



UNIVERSIDAD NACIONAL
"PEDRO RUIZ GALLO"



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA
Y PARASITOLOGÍA

Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Tropaeolum majus*
"mastuerzo" sobre *Escherichia coli* aislada de pacientes con Infecciones
del Tracto Urinario.

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN:
BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA

Presentado por:

Bach. Anthony Edie Tenorio Pizarro
Bach. Jean Antony Estrada Romero

LAMBAYEQUE – PERÚ
2016

UNIVERSIDAD NACIONAL “PEDRO RUIZ GALLO”

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA

**Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Tropaeolum majus*
“mastuerzo” sobre *Escherichia coli* aislada de pacientes con infecciones
del tracto urinario.**

***Bach.* Anthony Edie Tenorio Pizarro**

***Bach.* Jean Antony Estrada Romero**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN:

BIOLOGÍA MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA

APROBADO POR:

Dra. Ana María del Socorro Vásquez del Castillo

PRESIDENTE

Dra. Gianina Llontop Barandiaran

SECRETARIA

Msc. Julio Silva Estela

VOCAL

Dra. Martha Vergara Espinoza

PATROCINADORA

“El que tiene imaginación, con qué facilidad saca de la nada un mundo”.

Gustavo Adolfo Bécquer

DEDICATORIA

De manera especial a mis padres Edie y Magda por su inmenso amor, confianza y por brindarme su apoyo incondicional en mi carrera profesional.

A mis hermanos Magda, Carlos, Lelys, Loren y a mi esposa Catherine por su paciencia, comprensión, confianza y por su apoyo para seguir adelante y haber culminado este trabajo de investigación.

Anthony Edie Tenorio Pizarro

A Dios quien supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se me presentaron. Enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mis padres Pedro y Lidia por su amor, trabajo, sacrificios, confianza y apoyo absoluto a los largo de mi vida y de mi carrera, a mis hermanos Percy, Pierre por estar siempre presente apoyándome para realizarme profesionalmente, a mi esposa Karla y mi razón para seguir adelante mi hija Antonella.

Jean Antony Estrada Romero

AGRADECIMIENTO

- A Dios por ser el partícipe de nuestra existencia y darnos toda la fortaleza necesaria para seguir adelante en cada momento de nuestras vidas.
- A nuestros padres por su interminable apoyo incondicional, por sus enseñanzas y su eterna paciencia ante nuestros momentos difíciles.
- Nuestro más sincero agradecimiento a nuestra asesora Dra. Martha Vergara Espinoza por su amistad, consejos, comprensión, su paciencia como orientadora y por el gran apoyo incondicional en el desarrollo del presente trabajo.
- Nuestro agradecimiento al Msc. Jorge Fupuy Chung por su apoyo y orientación en la asesoría de la parte estadística del presente trabajo.
- Agradecemos a la Lic. Fidelia Álvarez Vásquez y también a todas las personas y familiares que nos brindaron su apoyo y consideración en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

CONTENIDO

	Pág
ÍNDICE DE TABLAS.....	Vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	Viii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	Ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.....	5
III. MATERIALES Y METODOS.....	8
1. Población y muestra.....	8
2. Material.....	8
2.1. Materia Botánico.....	8
2.2. Material Biológico.....	8
3. Métodos.....	8
3.1. Lugar de muestreo.....	8
3.2. Aislamiento e identificación de <i>Escherichia coli</i> en infecciones del tracto urinario.....	9
A. Aislamiento de <i>Escherichia coli</i> en infecciones del tracto urinario (Sacsquispe & Ventura, 2001).....	9
B. Identificación de <i>Escherichia coli</i> en infecciones del tracto urinario (Sacsquispe & Ventura, 2001).....	9
3.3. Determinación del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Tropaeolum majus</i> “mastuerzo” a concentraciones de 30%, 40% y 50% sobre <i>Escherichia coli</i> aislada de pacientes con infecciones del tracto urinario.....	10
A. Tratamiento y obtención del extracto etanólico de <i>Tropaeolum majus</i> “mastuerzo”.....	10
a. Tratamiento (Cobeñas & Ramos, 1998).....	10
b. Obtención del extracto puro (Arellano, 1992).....	11
B. Preparación de la Solución Madre de extracto puro de <i>Tropaeolum majus</i> “mastuerzo” (Cobeñas & Ramos, 1998).....	11
C. Obtención de las concentraciones de extracto puro de <i>Tropaeolum majus</i> “mastuerzo” (Cobeñas & Ramos, 1998).....	13
D. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Tropaeolum majus</i> “mastuerzo.”.....	14
4. Análisis De Datos.....	16
IV. Resultados.....	17
4.1. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Tropaeolum majus</i> “mastuerzo” sobre <i>Escherichia coli</i> aislada de pacientes con infecciones del tracto urinario.....	17
V. Discusión.....	21
VI. Conclusiones.....	25
VII. Resumen.....	26
VIII. Recomendaciones.....	27
IX. Referencias Bibliográficas.....	28
X. Anexos.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas	Pág.
Tabla 1: Promedio del halo de inhibición (mm) de <i>Escherichia coli</i> por el efecto del extracto etanólico de <i>Tropaeolum majus</i> “mastuerzo”.....	17
Tabla 2: Análisis de Varianza de los promedios de los halos de inhibición (mm) de <i>Escherichia coli</i> por el efecto del extracto etanólico de <i>Tropaeolum majus</i> “mastuerzo”.....	18
Tabla 3: Prueba de significancia de Tukey (0.05) del promedio de halo de inhibición de las cepas <i>Escherichia coli</i> por el efecto del extracto etanólico de <i>Tropaeolum majus</i> “mastuerzo”.....	19
Tabla 4: Prueba de significancia de Tukey (0.05) para <i>Escherichia coli</i> en su interacción con las concentraciones del extracto etanólico de <i>Tropaeolum majus</i> “mastuerzo”.....	19
Tabla 5: Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de halos de inhibición de <i>Escherichia coli</i> por el efecto del extracto etanólico de <i>Tropaeolum majus</i> “mastuerzo” según interacción concentraciones del extracto y cepas.....	20

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Pág.
Fig.1: <i>Tropaeolum majus</i> "mastuerzo"	8
Fig.2: Cultivo de <i>Escherichia coli</i> en Agar MacConkey a las 24 horas de incubación.....	9
Fig.3: Lavado y desinfección de las hojas de <i>Tropaeolum majus</i> "mastuerzo"	10
Fig.4: Obtención del extracto puro de <i>Tropaeolum majus</i> "mastuerzo".....	11
Fig.5: Flujograma para la obtención del extracto etanólico de <i>Tropaeolum majus</i> "Mastuerzo"	12
Fig.6: Obtención de las concentraciones 30%, 40% y 50% del extracto etanólico de <i>Tropaeolum majus</i> "mastuerzo"	13
Fig.7: Densidad poblacional de la cepa de <i>Escherichia coli</i> igual al tubo N° 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1.5×10^8 Bacterias/mL), por el método cuantitativo en placa.....	14
Fig.8: Diseño experimental para la determinación del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Tropaeolum majus</i> "mastuerzo" sobre <i>Escherichia coli</i> aislada de ITU	16
Fig.9: Diseño experimental para los halos de inhibición a diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Tropaeolum majus</i> "mastuerzo" sobre <i>Escherichia coli</i> aislada de ITU.....	17

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexos	Pág.
Anexo 1: Clasificación taxonómica de <i>Tropaeolum majus</i> “mastuerzo”	31
Anexo 2: Promedio de halo de inhibición de <i>Escherichia coli</i> por el efecto del extracto etanólico de <i>Tropaeolum majus</i> “mastuerzo”	31
Anexo 3: Promedio de halos de <i>Escherichia coli</i> según las concentraciones del extracto etanólico de <i>Tropaeolum majus</i> “mastuerzo”	32
Anexo 4: Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> del extracto etanolico de <i>Tropaeolum majus</i> “mastuerzo” sobre <i>Escherichia coli</i> según las concentraciones y cepas	32
Anexo 5: Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> del extracto etanólico de <i>Tropaeolum majus</i> “mastuerzo” sobre <i>Escherichia coli</i>	33
Anexo 6: Entrevista a los pacientes con sintomatología de infección urinaria	34

I. INTRODUCCIÓN

La infección del tracto urinario (ITU) es considerada generalmente como la existencia de microorganismos patógenos en el tracto urinario con o sin presencia de síntomas. Se ha determinado que las mujeres jóvenes son las más afectadas, con una frecuencia de 0,5 a 0,7 % infecciones por año. Del total de las mujeres afectadas por una ITU, el 25% al 30% desarrollan infecciones recurrentes; así mismo es una de las infecciones más frecuentes de la infancia. A los 7 años, aproximadamente, 8% de las niñas y 2% de los varones han tenido al menos un episodio de ITU. La prevalencia en el anciano es de 10% a 50% y es moderadamente más elevada en las mujeres (Echevarria - Zarate *et al.*, 2006).

