



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto natural de *Rubus glaucus* “mora andina” sobre *Staphylococcus aureus* aislada del Hospital Regional Docente Las Mercedes, Chiclayo.

TESIS

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

Br. Romel Ivan Guevara Guerrero

LAMBAYEQUE, PERÚ

2018

Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto natural de *Rubus glaucus* “mora andina” sobre *Staphylococcus aureus* aislada del Hospital Regional Docente Las Mercedes, Chiclayo.

TESIS

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

APROBADA POR:

Lic. Mario C. Moreno Mantilla
PRESIDENTE

M.Sc. Consuelo Rojas Idrogo
SECRETARIA

Dra. Gianina Llontop Barandiarán
VOCAL

Dra. Martha A. Vergara Espinoza
PATROCINADORA

LAMBAYEQUE, PERÚ

2018

DEDICATORIA

Principalmente a Dios, por prestarme la vida y permitirme llegar a este momento tan importante de mi formación profesional, pues nada de lo que he logrado habría sido posible sin él.

“Porque de él, y por él, y para él, son todas las cosas. ¡A él sea la gloria por siempre! Amén. (Romanos 11:36).

A la memoria de mi amigo Alcides Maguel Peña Adrianzen, sin duda uno de los mejores alumnos que ha tenido la universidad. Con Alcides comenzó la idea de hacer investigación cuando apenas iniciábamos la carrera, con él también comencé este proyecto y me habría gustado compartir con él este final. Su muerte prematura marcó un punto de inflexión en mi vida, me hizo comprender de lo frágil que es la vida y de lo equivocados que estamos al pensar que no necesitamos a Dios. Vivimos postergándole hasta que hayamos satisfecho nuestro egoísmo, y no nos damos cuenta que estamos atrapados en nuestras ambiciones sin saber si nuestros ojos verán la luz de un nuevo día. “Escúchenme, ustedes, los que dicen:” Hoy o mañana iremos a la ciudad; allí nos quedaremos todo un año, y haremos buenos negocios y ganaremos mucho dinero.” ¿Cómo pueden hablar así, cuando ni siquiera saben lo que les va a suceder mañana? Su vida es como la niebla: aparece por un poco de tiempo, y luego desaparece. Mas bien deberían decir:” Si Dios quiere, viviremos y haremos esto o aquello.” Sin embargo, a ustedes les gusta hablar con orgullo, como si fueran dueños del futuro, y eso es muy malo”. (Santiago 4:13-16). Ahora bien, esto no se trata de dejar de luchar por nuestros sueños, personalmente me he esforzado para terminar esta tesis, sino de darle a Dios el lugar que se merece en nuestras vidas, doblegar nuestro ego y entender que su voluntad esta por encima de la nuestra.

A mis padres y hermanos, que siempre me animaron a culminar esta tesis y me guiaron en el camino de Dios.

Y a ti, mi corazón, mi fuerza, mi motivo, ese ser de luz, que hace que mis días sean maravillosos. Con esos ojitos tan lindos, con esa sonrisa tan dulce. Gracias por enseñarme que “a Dios no se le dice que no”, tú también eres parte de esto: Rocío.

A Dios y a todos ustedes que me condujeron hacia Dios

Todo cuanto he alcanzado en esta vida es por ti, oh Dios; todos los méritos son tuyos, te mereces todos los créditos, toda la gloria y toda la honra.

AGRADECIMIENTOS

A ti, Dios mío, por tus bendiciones, por tu gracia, por tus cuidados, por tu amor, en fin, creo que me faltaría espacio para agradecer todo lo que me has dado, gracias Dios por todo.

De manera muy especial a la Dra. Martha Espinoza Vergara, Asesora de tesis por aceptar realizar esta investigación bajo su asesoramiento, por haberme guiado con su experiencia y profesionalismo, por haberme formado como profesional e investigador y por haberme conducido a alcanzar esta meta.

A la Dra. Zully Montenegro Esquivel, al servicio técnico del Laboratorio de Microbiología de la FMV y al Laboratorio de Microbiología de la FCCBB, por su colaboración.

También a todos los docentes que han aportado en la realización de este trabajo, en especial a la Dra. Gianina Llontop Barandiarán, Msc. Consuelo Rojas Idrogo y Lic. Mario Moreno Mantilla quienes con sus correcciones han enriquecido la presente investigación.

A mi profesor, amigo y hermano Ph.D. Pedro Jorge Chimoy Effio por su enseñanza, consejos, motivación y sobre todo por encaminarme en la fascinante aventura de la Bioquímica y la Biología Molecular.

A mi madre por estar siempre conmigo, por haberme criado como un hombre de bien, pero sobre todo por su amor incondicional.

A mi padre porque a pesar de la distancia, siempre estuvo apoyándome.

A mis hermanos: Fernando, Nany, Miguel y Jorge por llenarme de alegría día tras día, porque han luchado a mi lado para lograr ser mejores cada día a pesar de las adversidades que se nos han presentado en el camino.

A mi tía Juanita, a quien quiero como a una madre, gracias por estar siempre dispuesta a apoyarme y escucharme desde que llegué a esta ciudad a formarme como profesional, y gracias por compartir momentos significativos conmigo.

No puedo dejar de agradecer a Rocío, que estuvo siempre apoyándome, sobre todo por ayudarme a culminar este trabajo.

A Juan Santos, por su compañía en el laboratorio, por su amistad y por su apoyo

INDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	3
III.	MATERIALES Y METODOLOGÍA	8
3.1.	POBLACIÓN Y MUESTRA.....	8
3.2.	MATERIAL BIOLÓGICO	8
3.3.	METODOLOGÍA	8
3.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE DATOS	12
IV.	RESULTADOS	13
V.	DISCUSIÓN	17
VI.	CONCLUSIONES.....	20
VII.	RECOMENDACIONES	21
VIII.	RESUMEN	22
IX.	REFERENCIAS	24
X.	ANEXOS	28

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> del extracto natural del fruto de <i>Rubus glaucus</i> (mora andina) a concentraciones del 50% y 75% sobre <i>S. aureus</i> (UFC/mL)	13
TABLA 2. Análisis de Varianza del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> del extracto natural de <i>Rubus glaucus</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	15
TABLA 3. Prueba de significancia de Tukey, de los promedios de UFC/mL de <i>S. aureus</i> sometida a diferentes concentraciones de extracto natural de <i>Rubus glaucus</i>	16
TABLA 4. Prueba de significancia de Tukey, de los promedios de UFC/mL de cepas de <i>S. aureus</i> sometidas a diferentes concentraciones de extracto natural de <i>Rubus glaucus</i>	16

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fruto de <i>Rubus glaucus</i> (mora andina) en diferentes estados de maduración.....	9
Figura 2. Extracto Extracción por prensado del jugo de mora de manera aséptica	10
Figura 3. Efecto inhibitorio <i>in vitro</i> del extracto natural del fruto de <i>Rubus glaucus</i> (mora andina) a concentraciones del 50% y 75% sobre <i>S. aureus</i> (UFC/mL).....	14

INDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Halos de inhibición del crecimiento (mm) de <i>S. aureus</i> frente a antibióticos comunes.....	28
Anexo 2. Antibiograma de las cepas de <i>S. aureus</i> frente a antibióticos de uso común.....	29
Anexo 3. Metodología utilizada por Aquino e Ynoñan (2011).....	30
Anexo 4. Botánica y descripción de la planta.....	31

I. INTRODUCCIÓN

El género *Rubus* está formado por plantas arbustivas como los rosales y a menudo se les llama zarzas, moras, frambuesas o zarzamoras, aunque esta última denominación se usa más para referirse a las especies que tienen hábitos trepadores. La especie escogida para esta investigación, *Rubus glaucus* (Anexo 4), conocida también como mora andina, mora de castilla o simplemente mora, como se le dice en nuestro medio, es utilizada, según pobladores que la consumen, para el tratamiento de infecciones respiratorias y urinarias, heridas en la boca y también como desinflamante. El conocimiento de las propiedades medicinales de esta planta como de muchas otras especies de plantas, ha sido adquirido de forma empírica y transmitido de generación en generación.

