*, 16(1): 32-35.
- INBio. (10/11/2005). *Jerarquía Taxonómica*. Obtenido de <<http://>
- Isaza M., (2007). TANINOS O POLIFENOLES VEGETALES. *Scientia et Technica Año XIII*, 13-18.
- Lapenna, Medina, Días, Aguillón & Marín, (2003). Actividad bactericida y fungicida de algunas plantas utilizadas en la medicina tradicional venezolana. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 34 (2): 1-16.
- Mejía & Rengifo, (2000). *Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana*. Lima: Tarea Asociación Gráfica Educativa.

- Mensa, Barberán, Soriano, Linares, Marco, Cantón & Bou. (2018). *Antibiotic selection in the treatment of acute invasive infections by Pseudomonas aeruginosa: Guidelines by the Spanish Society of Chemotherapy*. Sociedad Española de Quimioterapia.
- Mesa, Ramirez Tortosa, Aguilera, Ramirez Boscá & Gil, (2000). Efectos Farmacológicos y Nutricionales de los Extractos de Curcuma Longa L. y de los Curcuminoides. *Ars Pharmaceutica*, 307-321.
- Molnár, Koltai, Petri, Shoyama, Matsumoto & Nishioka, (1989). Antimicrobial and immunomodulating effects of some phenolic glycosides. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 425-432.
- Nair & Prabhakaran. (2013). The Agronomy and Economy of Turmeric and Ginger: The Invaluable Medicinal Spice Crops. . *Newnes*, 7-10.
- Naturalista. (23 de Abril del 2019). *Naturalista*. Obtenido de Naturalista Web Site: <https://www.naturalista.mx/taxa/56163-Verbena-officinalis>
- Nazeema & Rema, (1994). Blossom biological and hybridization studies in turmeric (C. Longa L.). *South Ind. Hort*, 42(3), 161–7.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2003). *Medicina Tradicional*. Organización Mundial de la Salud.
- Pamo Reyna, (2009). Características de los trabajos publicados sobre las propiedades de las plantas en revistas médicas peruanas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 23(3), 314-23.

- Peláez, P. (2006). ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE UNA CREMA DE *Plantago lanceolata* SOBRE BACTERIAS GRAM (+) Y GRAM (-) . *Revista Farmaciencia Internacional*.
- Primack, R. (1978). Evolutionary aspects of wind-pollination in the genus *Plantago* (Plantaginaceae). *New Phytologists*, 81, 449–458.
- Rainer & Douglas, (2015). *Plantas Medicinales de los Andes y la Amazonía - La Flora Mágica y Medicinal del Norte del Perú*. Trujillo, Perú: GRAFICARD SRL.
- Real Academia Española. (22 de Abril de 2019). RAE. Obtenido de RAE.es: <https://dle.rae.es/?id=H00IXUp>
- Rehechoa, Hidalgo, García Iñiguez de Ciranob, Astiasaránb, Ansorenab, Caverod & Calvoa, (2011). Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of *Verbena officinalis* L. *LWT - Food Science and Technology*, 44, 875-882.
- Rethinam, Sivaraman & Sushama, (1994). Avances en horticultura. Cultivos de plantaciones y especias. *Editorial Malhotra, Nueva Delhi, India.*, 9(1), 477-490.
- Revathy, Elumalai, Merina & Benny, (2011). Isolation, Purification and Identification of Curcuminoids From Turmeric (*Curcuma Longa* L.) by Column Chromatography. *Journal of Experimental Sciences* , 21-25.
- Roque Gamarra, Echeverría Cano & Brockamp, (Septiembre de 2009). *Factsheet : Datos Botánicos de Tara. Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze*. Obtenido de ResearchGate: <https://www.researchgate.net/publication/43178818>
- Sagar & Harper, (1964). *Plantago major* L., *P. media* L. and *P. lanceolata* L. *The Journal of Ecology*, 52, 189–221.