Un estudio realizado en el Hospital Provincial Docente Belén de Lambayeque sobre la incidencia de *Escherichia coli* productora de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE) como agente de ITU, reveló que *Escherichia coli* es el agente etiológico más frecuente alcanzando un porcentaje de 55.1%, de este el 3,67% correspondió a cepas productoras de Betalactamasas de espectro extendido (BLEE). Además se identificó a otras especies tales como *Staphylococcus coagulasa negativo*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Enterobacter aerogenes* y *Citrobacter freundii* (Huayra, 2008).

Además de lo mencionado se tiene referencia que *Escherichia coli* causante de ITU presenta un incremento en su resistencia a diversos antibióticos utilizados rutinariamente en el tratamiento, la misma que supera el 50 % en pacientes ambulatorios y hospitalizados (Salas, 2006). Durante los años del 2010 al 2013, se ejecutó un estudio para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* uropatógena, se encontró resistencia a Cefalotina, Cefepime, Tetraciclina, Ciprofloxacino y Levofloxacino ($p > 0,05$) y sensibilidad a Ampicilina, Amoxicilina/A. Clavulánico, Gentamicina y Trimetropim/Sulfametoxazol ($p < 0,05$) (Tucto-Succhil *et al.*, 2014).

Por otro lado, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reconocido la importancia de las medicinas tradicionales desde 1975 y se estima que un 80% de la población mundial depende de las plantas para su atención primaria de la salud por la creciente insatisfacción hacia la medicina convencional, ya sea por la falta de efectividad, por los efectos colaterales que provocan el uso de ciertos medicamentos o por su elevado costo. Debido a la importancia de las plantas medicinales en la salud se considera su estudio, análisis y utilización con el fin de que los beneficios de éstas se encuentren al alcance de la población (OMS, 2007).

Tropaeolum majus “mastuerzo” perteneciente a la familia *Tropaeolaceae*, es una planta medicinal muy utilizada antiguamente, por sus propiedades antibióticas y balsámicas, las infusiones de las hojas, se utilizan para el tratamiento en infecciones de las vías urinarias como cistitis y pielonefritis, en las que actúa como un verdadero antibiótico bacteriostático, que impide la reproducción de numerosos microorganismos patógenos entre ellos *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Además, productos obtenidos del tallo y la flor se utilizan como aperitivo, digestivo, diurético y anti fúngico (Vásquez *et al.*, 2010).

Experimentalmente se ha evaluado la actividad antimicrobiana de las fracciones hexánica, clorofórmica, de acetato de etilo y butanólico obtenidas a partir de un extracto etanólico de hojas y tallos de *Tropaeolum majus*, siendo las dos primeras las que presentaron mayor actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella setubal*, *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (Zanetti *et al.*, 2003). Los mecanismos de resistencia de *E. coli* pueden presentarse como alteración del blanco antimicrobiano o disminución de la permeabilidad de la pared por poseer una pequeña capa de peptidoglicano, la cual es más sensible (Lizcano & Vergara, 2007). La membrana celular de *Escherichia coli* actúa como una barrera para muchas sustancias medioambientales y antibióticos (Murray *et al.*, 2007).

Las infecciones del tracto urinario (ITUs) constituyen una de las patologías infecciosas más frecuentes tanto en la comunidad como en el ámbito hospitalario, siendo el agente causal más recurrente de estas infecciones el microorganismo *Escherichia coli*. En Lambayeque los índices de estas infecciones bacterianas son altos, por lo que sigue siendo un problema en la sociedad por causar ausentismo laboral y escolar y, gasto económico para su tratamiento. Así mismo es importante mencionar que el agente etiológico mencionado presenta resistencia bacteriana a diversos antibióticos por varios factores, sobre todo la automedicación que ha permitido el rápido desarrollo y dispersión de mecanismos de resistencia haciendo que los antimicrobianos sean obsoletos o tengan uso limitado.

Estudios en los que se ha demostrado que existen diferentes plantas que inhiben a diversos microorganismos, pero no se han encontrado estudios que demuestren que *Tropaeolum majus* “mastuerzo” tenga efecto inhibitorio sobre microorganismos causantes de infecciones del tracto urinario, esto como consecuencia de que se considera más a *Tropaeolum majus* “mastuerzo” como una planta que se cultiva como ornamental que como planta medicinal para el tratamiento de diversas infecciones, entre ellas las infecciones del tracto urinario frecuentemente causadas por *Escherichia coli*.

Por tanto, el presente estudio demostró bajo condiciones controladas de laboratorio, el efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” a diferentes concentraciones sobre *Escherichia coli* aislada de pacientes con ITUs, contribuyendo de esta manera con el conocimiento científico de las propiedades antimicrobianas de dicha planta, se pretende también incentivar la realización de nuevos estudios destinados a la elaboración de productos farmacéuticos con la planta, eficaces para el tratamiento de infecciones urinarias y que sean productos accesibles a personas de bajos recursos económicos.

Finalmente valorar la planta como un recurso natural de la zona de Lambayeque, cuyos resultados evidencian la capacidad del mastuerzo para inhibir el crecimiento de una amplia gama de microorganismos. Por todo ello se realizó el presente trabajo que tiene como objetivo general Conocer el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” sobre *Escherichia coli* aislada de pacientes con infecciones del tracto urinario y como objetivo específico:

- Determinar el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” a concentraciones de 30%, 40% y 50% sobre *Escherichia coli* aislada de pacientes con infecciones del tracto urinario.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Las infecciones de las vías urinarias son un proceso ocasionado por la colonización bacteriana del aparato urinario, la mayoría de ellas son causadas por bacilos gramnegativos de la familia enterobacteriaceae, tales como *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* (García & Picazzo, 1996), todas generalmente provienen de la flora colónica y *Escherichia coli* es el principal agente de la forma aguda no complicada de ITU. Otras bacterias incluyen *Streptococos* del grupo B y raras veces *Staphylococcus saprophyticus* y *Haemophilus influenzae* (Durbin & Meter, 1984). El espectro de los agentes etiológicos de ITU depende en gran parte, si la infección es de origen comunitario o nosocomial. Por otro lado, existen diferentes factores por los cuales los microorganismos, principalmente bacterias de la flora intestinal del mismo individuo, pueden llegar a colonizar y provocar un cuadro inflamatorio en diferentes sitios anatómicos del tracto urinario (Zamora & Ortiz, 2002).

Datos epidemiológicos en el Perú revelaron que *Escherichia coli* aisladas de muestras de orina de pacientes comunitarios, sospechosos de tener una ITU, tuvieron una resistencia significativa a betalactámicos como: ampicilina 72%, cefalotina 25% y amoxicilina/ácido clavulánico 35% y también a las quinolonas como el ácido nalidíxico y la ciprofloxacina 30% (INS, 2007).

Asimismo se realizó una investigación en el Hospital Regional Sanidad PNP-Chiclayo, en la cual se analizaron 295 muestras de orina de pacientes ambulatorios con diagnóstico presuntivo de ITU, se identificó a *Escherichia coli* 66,02 % cuyo espectro antimicrobiano determinó resistencia frente a ciprofloxacino 55,88%, norfloxacino 54,41% y trimetropin – sulfametoxazol 58,82% (Salas, 2006).