La mora andina, es una fruta muy apreciada por su exquisito sabor y aroma característico, es de un color rojo vinoso cuando está madura debido a la presencia de antocianinas, su demanda en el mercado se debe a su uso como saborizante y componente de alimentos dulces. Esta fruta, al igual que muchas otras especies del género *Rubus* contiene importantes cantidades de compuestos fenólicos y ácido ascórbico, además de una elevada acidez, lo que en conjunto reduce la incidencia de bacterias y confieren una cuantiosa actividad antioxidante (Ayala, Valenzuela & Bohórquez, 2013; Garzón, Riedl & Schwartz, 2009).

Por otro lado, *Staphylococcus aureus*, un patógeno importante en el ser humano, es agente etiológico de diversas patologías que van desde infecciones cutáneas hasta enfermedades sistémicas mortales (Gil, 2000); es responsable de múltiples infecciones nosocomiales y principal agente aislado de infecciones del torrente sanguíneo o septicemias (Chincha, Cornelio, Valverde & Acevedo, 2013); aun así esta bacteria grampositiva se encuentra en las superficies del cuerpo (piel y mucosas) aunque no necesariamente provocando enfermedad. Se dice que casi todas las personas presentarán algún tipo de infección por *S. aureus* durante su vida (Brooks, Carrooll, Butel, Morse, & Mietzener, 2011).

Una cepa determinada del *S. aureus* que ha tomado importancia debido a que ha desarrollado una resistencia a los antibióticos que se suelen utilizar para tratar las infecciones por estafilococos, se denomina *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) y desde su aparición ha sido un problema en entornos hospitalarios. Se estima que entre el 20 y 30% de la población general es portador asintomático de *S. aureus* y según estudios realizados en la región Lambayeque se podría decir que la quinta parte del personal de salud la presenta (Aguilar, Niño & Moreno, 2015; Arce-Gil & Asalde-Ramos, 2012).

En el Perú, los portadores nasales más frecuentes de *S. aureus* son los niños menores de once años, mientras que las infecciones por SARM están relacionados a los servicios de salud, al igual que en otras partes del mundo, no obstante ya se han reportado algunos casos de SARM adquiridos en la comunidad (SARM-AC) y teniendo en cuenta los reportes sobre infecciones graves de SARM-AC en países vecinos se vuelve urgente estar alerta ya que el principal reservorio se encuentra en la colonización de la mucosa nasal de personas y animales de la comunidad (Carmona, Sandoval & Garcia, 2012).

La aparición de SARM, ha sido favorecida por el uso indiscriminado de antibióticos, en este sentido es menester pues ser sensatos y utilizar en la medida que se pueda tratamientos alternativos como la medicina natural. Por ello se planteó la presente investigación cuyo objetivo es determinar el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto natural de *R. glaucus* sobre *S. aureus* aislada del Hospital Las Mercedes de Chiclayo. Contribuyendo así sobre el conocimiento de esta planta y fundamentando el hecho de su utilización para tratar diversas infecciones.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

La mayoría de las plantas medicinales presentan efectos fisiológicos múltiples, gracias a que poseen más de un compuesto activo, en general poseen una capacidad ilimitada de sintetizar compuestos y la mayoría están relacionados con el fenol y sus derivados. La mayoría son metabolitos secundarios, de los cuales al menos 12000 han sido aislados. En muchos casos estas sustancias sirven como mecanismos de defensa contra la depredación por microorganismos, insectos y herbívoros, aunque de acuerdo a su actividad antimicrobiana también destacan otros grupos como los terpenoides y aceites esenciales, los alcaloides, las lectinas y polipéptidos y los poliacetilenos (Cowan, 1999).

La mora andina o mora de castilla pertenece al género *Rubus*, es una planta trepadora, que crece en las regiones andinas de Sudamérica, donde se aprovecha como fruto comestible y también como planta medicinal (Figura 1). Se ha determinado que el fruto posee cantidades importantes de compuestos fenólicos, ácido ascórbico y gran capacidad antioxidante que incluso supera a la del butilhidroxitolueno (E-321) y el alfa-tocoferol (E-320) si se extrae bajo condiciones óptimas (Garzón *et al.*, 2009; Mertz, Cheynier, Günata & Brat, 2007; Rojas-Llanes, Martínez & Stashenko, 2014). Entre los compuestos fenólicos de importancia que posee destacan las antocianinas (cianidina-3-glucósido) con una concentración que puede llegar a 1.478 g/Kg. de pulpa (Ramírez, Neira & Correa, 2007) y los elagitaninos, una clase de taninos con una amplia actividad antimicrobiana (Scalbert, 1991).

Los extractos del género *Rubus* se han utilizado tradicionalmente con propósitos terapéuticos. Sus hojas, por ejemplo, han sido usadas por sus propiedades astringentes, antidiarreicos, antiinflamatorios e hipoglicémicos, entre otras, aunque son mejor conocidas para tratar la fiebre, influenza, diabetes, dolor menstrual, diarrea y cólicos. Mientras que su fruto es considerado un alimento nutritivo y saludable debido a su alto contenido de antioxidantes como compuestos fenólicos, vitamina C, carotenoides, etc. Estos antioxidantes juegan un rol

importante inhibiendo y eliminando los radicales libres, proporcionando así protección contra infecciones y enfermedades degenerativas como el cáncer (Grabek-Lejko & Wojtowicz, 2014).

La actividad antibacteriana del género *Rubus* fue evidenciada en la especie *Rubus pinfaensis* y desde entonces se ha estudiado el efecto inhibitorio de muchas especies del género (Soto-Huamaní, 2014). Así se tiene que, los extractos metanólicos de las hojas, raíz, tallo y fruto de *R. fruticosus* tienen la misma concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a *S. aureus*, 20 µg/dL, mientras que la CMI de la amoxicilina y ampicilina es 10 µg/dL y 60 µg/dL respectivamente. En comparación con otras bacterias donde la CMI para el fruto de esta planta es: 1000 µg/dL para *E. coli* y *S. typhi*; 2000 µg/dL para *P. mirabilis*. Por lo tanto *S. aureus* es uno de los microorganismos que es más susceptible a los extractos metanólicos del fruto de *R. fruticosus* que otras bacterias (Riaz, Ahmad, & Rahman, 2011).

Diversos extractos de *R. idaeus* inhiben a bacterias como *E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cereus* y *L. monocytogenes* (Velićanski, Cvetković, & Markov, 2012), mientras que los ácidos elágicos de *R. ulmifolius* impiden la formación de biofilm de *S. aureus* mejorando la respuesta a antibióticos como daptomicina, clindamicina y oxacilina (Quave *et al.*, 2012). Además, existen diferencias entre sus propiedades antioxidantes y antibacteriales, así *R. plicatus* tiene mayor efecto antioxidante que *R. idaeus* aunque similares propiedades antibacterianas contra *S. aureus* obteniéndose una concentración en términos de densidad óptica (OD₆₀₀) de 0.2 tras una incubación de 24 horas con cualquiera de los dos extractos, contra el control (sin extracto) que alcanzó una OD₆₀₀ = 1.0. (Grabek-Lejko & Wojtowicz, 2014).