- Sahile, Habtamu & Chandrodyam, (2015). Antibacterial Activity of *Verbena officinalis* (Linn) Crude Extract Against Some Human Pathogens. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 3 (6): 34-41.
- Samuelsen, (2000). The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. . *Journal of Ethnopharmacology*, 1-21.
- Santivañez Acosta & Cabrera Meléndez, (2013). *Catálogo Florístico de Plantas Medicinales Peruanas*. Lima: Ministerio Nacional de Salud.
- Sepideh & Sadegh, (2016). Study of pharmacological effect of *Verbena officinalis* Linn: A review. *Der Pharmacia Lettre*, 8(9), 321-32.
- Shan, Cai, Brooks & Corke, (2017). The in vitro antibacterial activity of dietary spice and medical herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*, 117(1), 112-119.
- Tafur, Torres & Villegas, (2008). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Centro Internacional de Investigaciones Médicas*, 12(3), 217-226.
- Tobyn, Denham & Whitelegg, M. (2011). CHAPTER 31 - *Verbena officinalis*, vervain. *Medical Herbs*, 327-336.
- Voigt, R. (1982). *Tratado de Tecnología Farmacéutica* . España: Acriba .
- W. Bussmann & Sharon, (Noviembre, 2015). *Plantas Medicinales de los Andes y la Amazonia "La Flora Mágica y Medicinal del Norte del Perú"*. Trujillo, Perú.: GRAFICART SRL.
- Wang, Zhi, Zhang, Wang, Suo & Xie, (2017). Transcriptome analysis of salicylic acid treatment in *Rehmannia glutinosa* hairy roots using RNA-seq technique for



identification of genes involved in acteoside biosynthesis. . *Frontiers in Plant Sci*, 787.

Wertheim, Melles, Vos, Leeuwen, Belkum, Verbrugh & Nouwen. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *The Lancet Infectious Diseases*, 751-762.

Witkin (2013). Curcumin, an active constituent of the ancient medicinal herb *Curcuma longa* L.: some uses and the establishment and biological basis of medical efficacy. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 487-497.

Zendejas Manzo, Avalos Flores & Soto Padilla. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*, 129-143.

Zurita Macalupú, S. (2013). *Manual de Procedimientos de Laboratorio - Laboratorios Locales I y Laboratorios Locales II*. Lima: Instituto Nacional de Salud.

## ANEXOS

### Anexo 1.

Constancia de validación de los especímenes botánicos *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, *Plantago major* L. y *Verbena officinalis* L.

	<p><b>HERBARIO</b> <b>PEDRO RUIZ GALLO</b> UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS</p>	
<p><b>CONSTANCIA</b></p>		
<p>La directora del Herbario "PRG" de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, que suscribe;</p>		
<p><b><u>Hace constar:</u></b></p>		
<p>Que, la Bachiller: <b>Carla Alejandra Ravines Arriaga</b>, de la Universidad Nacional Pedro Ruiz – Facultad de Ciencias Biológicas, Área de Microbiología, ha hecho llegar al herbario PRG tres(03) especies botánicas, debidamente herborizadas y que han sido identificadas como <i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze, <i>Plantago major</i> L. y <i>Verbena officinalis</i> L. y registradas en el libro con los números 18725, 18726 y 18727 respectivamente.</p>		
<p>Se expide la presente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.</p>		
<p>Lambayeque, 07 de Junio del 2019</p>		
	<p> <b>Msc. Josefa Escurra Puicón</b> Directora del Herbario PRG</p>	

**Anexo 2.**

**(a)** Hojas y tallos de *Caesalpinia spinosa* **(b)** Rizoma de *Curcuma longa* **(c)** Hojas y espigas de *Plantago major* **(d)** Tallos, hojas e inflorescencias de *Verbena officinalis*.



### Anexo 3.

Constancia de validación de las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.