Tropaeolum majus “mastuerzo” es originaria del Perú, crece como planta cultivada en los jardines de costa sierra y selva. Es una planta herbácea, anual, postrada o trepadora, algo carnosa, con hojas orbiculares, con pecíolos largos y peltados; flores vistosas, solitarias, amarillas, anaranjadas o rojizas (Font Quer, 1981). Desde la antigüedad empíricamente se han utilizado las flores, hojas y frutos para el dolor de cabeza, afecciones de la piel, expectorante, sedante, bronquitis, gripe e infecciones de las vías urinarias (Arellano, 1992). El mastuerzo es una de las pocas plantas superiores capaces de producir una sustancia con acción antibiótica que no destruye la flora bacteriana propia, ni tampoco provoca reacciones alérgicas (Imaña *et al.*, 1996).

Se estudió la fitoquímica de *Tropaeolum majus* encontrándose entre los fitoconstituyentes: flavonoides (Quercetrinalso y el aceite esencial), componente azufrado (tropaeolina), compuesto sulfurado (thioglucósido de tropaeolina), triterpenos (Cucurbitacina B, Cucurbitacina D y Cucurbitacina E), el sesquiterpeno Xanthosina, taninos, alcaloides y saponinas (Benites & Roubella, 1994). De ellos, Glucotropaeolósido se descompone en isocianato de bencilo o glucotropaeolina que posee propiedades antibióticas y expectorantes. (Nanzi, 2010), los flavonoides tienen actividad antimicrobiana debida a la formación de complejos con las proteínas solubles y extracelulares de los microorganismos (Domingo & López, 2003); los taninos pueden prevenir la expresión de las fimbrias de *E. coli* (Araujo & Salas, 2008). Por otro lado se estudió la variabilidad de la biosíntesis de benzil-glucosinolato en *Tropaeolum majus*, encontrándose que dicha síntesis se incrementa durante el proceso de floración y de formación de la semilla, decreciendo en la madurez (Lykkesfeldt & Lindberg, 1993).

Se estudió la acción inhibitoria *in vitro* del extracto etanólico de *Tropaeolum majus*, demostrándose que tanto las hojas, flores y frutos presentan propiedades antibacterianas y antifúngicas; asimismo se determinó que los frutos tuvieron una mayor actividad inhibitoria significativamente mayor a la de hojas y flores. Se determinó que los extractos de frutos y flores de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” a una CMI₁₀₀ de 0,2 mg/ml inhibieron a *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae*. Teniendo como referencia que la CMI₁₀₀ del extracto de ajo (*Allium sativum*) para *Escherichia coli* es de 10 mg/ml, se dedujo que el extracto de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” fue más efectivo para las especies bacterianas. (Arrascue & Zuta, 1996).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1. POBLACIÓN Y MUESTRA

El tamaño de la muestra fue 15, determinado por 5 cepas de *Escherichia coli* sometidas a 3 concentraciones (30%, 40%, 50%) del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” y 9 repeticiones por cada interacción, el número total de observaciones fue de 135 unidades experimentales.

2. MATERIAL BIOLÓGICO

2.1. Material botánico

- ✓ Extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo”.

2.2. Material biológico

- ✓ Cinco cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario identificadas como: *E. coli* c1, *E. coli* c2, *E. coli* c3, *E. coli* c4 y *E. coli* c5.

3. METODOS

3.1 Lugar de muestreo

Las ramas de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” procedentes de Chota, se adquirieron en el mercado modelo de Chiclayo. De las ramas se obtuvieron las hojas para dicho estudio (**Fig. 1**).



Figura 1: *Tropaeolum majus* “mastuerzo”

3.2 Aislamiento e identificación de *Escherichia coli* en infecciones del tracto urinario.

A. Aislamiento de *Escherichia coli* en infecciones del tracto urinario (Sacsquispe & Ventura, 2001).

- ✓ En un envase de plástico (200 cc.) nuevo, limpio, de boca ancha y tapa rosca; se obtuvieron las muestras de orina por el método de chorro medio, previa entrevista con aquellos pacientes que presentaron sintomatología como frecuencia de orinar, ardor y dolor al orinar fiebre escalofrío, etc.
- ✓ Las muestras se sembraron con un asa bacteriológica calibrada esterilizada, mediante el método de agotamiento y estría sobre placas con agar MacConkey, y se incubaron a una temperatura de 37°C por 24 horas (Fig. 2).



Figura 2: Cultivo de *Escherichia coli* en Agar MacConkey a las 24 horas de incubación.

B. Identificación de *Escherichia coli* en infecciones del tracto urinario (Sacsquispe & Ventura, 2001).

- ✓ Se identificaron las colonias sospechosas de *Escherichia coli* (lactosa positiva) para proceder a la siembra por estría en los medios diferenciales (TSI, LIA, citrato, SIM, Rojo de metilo, Voges Proskauer) los cuales se incubaron a una temperatura de 37°C por 24 horas.
- ✓ Transcurrido el tiempo se procedió a la lectura de los medios diferenciales.

3.3 Determinación del efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” a concentraciones de 30%, 40% y 50% sobre *Escherichia coli* aislada de pacientes con infecciones del tracto urinario.

A. Tratamiento y obtención del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo”.

a. Tratamiento (Cobeñas & Ramos, 1998).

- Las hojas frescas de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” se procesaron usando guantes esterilizados y se colocaron en un recipiente limpio para ser lavados con abundante agua.
- Después se procedió a la desinfección con bicloruro de mercurio al 1% por un minuto, luego se eliminó el exceso de desinfectante lavando las hojas con abundante agua destilada estéril (**Fig. 3**).



Figura 3: Lavado y desinfección de las hojas de *Tropaeolum majus* “mastuerzo”

b. Obtención del extracto puro (Arellano, 1992).

- Después del tratamiento las hojas de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” fueron trituradas en un mortero estéril, se exprimieron en una gasa fina esterilizada, el producto obtenido fue el extracto puro de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” (Fig. 4).



Figura 4: Obtención del extracto puro de *Tropaeolum majus* “mastuerzo”.

B. Preparación de Solución Madre del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” (Cobeñas & Ramos, 1998).

- En un recipiente esterilizado se colocó 50 mL de extracto puro de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” al cual se le adicionó 50 mL de alcohol al 75%.
- De esta manera se obtuvo una solución madre que contiene 50% v/v y a partir de ella se obtuvieron diluciones a diferentes concentraciones.