Es probable que la actividad del género *Rubus* se atribuya a la presencia de compuestos fenólicos, aunque no todas las especies poseen las mismas concentraciones de estos principios activos; algunas como *Rubus idaeus* 'Poranna Rosa' no posee antocianinas sin embargo, si posee actividad antibacteriana, esto

debido probablemente al alto contenido de ácidos elagitaninos presentes en sus frutos (Krauze-Baranowska et al., 2014). De este modo algunas especies de moras presentarán una actividad selectiva sobre las bacterias.

Los ácidos elágicos y sus derivados (220D-F2) pueden limitar la formación de biofilm a tal grado que puede estar relacionado con el incremento de la susceptibilidad antibiótica de algunos microorganismos como *S. aureus*, a concentraciones que no producen daño en las células humanas. De esta manera un tratamiento combinado de antibióticos y ácidos elágicos puede mejorar notablemente la cura (Quave et al., 2012). Los ácidos elágicos están presentes en las plantas como elagitaninos solubles e insolubles. Es pues también importante el modo de extracción a la hora de obtener un compuesto u otro ya que no todos los compuestos presentan las mismas propiedades de solubilidad.

Como bien se sabe los compuestos antibacterianos no solo provienen de las plantas, la penicilina, por ejemplo, descubierta en 1928 por Alexander Fleming, demostró inicialmente una alta efectividad contra las infecciones estafilocócicas. La acción de esta sustancia y en general de los betalactámicos se basa en la unión a la enzima bacteriana transpeptidasa denominada PBP (Penicilin Binding Protein) bloqueando la etapa final de la síntesis del peptidoglicano, importante estructura bacteriana. Como respuesta a los betalactámicos las bacterias sintetizan la enzima betalactamasa que hidroliza el núcleo betalactámico evitando la unión a las PBP, por ende, confiriéndoles resistencia.

La historia evolutiva de los cambios en la resistencia de *S. aureus*, se inicia en la década del 40 pero no es hasta 1959 donde se empieza a utilizar la metilicina, penicilina semisintética resistente a las betalactamasas, sin embargo, poco tiempo después surgieron las cepas SARM, cuyo mecanismo de resistencia se basa en la producción de una proteína de unión a la penicilina adicional (PBP2a), que es completamente funcional y no tiene afinidad por los antibióticos betalactámicos (Luján, 2013). Hoy en día la resistencia a la penicilina por *S. aureus* se sitúa

alrededor del 90%, en cambio la resistencia a la meticilina es variable, por ejemplo en países europeos se tienen porcentajes elevados como 58% en Italia y 54% en Portugal, mientras que en Japón se tiene un 70%. Por otro lado en países escandinavos el porcentaje es muy bajo, alrededor del 1% (Bustos-Martínez, Hamdan-Partida, & Gutiérrez-Cárdenas, 2006).

Los compuestos fenólicos son fundamentales al reducir el riesgo de algunas enfermedades, pues se ha determinado que inhiben más a SARM que a *S. aureus* sensible a la meticilina (SASM) además, estudios de acoplamiento molecular (docking) proporcionan evidencia de que la presencia de ácido carboxílico (COOH), dos grupos hidroxilos (OH) en las posiciones *para* y *orto* del anillo benceno y además el grupo metoxilo (OCH₃) en la posición *meta* parece ser importante para su actividad anti-SARM debido a que interactúan con PBP2a y por consiguiente anulan su actividad transpeptidasa necesaria para la síntesis de la pared celular bacteriana. Aunque es un estudio *in silico* ayuda a fundamentar el hecho por el cual los compuestos fenólicos son más eficaces contra las cepas SARM (Alves *et al.*, 2013).

Los estudios realizados sobre las propiedades de las plantas no solo implican a *S. aureus*, sin embargo, hoy en día sigue siendo una de las causas más frecuentes de infección tanto en el medio hospitalario como en la comunidad, además su resistencia a la meticilina a lo largo de los años avanza a un ritmo alarmante (Picazo *et al.*, 2011). En el año 2010 un estudio realizado en Lima Metropolitana mostró una prevalencia de SARM del 58% de los cuales el 5,6% fueron identificadas como adquiridas en la comunidad. (Tamariz *et al.*, 2010). Además, hace poco la Organización Mundial de la Salud ha hecho público una lista de 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana con el objetivo de incentivar la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos para combatir las. *S. aureus* se encuentra en esta lista y está clasificado como prioridad 2 o elevada (OMS, 2017).

En el caso de los medios hospitalarios, un estudio realizado en 2009 en 35 trabajadores del centro integral de salud de la USAT- Chiclayo se aislaron 8 cepas de *S. aureus*, de los cuales el 100% fue sensible a meticilina (Arce-Gil & Asalde-Ramos, 2012). En el mismo año, en el Hospital Belén de Lambayeque, se tomaron hisopados nasofaríngeos de 70 trabajadores en salud, encontrándose 13 cepas de *S. aureus* de las cuales ninguna fue resistente a oxacilina (Aguilar *et al.*, 2015). Aunque es importante tener en cuenta que los grados de resistencia pueden variar mucho dependiendo de hospital, ciudad o nación (Zampini, Cudmani & Isla, 2007).

En 2014 Soto-Huamaní, con el objetivo de obtener un gel de limpieza con características antibacterianas, obtuvo inhibición del extracto acuoso de *R. glaucus* sobre *S. aureus* con halos de 14 mm y 16.6 mm para concentraciones de 100 mg/mL y 200 mg/mL. Mientras que para extracto etanólico de esta fruta obtuvo halos de 12.3 mm, 14.6 mm, 18 mm y 20.3 mm para concentraciones de 25 mg/mL, 50 mg/mL, 100 mg/mL y 200 mg/mL respectivamente. Esta fruta no solo presentó inhibición sobre *S. aureus*, sino también sobre especies como *E coli* y *P. aeruginosa* tanto en extracto acuoso como etanólico.

III. MATERIALES Y METODOLOGÍA

3.1. POBLACIÓN Y MUESTRA

La población estuvo representada por cepas de *Staphylococcus aureus*, aisladas de pacientes del Hospital Regional Docente Las Mercedes de Chiclayo.

La muestra estuvo constituida por 6 unidades, resultado de la interacción de 3 cepas de *S. aureus* y 2 concentraciones de extracto del fruto de *R. glaucus* (no incluye el control); considerando las tres repeticiones para cada experimento se obtuvieron 18 unidades experimentales.

3.2. MATERIAL BIOLÓGICO

Frutos de mora andina (*R. glaucus*) procedentes del departamento de Cajamarca.

Cepas de *S. aureus* procedentes del banco de cepas del Hospital Regional Docente Las Mercedes de Chiclayo (Anexo 1 y Anexo 2).