**UNPRG** | UNIVERSIDAD NACIONAL  
PEDRO RUIZ GALLO

#### CONSTANCIA

El Jefe de Laboratorio de Microbiología Humana de la Especialidad de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Ciencias Biológicas, deja constancia de que las cepas bacterianas otorgadas a la Bach. Carla Alejandra Ravines Arriaga para la realización de su proyecto de tesis, pertenecen a las especies *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

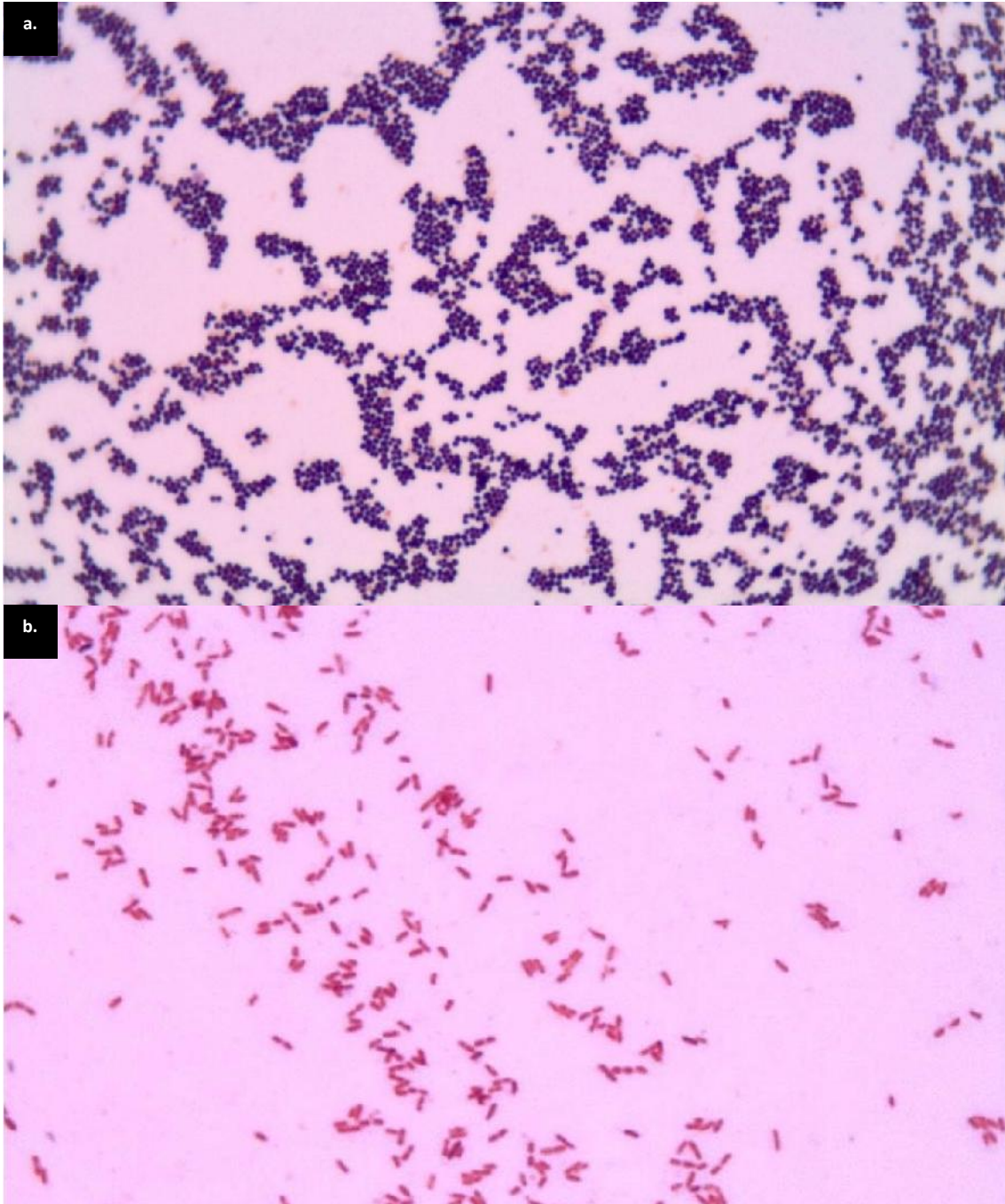
Lambayeque, 13 de Mayo del 2019

Lic. Cecilio Mario Moreno Mantilla  
Jefe del Laboratorio de Microbiología Humana