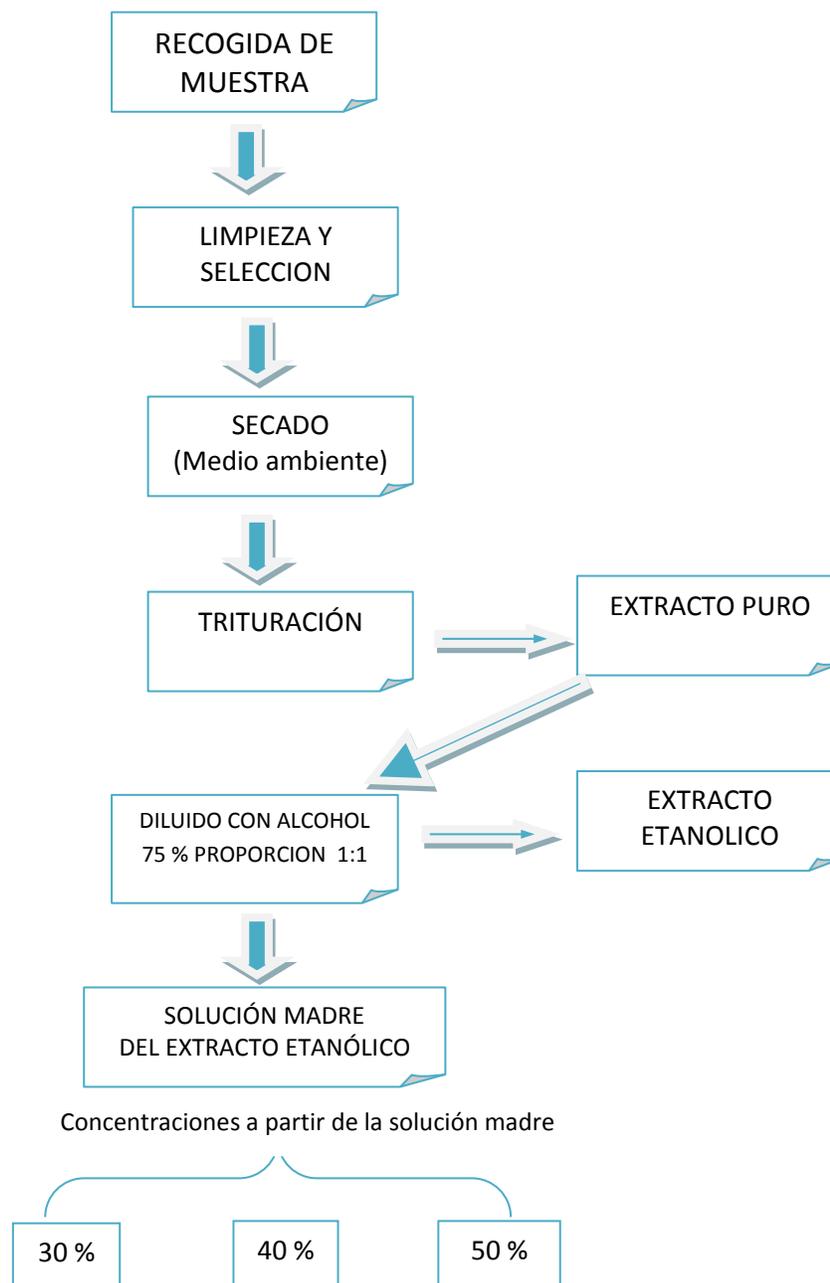


Figura 5: Flujograma para la obtención del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* "Mastuerzo".

c. Obtención de las concentraciones del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” (Cobeñas & Ramos, 1998).

- Partiendo del hecho de que la solución madre contiene 50% v/v, se procedió a realizar diluciones obteniendo concentraciones de 30, 40, 50% v/v. Tomando un volumen de la solución stock y completando con agua destilada estéril, como se aprecia más adelante en el cuadro de concentraciones de extracto puro de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” obtenidos a partir de la solución Stock y el diluyente (**Figura 6**).

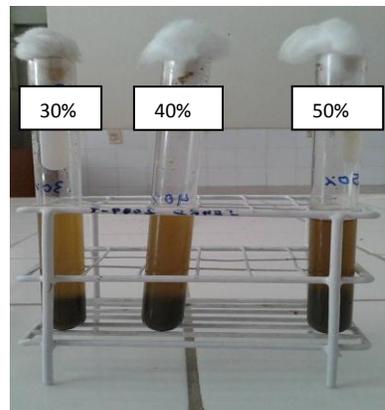


Figura 6: Obtención de las concentraciones 30%, 40% y 50% del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo”.

- Concentraciones de extracto puro de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” obtenidos a partir de la solución Stock y el diluyente.

Soluc. Stock (mL)	Diluyente (mL)	Concentración (%v/v)
6	4	30
8	2	40
10	0	50

D. Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo.”

- **Preparación y estandarización de la suspensión bacteriana.**
 - Las cepas de *Escherichia coli* se sembraron en caldo nutritivo y se incubaron a una temperatura de 37°C por 24 horas.
 - La estandarización de la suspensión bacteriana se realizó según el método descrito por la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica y la densidad poblacional es igual al tubo N° 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1.5×10^8 bacterias/mL), para lo cual se empleó como control el método cuantitativo en placa (DIFCO, 1987). **Fig. 7**

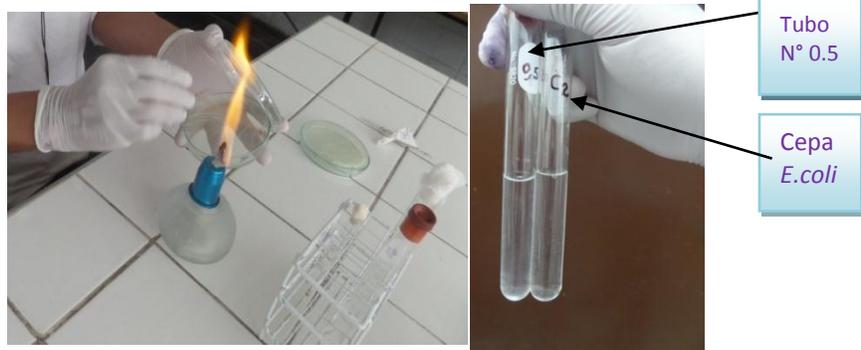


Figura 7: Densidad poblacional de la cepa de *Escherichia coli* igual al tubo N° 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland (1.5×10^8 bacterias/mL), por el método cuantitativo en placa.

- **Preparación de discos de susceptibilidad**
 - Se utilizó papel Whatman N°01 del cual se obtuvieron discos de 5 mm de diámetro con ayuda de un perforador.
 - Los discos se colocaron dentro de tubos de ensayo y fueron esterilizados en autoclave (15 Lb. de presión a 121°C por 15 minutos).
 - Se dejaron secar en horno a 60°C por 24 horas.
 - Posteriormente los discos se embebieron con cada una de las concentraciones del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” a 30, 40 y 50% v/v, se dejaron en reposo por 5 minutos para luego realizar la prueba de susceptibilidad.

- **Prueba de susceptibilidad bacteriana según el método modificado de difusión de Kirby Bauer (Kinsbruy *et al.*, 1991).**
 - En placas petri previamente esterilizadas se sirvió 10 mL. de agar Müller Hinton, se dejó solidificar y se realizó el control de esterilización llevándolas a incubación a 37 °C por 24 horas.
 - Se introdujo el hisopo esterilizado dentro del inóculo estandarizado, eliminando el exceso por rotación firme contra la pared interna del tubo.
 - El inóculo se sembró superficialmente por estría en tres direcciones diferentes, con el fin de cubrir toda la superficie del agar, luego se dejó secar durante cinco minutos y se colocaron los discos impregnados con el extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” a una distancia de 15 -20mm.
 - Posteriormente se llevaron las placas a incubación a 37°C/24 horas. Transcurrido el tiempo se midieron los halos de inhibición (mm), registrando la medida para cada una de las cepas.

4. Análisis Estadístico de los Datos

Contrastación de hipótesis del presente estudio Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” sobre *Escherichia coli* aislada de pacientes con infecciones del tracto urinario fue el estímulo creciente (Alvitres, 2000).

Para el análisis estadístico de los datos se aplicó el Análisis de Varianza (ANAVA) con arreglo factorial 3 x 5 x 9 siendo el primer factor las concentraciones del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” (30, 40, 50 %), el segundo factor las cepas bacterianas (*Escherichia coli*), y el tercer factor el número de repeticiones. Este análisis se complementó con la prueba de significancia de Tukey con un nivel de significación $p < 0,05$. Para todo ello se utilizó el software estadístico: Estadística versión 5 y Ms Excel 2007 (Fig. 8).