Staphylococcus aureus resistente a oxacilina 1 (S1)

Staphylococcus aureus resistente a oxacilina 2 (S2)

Staphylococcus aureus sensible a oxacilina 3 (S3)

3.3. METODOLOGÍA

A. Determinación del efecto inhibitorio *in vitro* de extracto natural del fruto de *R. glaucus* sobre *S. aureus*.

- Tratamiento del fruto

Los frutos de *R. glaucus* fueron recolectados en grado de madurez 5 (Ayala *et al.*, 2013), en el distrito de Huambos perteneciente a la Provincia de Chota ubicada en el Departamento de Cajamarca. Los frutos fueron recolectados en frascos de vidrio previamente esterilizados y transportados hasta las instalaciones de la

Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo y almacenados en refrigeración para su posterior utilización.



Figura 1. Fruto de *Rubus glaucus* en diferentes estados de maduración (Las flechas muestran los frutos en estado de maduración utilizados en el presente estudio)

- **Obtención del extracto natural**

Para la obtención del extracto se tomaron 200 gramos de frutos, los cuales fueron lavados con hipoclorito al 0,01% y enjuagados con agua destilada esterilizada tres veces con el fin de remover el exceso de cloro. Luego con la ayuda de un exprimidor de fruta se procedió a comprimir de tal manera que el jugo fue extraído de la pulpa y almacenado en refrigeración en un matraz esterilizado hasta su posterior utilización (Figura 2).



Figura 2. Extracción por prensado del jugo de mora de manera aséptica.

- **Obtención del inóculo**

A partir de un cultivo bacteriano de 18 a 24 horas se seleccionaron 4 colonias iguales y se suspendieron en solución salina fisiológica esterilizada hasta alcanzar una concentración equivalente al estándar 0,5 de McFarland (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL), y a continuación se hicieron cuatro diluciones seriadas (1:10) hasta obtener una concentración aproximada de $1,5 \times 10^4$ UFC/mL (concentración de trabajo).

- **Determinación del efecto inhibitorio *in vitro* del extracto natural del fruto de *Rubus glaucus* (mora andina) a concentraciones del 50% y 75% sobre *S. aureus*.**

El procedimiento que se utilizó para determinar el efecto inhibitorio es una modificación de la metodología usada por Aquino e Ynoñan 2011 (Anexo 3). Se colocó 0,5 mL de inóculo (concentración $1,5 \times 10^4$) a cada uno de los 27 tubos de ensayo (teniendo en cuenta que son 3 cepas se prepararon 3 suspensiones) y posteriormente se agregó 1,5 mL de solución salina fisiológica esterilizada a la primera batería de 9 tubos, estos fueron el grupo control (T_0).

A la segunda batería de 9 tubos se añadió 0,5 mL de solución salina fisiológica esterilizada y 1 mL de extracto, estos fueron la concentración 50% (T_1). A los 9 tubos restantes se añadió 1,5 mL de extracto, estos fueron la concentración 75% (T_2). De

este modo el volumen total en cada tubo fue de 2 mL y cada tubo con una concentración final de inóculo de 2.5×10^3 UFC/mL. Se incubaron por 30 minutos a una temperatura de 37°C, agitando suavemente cada cierto tiempo para su homogenización.

- **Determinación del número de UFC/mL: recuento en placa: Método de siembra en superficie.**

Se utilizaron placas previamente preparadas conteniendo 15mL de agar Müller Hinton solidificado. Cumplidos 30 minutos de exposición del inóculo al extracto se tomó una alícuota de 0.1 mL de cada tubo y se depositó sobre la superficie del agar de cada placa (una placa para cada tubo) y rápidamente se procedió a extender la alícuota con la ayuda de una espátula Drigalsky esterilizada. Después las placas fueron incubadas en forma invertida a una temperatura de 37°C durante 24 horas en aerobiosis.

3.4. ANALISIS ESTADÍSTICO DE DATOS

El presente trabajo correspondió al diseño de contrastación de hipótesis de estímulo creciente o grados de manipulación de la variable en este caso tres grupos, un grupo control con ausencia de estímulo, y dos grupos experimentales con dos concentraciones de estímulo (Goode & Hatt, 1986; Hernández, Fernández, & Baptista, 2006).

Los datos fueron organizados en tablas y procesados mediante el software estadístico Minitab® 18.1 (versión de prueba). Para contrastar la hipótesis estadística los datos obtenidos fueron transformados (raíz cuadrada por tratarse de datos obtenidos por conteo) y sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los tres tratamientos (T_0 ; T_1 ; T_2). La hipótesis contrastada fue:

$$H_0: \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 \quad \text{vs} \quad H_1: \mu_i \neq \mu_j$$

Es decir, se contrastó el hecho de que las medias de los tratamientos son iguales (la variación se atribuye al azar) frente a la alternativa de que al menos dos de ellas son diferentes debido al extracto (Navidi, 2006).

Además, se realizó la prueba de Tukey con una significancia del 0.05 para comparar la diferencia entre medias.

IV. RESULTADOS

4.1 Obtención del extracto

A partir de 200 gramos de fruta se obtuvieron aproximadamente 120 mL de extracto natural.

4.2 Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto natural del fruto de *Rubus glaucus* (mora andina) a concentraciones del 50% y 75% sobre *S. aureus*.

La carga bacteriana disminuyó a tal punto que no se aprecian UFC en las placas para los casos de las cepas resistentes a oxacilina a concentraciones de 50% y 75% de extracto, sin embargo, los resultados son un poco distintos para el caso de la cepa sensible a oxacilina pues en estas placas si se aprecian UFC en las concentraciones de 50% y 75% aunque en menor cantidad que el control (Tabla 1 y Figura 3).

Tabla 1

Efecto inhibitorio in vitro del extracto natural del fruto de Rubus glaucus (mora andina) a concentraciones del 50% y 75% sobre S. aureus (UFC/mL).

<i>S. aureus</i>	Extracto de <i>R. glaucus</i>	Repeticiones UFC/mL			Promedio
		R1	R2	R3	
S1	0%	520	240	200	320±174
	50%	0	0	0	0
	75%	0	0	0	0
S2	0%	160	160	360	227±115
	50%	0	0	0	0
	75%	0	0	0	0
S3	0%	720	300	740	586±248
	50%	50	20	20	30±17
	75%	70	10	60	47±32