#### Anexo 4.

(a) Microscopía óptica a 1000 aumentos de la tinción gram de *Staphylococcus aureus*, cepa SA101. Se observan cocos gram positivos dispuestos en racimo. (b) Microscopía óptica a 1000 aumentos de la tinción gram de *Pseudomonas aeruginosa*, cepa AR102. Se observan bacilos gram negativos, rectos y ligeramente curvados, aislados, en parejas y en cadenas.



### Anexo 5.

(a) Soluciones madre de *Caesalpinia spinosa*, *Curcuma longa*, *Plantago major* y *Verbena officinalis* (b) Diluciones de 900 a 600 mg/ml de *Caesalpinia spinosa* (c) Diluciones de 900 a 600 mg/ml de *Curcuma longa* (d) Diluciones de 900 a 600 mg/ml de *Plantago major* (e) Diluciones de 900 a 600 mg/ml de *Verbena officinalis*.

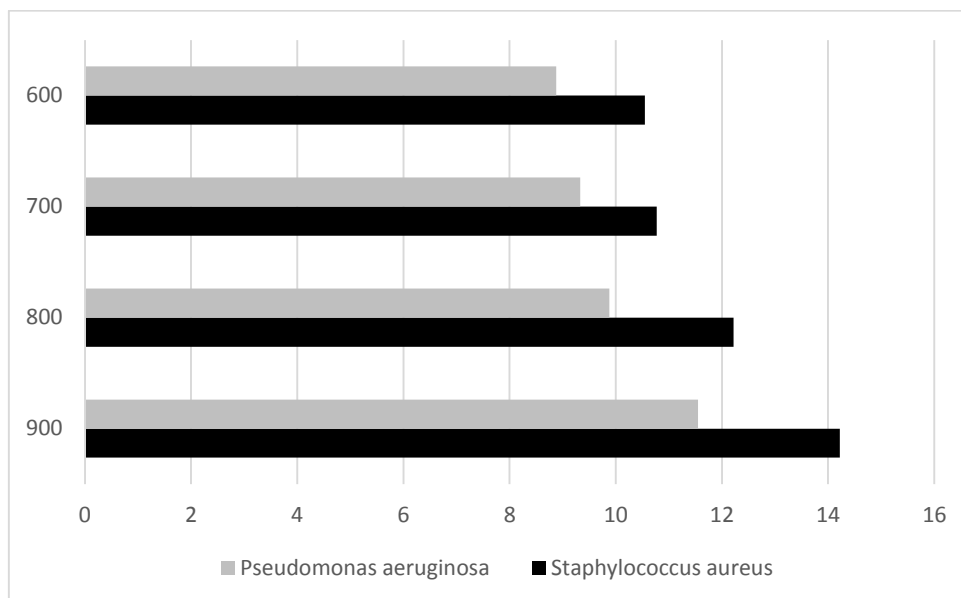


**Anexo 6.****Modelo de Ficha de Recolección de Datos.**

N° de Repetición		<i>Staphylococcus aureus</i>			<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
		SA101	SA102	SA103	AR102	AR103	AR104
<i>Caesalpinia spinosa</i>	900mg/ml						
	800mg/ml						
	700mg/ml						
	600mg/ml						
<i>Curcuma longa</i>	900mg/ml						
	800mg/ml						
	700mg/ml						
	600mg/ml						
<i>Plantago major</i>	900mg/ml						
	800mg/ml						
	700mg/ml						
	600mg/ml						
<i>Verbena officinalis</i>	900mg/ml						
	800mg/ml						
	700mg/ml						
	600mg/ml						