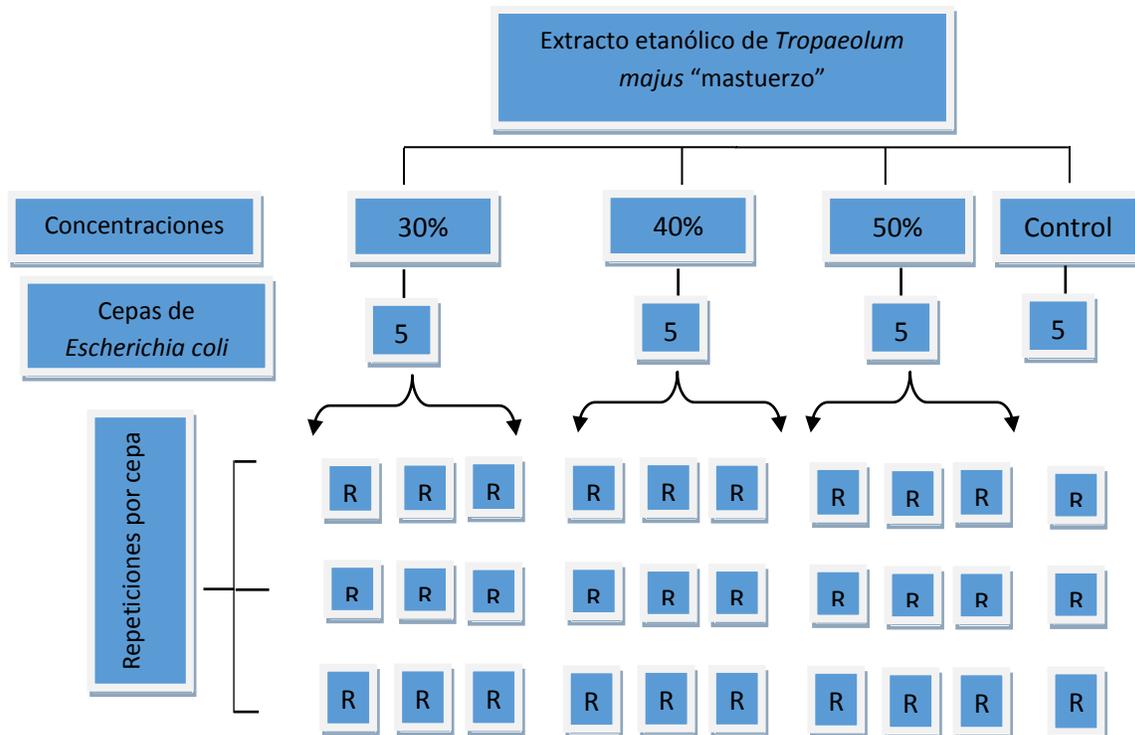


Figura 8: Diseño experimental para la determinación del efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” sobre *Escherichia coli* aislada de ITU.

IV. RESULTADOS

4.1. Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” sobre *Escherichia coli* aislada de pacientes con Infecciones del Tracto Urinario.

El extracto etanólico de *Tropaeolum majus* causó inhibición del crecimiento de *Escherichia coli*, la medida de los diámetros de los halos de inhibición aumentaron conforme las concentraciones del producto se incrementaron.

En la tabla 1 y figura 9 se observa el tamaño promedio de los diámetros de los halos de inhibición producidos por las concentraciones de *Tropaeolum majus* sobre la cepa, a la mayor concentración del extracto (50%) se obtuvo un halo promedio de 26.55 mm.

Tabla 1: Promedio del halo de inhibición (mm) de *Escherichia coli* por el efecto del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo”.

Concentración de la solución (%v/v)	Halos de inhibición (mm)
	<i>Escherichia coli</i>
30	20.11
40	23.57
50	26.55

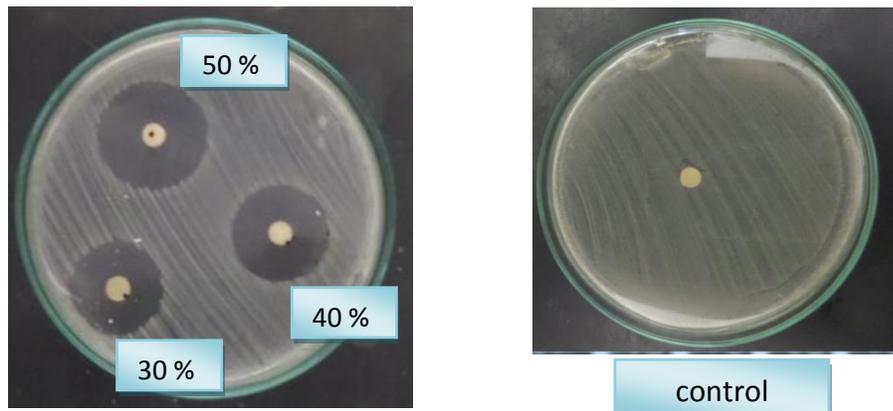


Figura 9: Halos de inhibición del crecimiento de *E. coli* aislada de ITU por efecto del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” a diferentes concentraciones.

El análisis de varianza (ANAVA), mostró que existen diferencias estadísticas significativas entre los halos de inhibición (mm) obtenidos según cepa y concentración para la interacción entre dichos factores (CxK) existen diferencias significativas (Tabla 2).

Tabla 2: Análisis de Varianza de los promedios de los halos de inhibición (mm) de *Escherichia coli* por el efecto del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo”.

Hipótesis:

Cepas: Ho:

$$E. coli 1 = E. coli 2 = E. coli 3 = E. coli 4 = E. coli 5$$

Concentraciones:

$$Ho: = K30 = K40 = K50$$

Interacciones:

Ho: Hay efecto de interacciones entre CxK.

Fuente de Variación	SC	GL	CM	F	P	Ft	Decisión
						0.05	
Cepas (C)	88.75	4	22.08	21.07	0.000000	2.447	Rechaza Ho
Concentración(K)	936.24	2	468.12	446.61	0.000000	3.072	Rechaza Ho
CxK	42.43	8	5.30	5.06	0.000020	2.016	Rechaza Ho
Error	125.78	120	1.05				
Total							

SC=Suma de cuadrados

CM= Cuadrados medios

GL= Grados de libertad

P= Probabilidad

La prueba de significancia de Tukey para los promedios de los halos de inhibición de *Escherichia coli* obtenidos después de la prueba de sensibilidad bacteriana demostró el efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” sobre cada especie. Se observa que el promedio de halo de inhibición más alto y más bajo perteneció a las cepas de *E.coli 3* (24.07470mm) y *E. coli 5* (21.85185mm) respectivamente, mientras la cepas *E. coli 2* (23.77778), *E.coli 1* (23.44444) y *E.coli 4* (23.92593) presentaron un promedio de halo similar. (Tabla 3)

Tabla 3: Prueba de significancia de Tukey (0.05) del promedio de halo de inhibición de las cepas *Escherichia coli* por el efecto del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo”.

CEPAS	Promedio de halo de inhibición (mm)	Significancia
<i>E.coli</i> C5	21.85185	a
<i>E.coli</i> C1	23.44444	b
<i>E.coli</i> C2	23.77778	b
<i>E.coli</i> C4	23.92593	b
<i>E.coli</i> C3	24.07407	b

Letras diferentes ≠ diferencia significativa Letras iguales = no hay diferencias significativas

Estadísticamente se demostró, a través de la prueba de Tukey que el promedio de los halos de inhibición de *Escherichia coli* aislada de infecciones del tracto urinario expuestos a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” (30, 40 y 50 % v/v), aumentó a medida que se incrementó las concentraciones, así a las concentración de 30% v/v y 50 % v/v se observó un halo de inhibición de 20.1111 y 26.55556 mm respectivamente (Tabla 4).

Tabla 4: Prueba de significancia de Tukey (0.05) de *Escherichia coli* por el efecto del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” según concentraciones del extracto.

Concentraciones	Promedio del halo (mm)	Significancia
HA-30	20.11111	a
HA-40	23.57778	b
HA-50	26.55556	c

HA: Extracto etanólico. Letras diferentes = diferencia significativa

Los promedios de halo de inhibición demuestran que la cepa más resistente fue *E. coli* C5 presentando halos de inhibición de 18.77 y la cepa más sensible fue *E. coli* C2 con un promedio de halo de inhibición de 27.33mm. A las concentraciones de 30 y 50% v/v respectivamente. (Tabla 5).

Tabla 5: Prueba de significancia de Tukey (0.05) de los promedios de halos de inhibición de *Escherichia coli* por el efecto del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” según interacción concentraciones del extracto y cepas.