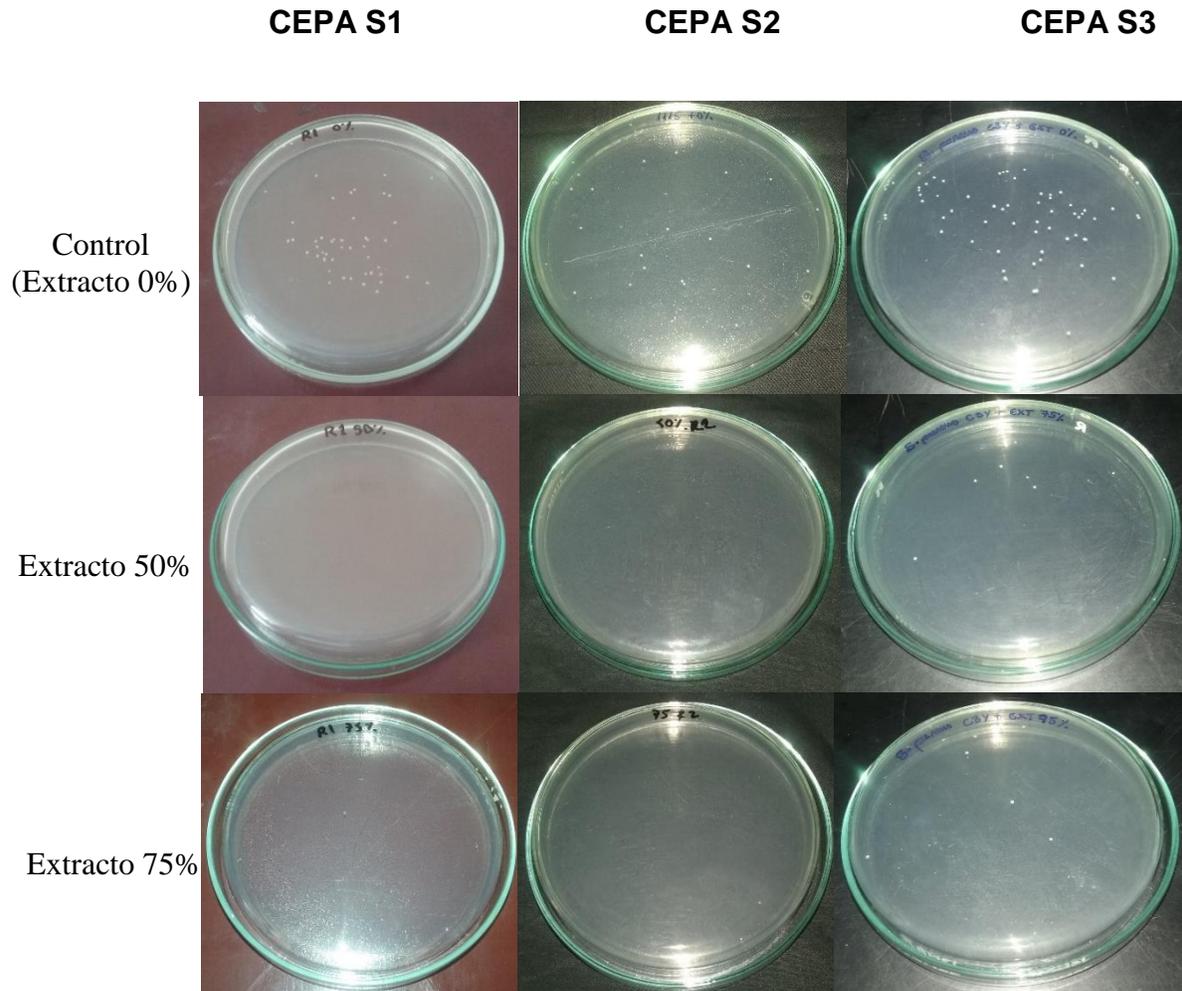


Figura 3. Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto natural del fruto de *Rubus glaucus* (mora andina) a concentraciones del 50% y 75% sobre *S. aureus* (UFC/mL). Después de 24h de incubación a 37°C.

4.3 Análisis de Varianza (ANOVA) del efecto inhibitorio *in vitro* del extracto natural de *Rubus glaucus* frente a *Staphylococcus aureus*, en relación con las concentraciones, tipo de cepa y sus interacciones

El análisis de varianza (ANOVA) realizado a los resultados (Tabla 2) muestra que existen diferencias significativas entre las medias del número de UFC/mL (concentración) para los tratamientos con un p-valor de 0.000. También existen diferencias significativas para las cepas, mientras que para la interacción cepa y tratamiento no existen diferencias significativas. Estos resultados permiten deducir que el tratamiento (extracto) inhibe a las cepas de *S. aureus* sin embargo dichas cepas no presentan el mismo comportamiento frente al extracto.

Tabla 2

Análisis de Varianza del efecto inhibitorio in vitro del extracto natural de Rubus glaucus frente a Staphylococcus aureus.

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p	Decisión
CEPA	2	255.40	127.701	14.97	0.000	Rechazar H ₀₁
TRATAMIENTO	2	1676.62	838.309	98.29	0.000	Rechazar H ₀₂
CEPA*TRATAMIENTO	4	12.84	3.210	0.38	0.822	Aceptar H ₀₃
Error	18	153.52	8.529			
Total	26	2098.38				

Hipótesis:

$$H_{01}: S1 = S1 = S3$$

$$H_{02}: T0 = T50 = T75$$

*H₀₃: Todas las interacciones cepa*tratamiento tienen el mismo efecto sobre la concentración bacteriana (UFC/mL).*

De manera complementaria se realizaron comparaciones con la prueba de Tukey. Este análisis muestra que en cuanto a la comparación entre cepas se puede observar (Tabla 3) que la cepa S3, la cual es sensible a oxacilina, es más resistente al extracto (promedio de UFC/mL de 11.8496) que las cepas S1 y S2 las cuales son resistentes a oxacilina, pero más sensibles al extracto (promedio de UFC/mL de 5.8264 y 4.9191 respectivamente).

Tabla 3

Prueba de significancia de Tukey, de los promedios de UFC/mL de cepas de S. aureus sometidas a diferentes concentraciones de extracto natural de Rubus glaucus.

CEPA	N	Media	Agrupación
S3	9	11.8496	A
S1	9	5.8264	B
S2	9	4.9191	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

En cuanto al tratamiento no existen diferencias significativas entre las concentraciones de 50% y 75%, ya que se encuentran en el mismo grupo. Es decir que las cepas presentan el mismo grado de inhibición tanto a una concentración de 50% como de 75% (Tabla 4).

Tabla 4

Prueba de significancia de Tukey, de los promedios de UFC/mL de S. aureus sometida a diferentes concentraciones de extracto natural de Rubus glaucus.

TRATAMIENTO	N	Media	Agrupación
T0	9	18.6740	A
T75	9	2.1416	B
T50	9	1.7795	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

V. DISCUSIÓN

La presente investigación demostró que el extracto natural del fruto de *Rubus glaucus*, a diferentes concentraciones, tiene efecto inhibitorio *in vitro* frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de pacientes de Hospital Regional Docente Las Mercedes. Dicho efecto inhibitorio es independiente de las concentraciones de extracto utilizadas (50% y 75%) pero dependiente de las cepas de *Staphylococcus aureus*.

Para obtener el control de cada cepa se partió de una suspensión estándar sin embargo la variabilidad entre cepas, la poca sensibilidad de la nefelometría al comparar con la vista explicaría el hecho de haberse obtenido en los controles de las cepas S1, S2 y S3 valores diferentes: 320 ± 174.4 , 226 ± 115.5 y 587 ± 248.5 UFC/mL respectivamente. Además, si nos detenemos a analizar las desviaciones estándar, los valores de la cepa S1 fluctúan entre 146 y 494 UFC/mL, para la cepa S2 tenemos un rango de 111 a 342 UFC/mL y para la cepa S3 los valores están entre 339 y 836 UFC/mL, las tres cepas tienen un rango pequeño de solapamiento; por ejemplo, el valor de 340 UFC/mL se encuentra dentro del rango de las tres cepas.

Este efecto inhibitorio de *R. glaucus* no se puede atribuir a un solo compuesto o principio activo, sino más bien a la acción conjunta de varias moléculas, ya que como más de un investigador ha determinado esta especie contiene compuestos fenólicos con propiedades antibacterianas como: elagitaninos, ácidos elágicos, flavonoides, etc. (Garzón *et al.*, 2009; Rojas-Llanes *et al.*, 2014). Los mecanismos responsables de la toxicidad de los compuestos fenólicos contra los microorganismos son variados, la capacidad antimicrobiana de los fenoles simples, por ejemplo, principalmente los altamente oxidados, incluyen inhibición enzimática, posiblemente mediante reacción con grupos sulfhídricos o a través de interacciones no específicas con las proteínas bacterianas. Las quinonas en cambio se unen de manera irreversible a aminoácidos nucleofílicos de proteínas, ocasionando la pérdida de su función, un objetivo probable de estos compuestos en la célula

microbiana son las adhesinas expuestas en la superficie de la célula. Los flavonoides se unen a proteínas extracelulares y solubles de manera similar a las quinonas, aunque su principal característica radica en su habilidad para desestabilizar membranas (Cowan, 1999).