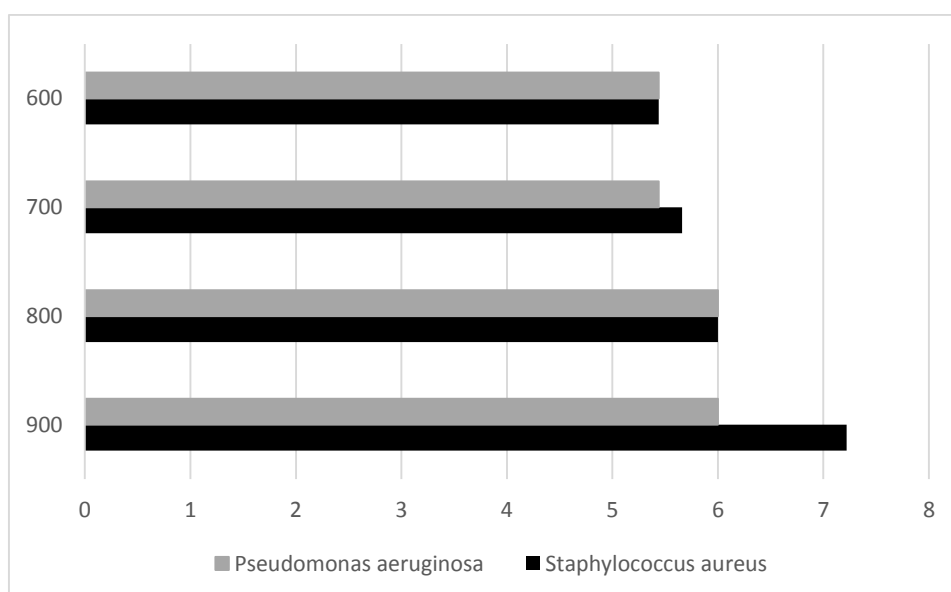
## Anexo 7.

Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Caesalpinia spinosa* sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 Y SA103) y *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104).



## Anexo 8.

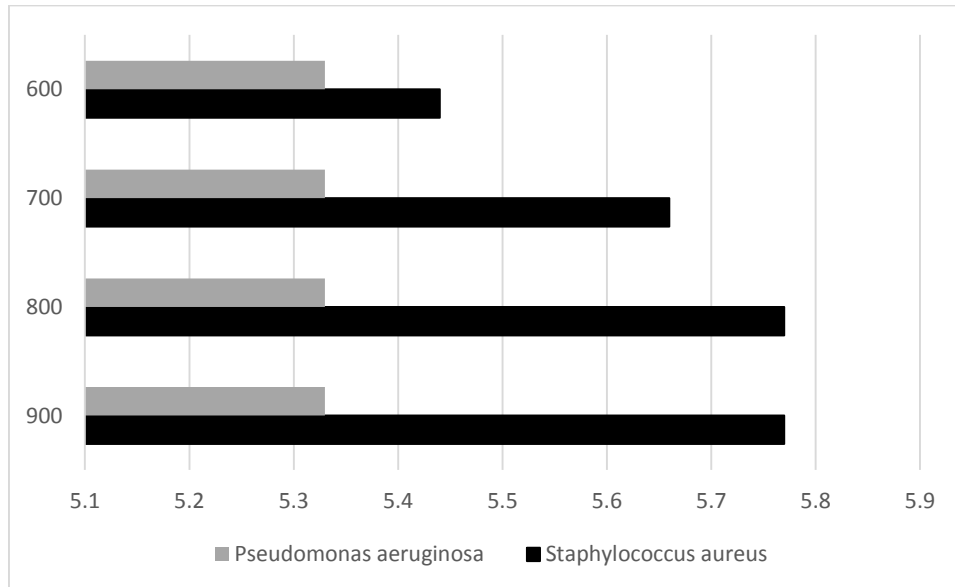
Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Curcuma longa* sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 Y SA103) y *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104).





### Anexo 9.

Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Plantago major* sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 Y SA103) y *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104).



### Anexo 10.

Efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Verbena officinalis* sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* (SA101, SA102 Y SA103) y *Pseudomonas aeruginosa* (AR102, AR103 y AR104).