CEPA	CC	HALO	1	2	3	4	5	6	7	8
C5	30	18.77778	a							
C2	30	19.44444	a	b						
C1	30	20.22222	a	b	c					
C4	30	20.88889		b	c					
C3	30	21.22222			c					
C5	40	21.33333			c					
C1	40	23.11111				d				
C4	40	24.00000				d	e			
C2	40	24.55556				d	e	f		
C3	40	24.88889					e	f		
C5	50	25.44444					e	f	g	
C3	50	26.11111						f	g	h
C4	50	26.88889							g	h
C1	50	27.00000							g	h
C2	50	27.33333								h

V. DISCUSIÓN

La presente investigación constituye la primera en el departamento de Lambayeque en estudiar el efecto inhibitorio *in vitro* de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” en extracto etanólico a concentraciones de 30, 40 y 50% v/v sobre *Escherichia coli* aislada de pacientes con infecciones del tracto urinario. Dicha bacteria es una de las aisladas frecuentemente de ITUs (Zamora & Ortiz, 2002; Huayra, 2008) debido a la predisposición de los pacientes a la infección, ya sea por razones anatómicas como ocurre en las mujeres en las que el tracto urinario está más cercano al tracto entérico o por hábitos higiénicos como sucede con los niños principalmente. La etiología de la ITUs por *E. coli* se complica con la elevada y cada vez más creciente resistencia de la bacteria a los principales antimicrobianos utilizados en el tratamiento de la infección (Salas, 2006; INS, 2007; Tucto-Succhil *et al.*, 2014).

A pesar de las aplicaciones de *Tropaeolum majus* “mastuerzo”, son pocos los estudios realizados al respecto (Vásquez *et al.*, 2010). Los resultados de este trabajo demostraron que el extracto etanólico de hojas de “mastuerzo” tiene actividad antimicrobiana contra *E. coli* debido al contenido de flavonoides, compuestos azufrados, terpenos, taninos, alcaloides y saponinas en dichas plantas (Benites & Roubella, 1994; Nanzi, 2010; Vásquez *et al.*, 2010), los tres últimos por sus propiedades astringentes y de alteración de la tensión superficial de los fosfolípidos presentes en gran cantidad en las membranas celulares bacterianas y, en mayor concentración, en *E. coli* que por ser Gram negativa tiene una capa adicional de fosfolípidos en la membrana externa de su pared celular.

Los taninos pueden prevenir la expresión de las fimbrias de *E. coli* según Araujo & Salas, 2008, por lo que para esta bacteria representaría una limitación al su poder infectivo ya que no podría adherirse a superficies como a las mucosas del tracto genitourinario en consecuencia no se desarrollaría la colonización. Los flavonoides por su parte, poseen actividad antimicrobiana debida a la formación de complejos con las proteínas solubles y extracelulares de los microorganismos (Domingo & López, 2003), esto en *E. coli* representaría la formación de complejos insolubles con proteínas transportadoras o con los sideróforos de hierro, por tanto se limita la nutrición y el metabolismo respiratorio.

Uno de los principales mecanismos propuesto por los terpenoides consiste en la destrucción de la membrana celular bacteriana mediante tres posibles vías: aumentando la permeabilidad de la membrana a iones pequeños, afectando la estabilidad estructural de la membrana y desestabilizando el empaquetamiento de la bicapa lipídica, cualquiera de estos tres efectos produce la muerte celular bacteriana. Así mismo, los polifenoles (flavonoides, triterpenos, sesquiterpeno) además de lo expresado anteriormente, tienen mecanismos de acción contra los microorganismos, como la inhibición de la producción de ácidos y de la enzima glucosiltransferasa, lo que podría explicar su acción contra *Escherichia coli*, debido a que es ésta enzima producida por la bacteria es la responsable de las interacciones adhesivas y expresión de la virulencia. Por tanto, sus efectos y consecuencias para *E. coli* serán las descritas anteriormente.

En el presente estudio se determinó estadísticamente que el efecto inhibitorio de “mastuerzo” es dependiente de la cepa de *Escherichia coli*, lo que concuerda con los resultados de Arrascue & Zuta (1996). *Tropaeolum majus* “mastuerzo”, como ya se ha afirmado influye en el crecimiento de la bacteria, explicado esto en el grado de solubilidad del extracto etanólico en la bicapa fosfolipídica de la membrana celular, afectando no solo dicha estructura sino también las proteínas solubles y extracelulares bacterianas; sin embargo tal efecto depende de la cantidad de producto que atraviese la capa de lipopolisacárido (LPS) indirectamente por el crecimiento en la superficie bacteriana, la misma que puede variar según la virulencia de la cepa de *Escherichia coli*, así a mayor cantidad de LPS mayor virulencia y mayor resistencia de la bacteria al producto, el mismo que no puede atravesar la pared celular ni llegar a la membrana celular (Domingo & Lopez, 2003).

También se encontró dependencia estadísticamente significativa entre el efecto inhibitorio y la concentración del producto, explicado en la relación directamente proporcional entre cantidad de producto y cantidad de principio activo, a mayor cantidad de extracto etanólico de mastuerzo, mayor cantidad de polifenoles (flavonoides, triterpenos, sesquiterpeno) y otros principios activos que dañan a la bacteria. Todo esto sumado a lo anteriormente mencionado permiten afirmar que la estructura celular de las cepas bacterianas en estudio, los mecanismos en el proceso de difusión de los compuestos químicos y la composición química del extracto etanólico, determinan el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” sobre *Escherichia coli*.

Existe concordancia entre los resultados del presente estudio con los obtenidos por Arrascue & Zuta (1996), que demostró el efecto inhibitorio del extracto etanólico de *T. majus*, sobre *E. coli*, *Proteus vulgaris* y *Klebsiella pneumoniae* y con Zanetti *et al.* (2003), quienes evaluaron la actividad antimicrobiana de diferentes extractos de *T. majus* frente a *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella setubal*, *S. aureus* y *S. epidermidis*; sin embargo el efecto fue mayor que el obtenido en ésta investigación; al respecto es posible que la diferencia se deba a la parte de la planta y a los solventes utilizados, mientras que en éste estudio se usó alcohol y hojas de “mastuerzo”, los primeros autores emplearon hojas, flores y frutos y los segundos usaron hexano, cloroformo, acetato de etilo y butanólico y hojas y tallos de la planta. Como es sabido, los diversos solventes extraen diferentes principios y en cantidades diferentes que repercute en el efecto del producto, lo mismo ocurre con las diferentes partes de la planta; a esto debe adicionársele la etapa vital de la planta ya que la síntesis de principios activos se incrementa durante el proceso de floración y de formación de la semilla, decreciendo en la marchites (Lykkesfeldt & Lindberg, 1993).

Finalmente el extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” utilizado a diferentes concentraciones actuó directamente sobre las cepas de *Escherichia coli* evidenciándose esto en la obtención de los halos definidos que facilitaron la lectura de los diámetros. Así mismo el efecto es dependiente de la composición química presente en el extracto etanólico, la estructura celular de las cepas bacterianas en estudio y los mecanismo en el proceso de difusión de los compuestos químicos hacia la célula bacteriana. Con este resultado se puede valorar la planta como un recurso medicinal accesible a personas de bajos recursos económicos eficaz para el tratamiento de infecciones urinarias.

VI. CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” tiene efecto inhibitorio *in vitro* sobre *Escherichia coli*, el cual es estadísticamente dependiente de la cepa de *E. coli* y de las concentraciones del extracto.
- El extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” a concentraciones de 30% v/v inhibió a *Escherichia coli*, con halos de inhibición de 20.11 mm, a 40% v/v con halos de 23.47 mm y a 50 % v/v 26.55 mm. halos de inhibición.

VII. RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” a concentraciones de 30%, 40% y 50% sobre *Escherichia coli* aislada de pacientes con infecciones del tracto urinario. Se trabajó con 5 cepas de *Escherichia coli*, 3 concentraciones (30%, 40%, 50%) del extracto etanólico y 9 repeticiones por cada interacción, el número total de observaciones fue de 135 unidades experimentales. La identificación de *E. coli* se realizó según la metodología de Sacsquispe y Ventura, 2001 y para la determinación del efecto inhibitorio se utilizó el método modificado de difusión de Kirby Bauer (Kinsbruy *et al.*, 1991). El extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” a concentraciones de 30%, 40% y 50% produjo halos de inhibición promedios de 20.11, 23.57 y 26.55 mm en las cepas de *Escherichia coli*. Se concluye que el extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” tiene efecto inhibitorio *in vitro* sobre *Escherichia coli*, el cual es estadísticamente dependiente de la cepa de *E. coli* y de las concentraciones del extracto.