De acuerdo con los resultados obtenidos se determinó que existe una actividad antibacteriana del extracto natural de *R. glaucus* frente a *S. aureus*, esto concuerda con los resultados obtenidos por Soto-Huamani en 2014, el cual, si bien no obtuvo una actividad antibacteriana significativa con los extractos acuosos del fruto de *R. glaucus*, en cambio sí lo hizo con los extractos alcohólicos, obteniendo una inhibición significativa (halos >18mm) frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25933, *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. En su trabajo aclara que la actividad antibacteriana va a depender de los componentes activos presentes en la muestra (en este caso la mora andina) y del solvente utilizado para la obtención del extracto.

También se observó que si bien es cierto hay un efecto antibacteriano del extracto natural de *R. glaucus* sobre *S. aureus*, este efecto no es directamente proporcional a su concentración, esto se debe a que la concentración mínima inhibitoria se encuentra a una concentración menor que 50%, entonces, si ya no hay crecimiento de UFC/mL al 50%, tampoco lo habrá al 75%, probablemente si se hubieran escogido más concentraciones entre 0% y 50% se habría apreciado una mayor inhibición del crecimiento del microorganismo utilizado conforme se incrementa la concentración.

En relación con lo anteriormente expuesto, se difiere con los resultados de Soto-Huamani (2014) quien determinó que a mayor concentración de extracto acuoso y de extracto etanólico de *R. glaucus*, mayor halo de inhibición de *S. aureus*; posiblemente la diferencia se deba a las características propias de las cepas, ya que como se ha evidenciado en la presente investigación la respuesta del efecto del producto sobre la cepa sensible a oxacilina es menor que el efecto sobre la cepas

resistentes a oxacilina, sugiriéndose que las envolturas bacterianas como glucoconjugado, peptidoglucano y membrana celular influyen en el ingreso del extracto de *R. glaucus* al citoplasma de *S. aureus*.

Otro punto importante que se pone en evidencia es el hecho de que las cepas resistentes a la oxacilina (S1 y S2), son a la vez las más sensibles al extracto natural de *R. glaucus* mientras que la cepa sensible a oxacilina (S3), es la que presenta menor inhibición frente al extracto utilizado, una observación que concuerda con el estudiado por Alves *et al.*, 2013 quienes realizaron un análisis de relación estructura-actividad (SAR) y acoplamiento molecular para determinar (mediante predicción *in silico*) la influencia de la estructura de los compuestos fenólicos en la inhibición bacteriana de SARM. Como muy bien se conoce la resistencia de SARM se debe a producción de la proteína PBP2a, la cual es inhibida al interactuar con algunos compuestos fenólicos tales como el ácido 2,4 dihidroxibenzoico, ácido siríngico y ácido vanílico entre otros. Estos compuestos están presentes en muchas especies de *Rubus*, lo que explica porque afectan más a las cepas SARM que a las cepas SASM las cuales no poseen la PBP2a (Kaume *et al.*, 2012).

VI. CONCLUSIONES

- 1 El extracto natural del fruto de *Rubus glaucus* “mora andina” tiene efecto inhibitorio sobre cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de pacientes del Hospital Regional Docente Las Mercedes – Chiclayo, sin diferencia significativa entre las dos concentraciones de extracto utilizadas.
- 2 *S. aureus* resistente a oxacilina fue inhibida completamente (0 UFC/mL) por el extracto natural de *R. glaucus* al 50 y 75% de concentración, mientras que *S. aureus* sensible a oxacilina fue más resistente, su carga bacteriana fue de 30 UFC/mL y 47 UFC/mL luego de ser expuesta al extracto natural de *R. glaucus* a concentraciones del 50% y 75% respectivamente.

VII. RECOMENDACIONES

Realizar estudios sobre el efecto inhibitorio de esta planta combinada con antibióticos en cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina.

Evaluar el efecto inhibitorio de esta planta frente a otras especies bacterianas de interés médico.

Estudiar la toxicidad de esta planta y determinar la concentración mínima inhibitoria, tanto para *S. aureus* como para otras especies.

VIII. RESUMEN

El presente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto inhibitorio *in vitro* del extracto natural del fruto de *Rubus glaucus* sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* aislada de pacientes del Hospital Regional Docente Las Mercedes de Chiclayo. Los frutos fueron obtenidos del distrito de Huambos provincia de Chota, 2400 m.s.n.m. La muestra estuvo constituida por 9 unidades; 3 cepas bacterianas sometidas a 3 concentraciones incluyendo el control (0%, 50% y 75%), considerando 3 repeticiones por experiencia se realizaron 27 unidades experimentales. Para determinar el efecto inhibitorio se utilizó el método de dilución modificado por Aquino e Ynoñan (2011). El diseño de investigación fue de estímulo creciente. Se concluye que el extracto natural del fruto de *Rubus glaucus* “mora andina” tiene efecto inhibitorio sobre cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de pacientes del Hospital Regional Docente Las Mercedes – Chiclayo, sin diferencia significativa entre las dos concentraciones de extracto utilizadas y que *S. aureus* resistente a oxacilina fue inhibida completamente (0 UFC/mL) por el extracto natural de *R. glaucus* al 50 y 75% de concentración, mientras que *S. aureus* sensible a oxacilina fue más resistente, su carga bacteriana fue de 30 UFC/mL y 47 UFC/mL luego de ser expuesta al extracto natural de *R. glaucus* a concentraciones del 50% y 75% respectivamente.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine the *in vitro* inhibitory effect of *Rubus glaucus* fruit natural extract to the growth of *Staphylococcus aureus* isolated from patients of the Hospital Regional Docente Las Mercedes of Chiclayo. The fruits were collected from the Huambos district of Chota province, 2400 m.a.s.l. The sample consisted of 9 units; 3 bacterial strains exposed to 3 concentrations including control (0%, 50% y 75%), considering 3 repetitions by experience, 27 experimental units were performed. To determine the inhibitory effect, the dilution method modified by Aquino and Ynoñan (2011) was used. The research design was of increasing stimulus. The „results show absence of growth in oxacillin-resistant *S. aureus* strains subjected to concentrations of 50 and 75% of the natural extract of *R. glaucus*, whereas in sensitive-oxacillin *S. aureus* concentrations of 30 CFU/mL and 47 CFU/mL were obtained after being exposed to the natural extract of *R. glaucus* at concentrations of 50% and 75% respectively. It is concluded that the natural extract of the fruit of *Rubus glaucus* "mora andina" has an inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients of the Hospital Regional Docente Las Mercedes of Chiclayo, no significant difference between the two concentrations of extract used.

IX. REFERENCIAS

- Afif Chaouche, T., Bendahou, M., & Arab, K. (2015). Antibacterial activity of two extracts from *Rubus fruticosus* L. against resistant pathogens and their antioxidant potential. *African Journal of Microbiology Research*, 9(18), 1255–1262. <https://doi.org/10.5897/AJMR2015.7437>
- Aguilar Gamboa, F. R., Niño Valiente, J., & Moreno Mantilla, M. (2015). Portadores nasofaríngeos de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* en personal de salud del Hospital Provincial Docente Belén de Lambayeque. *Revista Experiencia En Medicina*, 1(2), 46–50.
- Alves, M. J., Ferreira, I. C. F. R., Froufe, H. J. C., Abreu, R. M. V, Martins, A., & Pintado, M. (2013). Antimicrobial activity of phenolic compounds identified in wild mushrooms , SAR analysis and docking studies. *Journal of Applied Microbiology*, 115(2), 346–57. <https://doi.org/10.1111/jam.12196>
- Aquino Flores, J. C., & Ynoñan Morales, M. A. (2011). *Efecto inhibitorio in vitro del extracto natural de Crescentia kujete “Totumo” sobre Staphylococcus aureus resistente y sensible a oxacilina* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.
- Arce-Gil, Z., & Asalde-Ramos, R. (2012). *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en trabajadores del centro integral de salud de la Universidad Católica Santo Toribio de Mogrovejo- Chiclayo 2009. *Revista Cuerpo Medico Del HNAAA*, 5(1), 33–35.
- Ayala, L. C., Valenzuela, C. P., & Bohórquez, Y. (2013). Caracterización fisicoquímica de mora de castilla (*Rubus glaucus benth*) en seis estados de madurez. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 11(2), 10–18.
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., & Mietzner, T. A. (2011). *Microbiología médica*. (Jawetz, Melnick, & Adelberg, Eds.) (25a. Ed). México: McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Bustos-Martínez, J. A., Hamdan-Partida, A., & Gutiérrez-Cárdenas, M. (2006). *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. *Revista Biomédica*, 17(4), 287–305.

- Carmona, E., Sandoval, S., & Garcia, C. (2012). Frecuencia y susceptibilidad antibiótica del *Staphylococcus aureus* proveniente de hisopados nasales en una población urbano marginal de Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública*, 29(2), 206–211.
- Chincha, O., Cornelio, E., Valverde, V., & Acevedo, M. (2013). Infecciones intrahospitalarias asociadas a dispositivos invasivos en unidades de cuidados intensivos de un hospital nacional de Lima, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental Y Salud Pública*, 30(4), 616–620.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(4), 564–82.
- Garzón, G. A., Riedl, K. M., & Schwartz, S. J. (2009). Determination of anthocyanins, total phenolic content, and antioxidant activity in Andes berry (*Rubus glaucus Benth*). *Journal of Food Science*, 74(3), 227–232. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01092.x>
- Gil D de M, M. (2000). *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. *Revista Chilena de Infectología*, 17(2), 145–152. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182000000200010>
- Goode, W., & Hatt, P. (1986). *Métodos de investigación social* (Ediciones). Mexico.
- Grabek-Lejko, D., & Wojtowicz, K. (2014). Comparison of antibacterial and antioxidant properties of fruits and leaves of blackberry (*Rubus plicatus*) and raspberry (*Rubus idaeus*). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3(6), 514–518.
- Hernández Sampieri, R., Fernández Collado, C., & Baptista Lucio, P. (2006). Concepción o elección del diseño de investigación. In *Metodología de la investigación* (4a. ed., pp. 157–233). Mexico: McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Kaume, L., Howard, L. R., & Devareddy, L. (2012). The blackberry fruit: A review on its composition and chemistry, metabolism and bioavailability, and health benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(23), 5716–5727. <https://doi.org/10.1021/jf203318p>
- Krauze-Baranowska, M., Majdan, M., Hałasa, R., Glód, D., Kula, M., Fecka, I., &

- Orzeł, A. (2014). The antimicrobial activity of fruits from some cultivar varieties of *Rubus idaeus* and *Rubus occidentalis*. *Food Function*, 5, 2536–2541. <https://doi.org/10.1039/C4FO00129J>
- Luján Roca, A. D. (2013). *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina asociado a la comunidad : aspectos epidemiológicos y moleculares. *Anales de La Facultad de Medicina*, 74(1), 57–62.
- Mertz, C., Cheynier, V., Günata, Z., & Brat, P. (2007). Analysis of phenolic compounds in two blackberry species (*Rubus glaucus* and *Rubus adenotrichus*) by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(21), 8616–8624. <https://doi.org/10.1021/jf071475d>
- Navidi, W. (2006). *Estadística para ingenieros y científicos*. Mexico: McGraw-Hill Interamericana Editores.
- OMS. (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics.
- Picazo, J. J., Betriu, C., Culebras, E., Rodríguez-avial, I., Gómez, M., & López-Fabal, F. (2011). *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: sensibilidad a la daptomicina a lo largo de un periodo de 10 años. *Revista Española de Quimioterapia*, 24(2), 107–111.
- Quave, C. L., Estévez-Carmona, M., Compadre, C. M., Hobby, G., Hendrickson, H., Beenken, K. E., & Smeltzer, M. S. (2012). Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics. *PLoS ONE*, 7(1), e28737. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028737>
- Ramírez Gonzalez, M. B., Neira Gonzalez, A., & Correa, L. J. (2007). Actividad antimicrobiana, conservante y obtención de un colorante natural a partir de plantas de la región de Bocayá. *Scientia Et Technica*, 13(33), 415–417.
- Riaz, M., Ahmad, M., & Rahman, N. (2011). Antimicrobial screening of fruit, leaves, root and stem of *Rubus fruticosus*. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(24), 5920–5924.
- Rojas-Llanes, J. P., Martínez, J. R., & Stashenko, E. E. (2014). Contenido de

- compuestos fenólicos y capacidad antioxidante de extractos de mora (*Rubus glaucus Benth*) obtenidos bajo diferentes condiciones. *Vitae*, 21(3), 218–227.
- Scalbert, A. (1991). Antimicrobial properties of tanins. *Phytochemistry*, 30(12), 3875–3883.
- Soto-Huamani, H. M. P. (2014). *Efecto Antibacteriano y Antifúngico comparativo de los extractos acuosos del Zea Mays L. (maíz morado), Rubus glaucus (mora andina); Opuntia soherensii (ayrampo) y Diseño de un gel de limpieza cutánea* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima Perú.
- Sun, J., Zhu, H. X., Guo, J., & Xiao, D. G. (2012). Antimicrobial action of purified raspberry flavonoid. *African Journal of Biotechnology*, 11(11), 2704–2710. <https://doi.org/10.5897/AJB10.1956>
- Tamariz, J., Agapito, J., Horna, G., Tapia, E., Vicente, W., Silva, M., ... Guerra, H. (2010). *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina adquirido en la comunidad aislados en tres. *Revista Medica Herediana*, 21, 4–10.
- Velićanski, A. S., Cvetković, D. D., & Markov, S. L. (2012). Screening of antibacterial activity of raspberry (*Rubus idaeus L.*) fruit and pomace extracts. *Acta Periodica Technologica*, 43, 305–313. <https://doi.org/10.2298/APT1243305V>
- Zampini, I. C., Cudmani, N., & Isla, M. I. (2007). Actividad antimicrobiana de plantas medicinales argentinas sobre bacterias antibiótico-resistentes. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 41(3), 385–393.