VIII. RECOMENDACIONES

Realizar estudios de sensibilidad de diferentes extractos (acuosos, clorofórmicos, metanólicos, etc) de mastuerzo con otros microorganismos de importancia clínica, tanto Gram positivos como Gram negativos.

Investigar diferentes plantas medicinales con propiedades antibacterianas incluido el mastuerzo para evaluar su toxicidad para así ampliar el conocimiento de la fitoterapia y a la vez brindar una alternativa económica para los problemas de salud.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvitres, V. (2000). Método Científico. Planificación de la Investigación. 2^{da} Edición. Editorial Ciencia. Chiclayo – Perú. 158pp
- Araujo, J. & Salas, R. (2008). Actividad antimicrobiana de plantas. Fondo editorial de la Universidad Científica del Sur. 6 – 17 pp.
- Arellano, P. (1992). El libro verde. Guía de recursos terapéuticos vegetales. Instituto Nacional de Medicina tradicional (INMETRA) Lima Perú. 62pp.
- Benites, V. & Roubella, P. (1994). Estudio fitoquímico e histológico de la especie *Tropaeolum majus* L. “mastuerzo”. Tesis Lic. Farmacia y Bioquímica - UNT. Trujillo Perú 43p.
- Arrascue, C. & Zuta, N. (1996). Acción Inhibitoria “*in vitro*” del extracto de *Tropaeolum majus* L. “Mastuerzo” frente a dermatofitos y bacterias de importancia clínica. Tesis Lic. Biología – Microbiología y Parasitología. FFCCBB - UNPRG. 83p
- Cobeñas, C. & Ramos, R. (1998). Efecto Antibacteriano “*in vitro*” de una solución Hidroalcohólica de “ajo” *Allium sativum* en cepas de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* sp. Tesis para optar el Título de Licenciado en Microbiología-Parasitología U.N.P.R.G. Lambayeque.
- DIFCO, (1987). Medios de cultivo deshidratados y reactivos para Microbiología. 10^{ma}Edic. Difco laboratorios. Pág: 46-65.
- Domingo, D. & López, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. Pros Science, S.A. Rev. Esp. Quimioterap. Vol 16 (4): 385 – 393. España.
- Durbin, W, & Meter, G. (1984). Management of Urinary Tract Infections in Infants and Children. *Pediatr. InfectDis J.* 3: 564-574.
- Echevarria- Zarate, J., Sarmiento, E. & Osoreo, F. (2006). Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. *Acta méd. Peruana.* vol.23, n.1, pp. 26-31. ISSN 1728-5917.

- Font Quer, P. (1981). Plantas Medicinales. El Dioscórides renovado. 7ma. Edición. Editorial Labor S.A. España. 397-399pp
- García J. & Picazzo, J. (1996). Microbiología Médica. Edit. Mosby/Doyma Libros, S.A. España. 1262pp
- Huayra, J. (2008). Incidencia de *Escherichia coli* productora de betalactamasas de espectro extendido (BLEE) aislada de pacientes con infecciones del tracto urinario (ITU) Hospital Provincial "BELEN" de Lambayeque Septiembre 2007 – Marzo 2008. Tesis Lic. Biología – Microbiología y Parasitología. FFCCBB - UNPRG. 53p.
- Imaña, B., Mallea, A., & Carvajal, R. (1996). Estudio de la toxicidad de *Tropaeolum majus* como posible agente melanomodulador. Facultad de ciencias farmacéuticas y bioquímicas UMSA. Vol 6. 4pp.
- INS, (2007). Informes especiales. Resistencia a los antimicrobianos. Bol - InstNac. Salud 2007; 13 (11-12) Noviembre – Diciembre.
- Kinsbruy, D., Warner, G. & Seagel, G. (1991). Manual de Microbiología médica. Edit. Orientación S.A. España. 222pp
- Lizcano, A. & Vergara, J. (2007). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólico o aceites esenciales de las especies vegetales frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Trabajo de grado. Bogotá, D.C.
- Lykkesfeldt J. & Lindberg, B. (1993). Synthesis of Benzyl-glucosinolate in *Tropaeolum majus*. Plant Physiol. 102: 609-613pp.
- Murray, P., Baron, E., Tenover, J., & Tenover, M. (2007). Manual de Microbiología Clínica. ASM. Press Washington DC. Novena edición. ISBN Edición Original: 0-323-03303-2
- Nanzy, A. (2010). Monografía – *Tropaeolum majus*.
- OMS, (2007). Informe del taller interregional de la OMS sobre el uso de medicina tradicional en la atención primaria de salud.

- Sacsquispe, R. & Ventura, G. (2001). Manual de procedimientos bacteriológicos en infecciones intrahospitalarias. Ministerio de Salud. ISBN: 9972-357-11-5. 85pp.
- Salas, T. (2006). Resistencia de *Escherichia sp.* Aislada de pacientes ambulatorios con infecciones del tracto urinario (ITU) a ciprofloxacino, norfloxacino y trimetropin / sulfametoxazol. Hospital Regional PNP – Chiclayo Octubre 2005 – Abril 2006. Tesis Lic. Biología – Microbiología y Parasitología. FFCCBB - UNPRG. 58p.
- Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología clínica. (2000). Procedimientos en Microbiología Clínica. 90pp.
- Tucto-Succhil, S., Mercado-Martínez, P. & Hurtado-Escamilo, T. (2014). Resistencia Bacteriana según MIC 90 de *Escherichia coli* uropatógena aislada en el Laboratorio de Microbiología del Hospital II Chocope - EsSalud (Perú). REBIOLEST; Vol 2(1): e26
- Vásquez, L., Vásquez, G., Ecurra, J. & Aguirre, R. (2010). Plantas Medicinales del Norte de Perú. Lambayeque Perú. 382 pp.
- Zamora, C. & Ortiz, J. (2002). Etiología y resistencia bacteriana en infecciones urinarias bajas de pacientes ambulatorios. 4pp
- Zanetti, G., Manfron, M., Hoelzel, S., Pagliarin, V. & Morel, A. (2003). Toxicidad aguda e actividad antibacteriana dos extratos de *Tropaeolum majus L.* Acta Farm. Bonaerense 22(2):159-62.

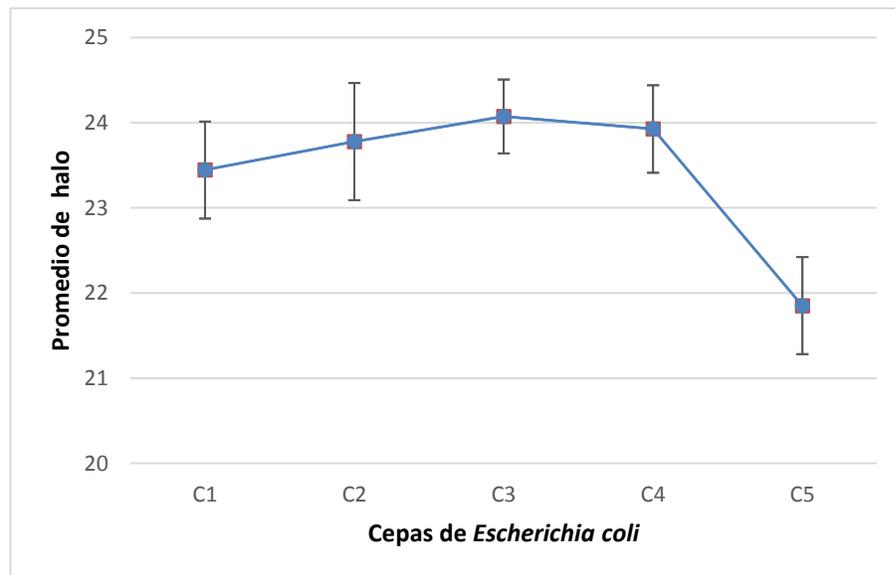
X. ANEXOS.