X. ANEXOS

Anexo 1

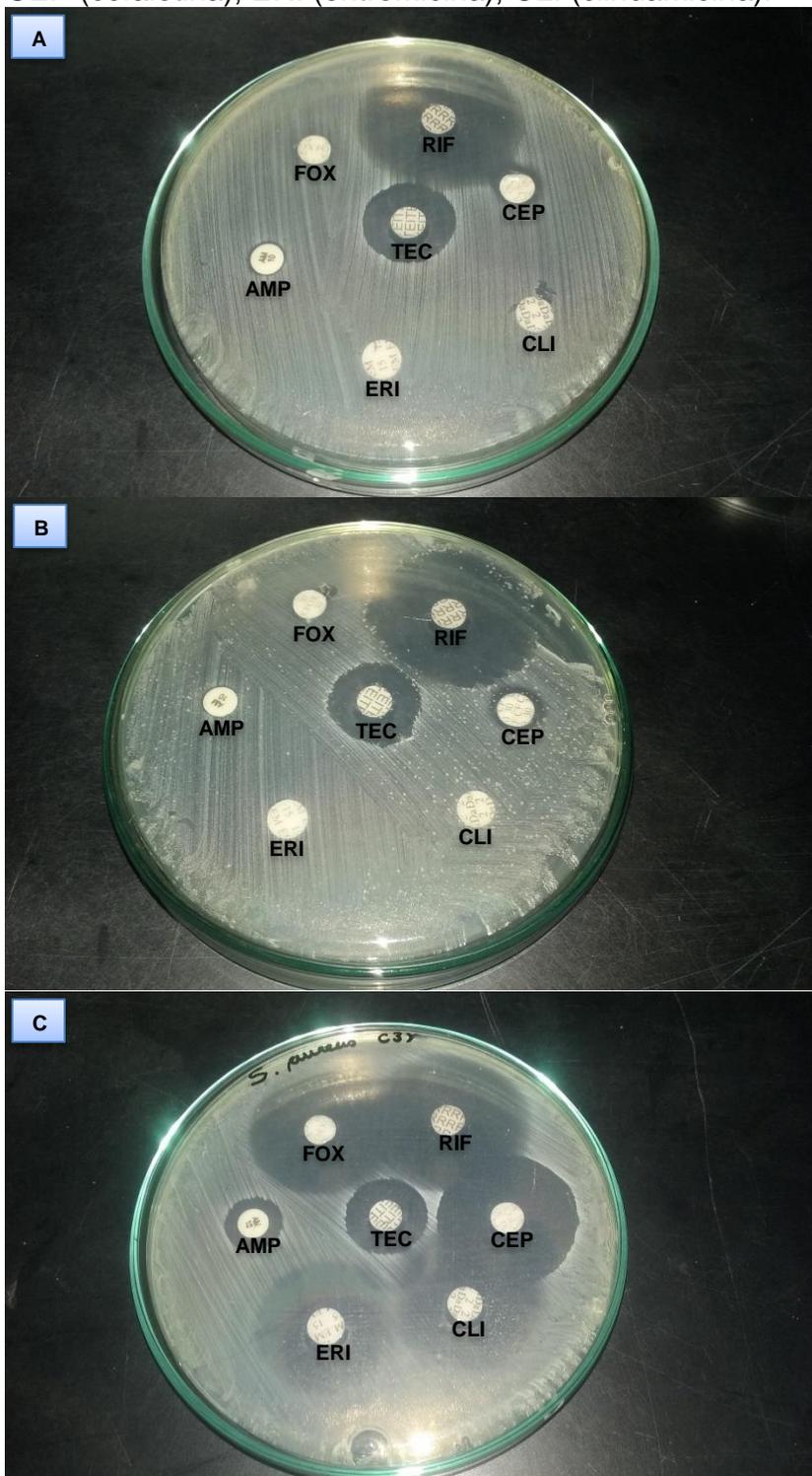
Halos de inhibición del crecimiento (mm) de *S. aureus* frente a antibióticos comunes

Antibiótico	Halos de inhibición (mm)		
	CEPA	CEPA	CEPA
	S1	S2	S3
Cefoxitina	SH	SH	11
Rifampicina	12	12	13
Ampicilina	0.5	0.5	3
Teicoplanina	5	5	5
Cefalotina	1	2	10
Eritromicina	SH	SH	9
Clindamicina	SH	SH	10

SH: Sin halo

Anexo 2.

Antibiograma de las cepas de *S. aureus* frente a antibióticos de uso común. A (S1), B (S2), C (S3); FOX (cefoxitina), RIF (rifampicina), AMP (ampicilina), TEC (teicoplanina), CEP (cefalotina), ERI (eritromicina), CLI (clindamicina).



Anexo 3

Metodología utilizada por Aquino e Ynoñan (2011)

- **Determinación del efecto inhibitorio**

La suspensión bacteriana es sometida a la acción del extracto natural del fruto a diferentes volúmenes de la siguiente manera:

- En tres tubos de ensayo agregar 3,0 mL, 6,0 mL y 9,0 mL de extracto natural.
- A cada uno de los tubos conteniendo el extracto agregar 0.5 mL de suspensión estandarizada de *S. aureus* (1.5×10^8 cel./mL).
- Por un periodo de 30 minutos y a una temperatura de 37°C se mantiene la mezcla en aerobiosis; dando periódicamente movimientos rotatorios para homogenizar.
- Realizar controles del extracto, solución salina y la cuantificación del número de UFC/mL.

- **Determinación del número de UFC/mL**

- Agregar en placas de Petri esterilizadas 15 mL de agar Müller Hinton fundido y enfriado a 45 – 50°C y dejar solidificar.
- Efectuar control de esterilidad (37°C por 24 horas).
- Cumplido el tiempo de exposición de las suspensiones microbianas al extracto natural, tomar una alícuota de 0.1 mL de cada concentración y depositar en la superficie del agar de cada placa la especie microbiana estandarizada.
- Inmediatamente extender la alícuota sobre la superficie del agar utilizando la espátula de Drigalsky (una espátula por placa) y dejar secar la superficie por 15 minutos.
- Incubar las placas en forma invertida a una temperatura de 37°C durante 24 horas.

Anexo 4

Botánica y descripción de la planta

Su posición taxonómica es:

Reino: Plantae
Clase: Dicotiledónea
Subclase: Arquiclamídea
Orden: Rosae
Familia: Rosaceae
Género: *Rubus*
Especie: *Rubus glaucus* B.



La mora es una planta perenne, de porte arbustivo, semi erecta, tallos bienales, espinudos, cubiertos de un polvo blanquecino, semi erguidos, forman macollas, lampiños, con aguijones que se extienden hasta los peciolo y la nervadura central del envés de las hojas; emite constantemente brotes basales de longitud variable y que se pueden ramificar. Hojas alternas con tres folíolos, dos basales y uno terminal, bordes aserrados, de color verde en el haz y blanquecino en el envés. Las ramas florecen en racimos terminales que caucan una vez ocurrida la fructificación, algunas ramas se hacen procumbentes cayendo al suelo y produciendo enraizamiento de los ápices. Las flores son hermafroditas y actinomorfas de corola blanca, de 2 a 2.5 cm. de diámetro, cáliz con cinco sépalos verdes agudos y persistentes, corola con cinco pétalos blancos, rojos o lila, caedizos, periantio inserto en un receptáculo o hipantio, con estambres en su base y carpelos de 1 a 150 y ovario supero; la flor terminal de la inflorescencia es generalmente de mayor tamaño, la que se fecunda primero y desarrolla fruto más temprano.