Anexo 1: Clasificación taxonómica de *Tropaeolum majus* “mastuerzo”

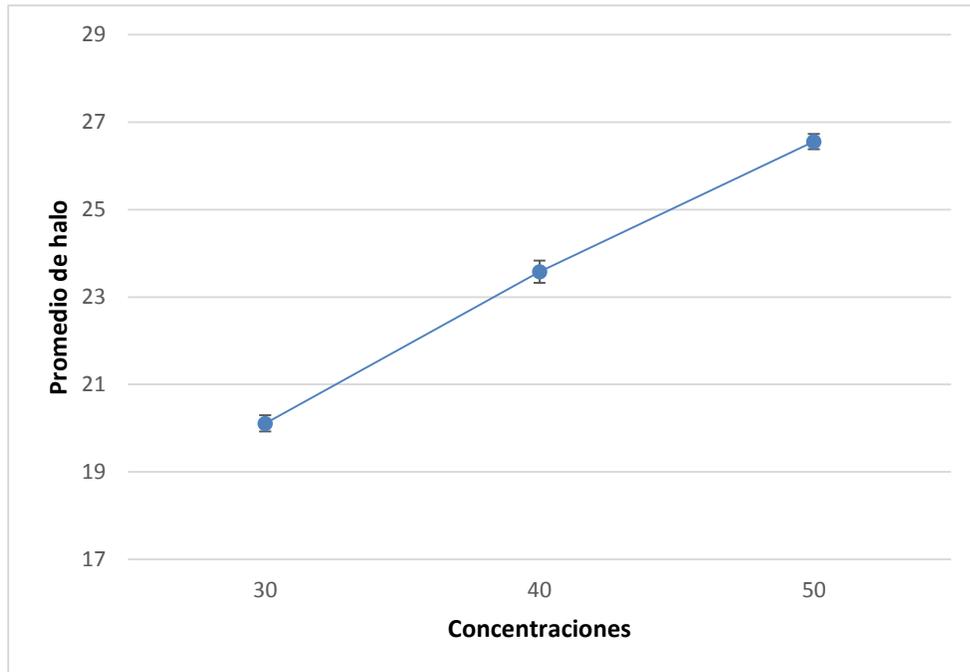
- ✓ Reino: *Plantae*
- ✓ División: *Magnoliophyta*
- ✓ Clase: *Magnoliopsida*
- ✓ Orden: *Brassicales*
- ✓ Familia: *Tropaeolaceae*
- ✓ Genero: *Tropaeolum*
- ✓ Especie: *Tropaeolum majus L.*



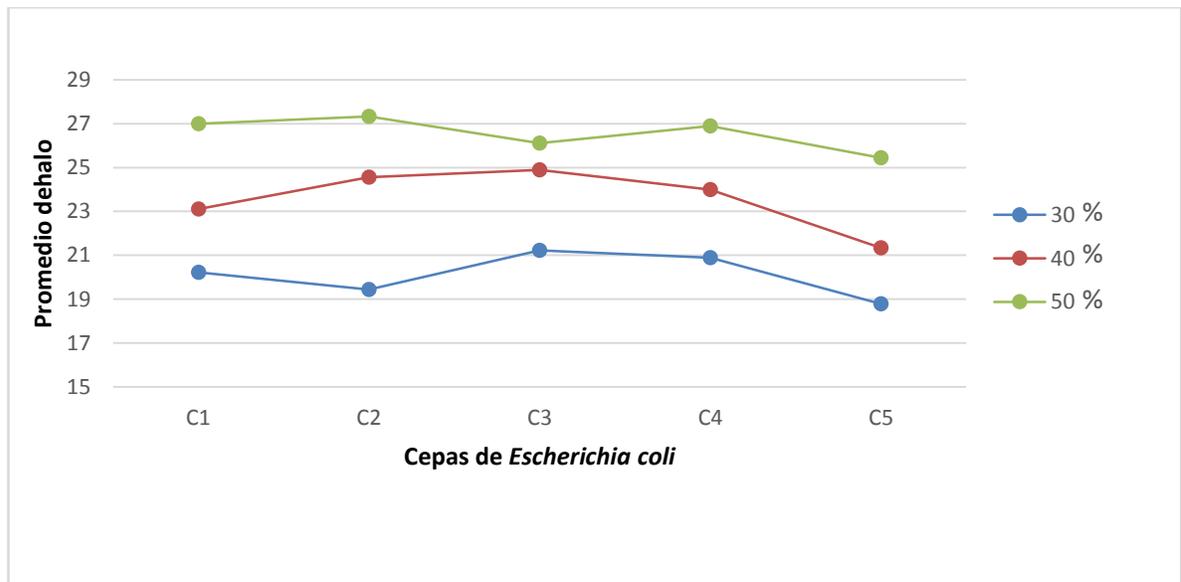
Anexo 2: Promedio de halo de inhibición de *Escherichia coli* por el efecto del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo”



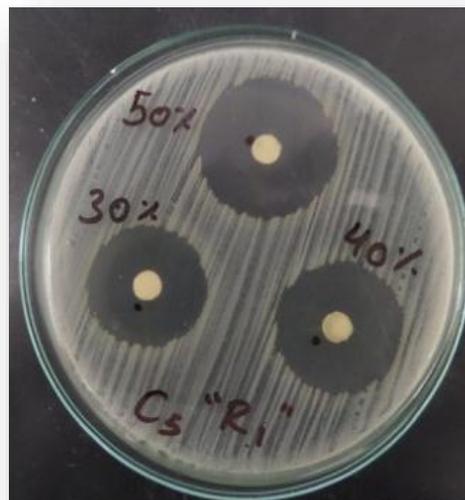
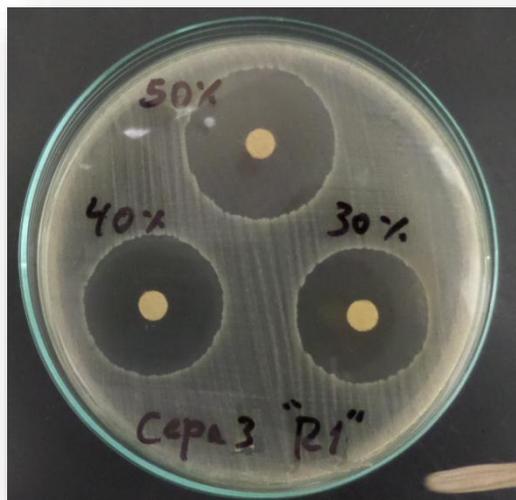
Anexo 3: Promedio de halos de *Escherichia coli* segun las concentraciones del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo”.



Anexo 4: Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanolico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” Sobre *Escherichia coli* según las concentraciones y cepas.



Anexo 5: Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanolico de *Tropaeolum majus* "mastuerzo" sobre *Escherichia coli*.



Anexo 6: Entrevista a los pacientes con sintomatología de infección urinaria.

Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” sobre *Escherichia coli* aislada de pacientes con Infecciones del Tracto Urinario.

ENTREVISTA DE PACIENTES

NOMBRE:

EDAD:

FECHA: 09 /11 /15

1. ¿Tiene más de 5 días con síntomas de dolor al miccionar?

Si No

2. ¿Dolor de espalda?

Si No

3. ¿Siente ardor al orinar?

Si No

4. ¿Fiebre baja? (en algunas personas)

Si No

5. ¿síntomas mayores a 10 días?

Si No

6. ¿Dolor abdominal muy fuerte? (algunas veces)

Si No

7. ¿Primera Muestra recogida de la mañana? 6: 00 am. (aprox.)

Si No

8. ¿Ha sido diagnosticado con ITU?

Si No

9. ¿Alguna vez ha tomado un remedio casero preparado con plantas? ¿qué planta(s)?

	"SI" NOMBRE DE LA PLANTA(S)
<input type="checkbox"/> "NO"	➤
	➤
	➤

RESPONSABLES DE LA ENCUESTA:

- ESTRADA ROMERO JEAN ANTONY
- TENORIO PIZARRO ANTHONY EDDIE