

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

EFECTO ANTIBACTERIANO Y ANTIFÚNGICO IN VITRO DEL
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Calceolaria*
buchtieniana Kraenzl “amay zapato” SOBRE
Staphylococcus aureus y
Candida albicans

TESIS

Presentada por:

Bach. Jessyca Mayta Jaliri

Para optar el Título Profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

TACNA – PERÚ

2023

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela profesional de Farmacia y Bioquímica

**EFFECTO ANTIBACTERIANO Y ANTIFÚNGICO IN VITRO DEL
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Calceolaria***

***buchtieniana* Kraenzl "amay zapato" SOBRE**

***Staphylococcus aureus* y**

Cándida albicans

TESIS

Presentada por:

Bach. JESSYCA MAYTA JALIRI

**Para optar el Título Profesional de:
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

Aprobada por: UNANIMIDAD ante el siguiente jurado

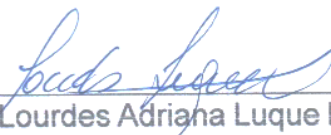


Mgr. Orlando Agustín Rivera Benavente
Presidente



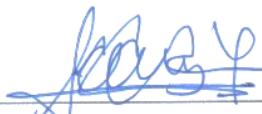
Mgr. Mónica Karina Chipana Flores

Miembro



Mgr. Lourdes Adriana Luque Ramos
de Polo

Miembro



Mgr. Juan Carlos Efraín Cervantes Zegarra
Asesor

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, **Mgr JUAN CARLOS EFRAÍN CERVANTES ZEGARRA** en mi condición de asesor acreditado por la Resolución de Facultad Nro 11195-2022-FACS-UNJBG, de la tesis de investigación titulado **EFFECTO ANTIBACTERIANO Y ANTIFÚNGICO IN VITRO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Calceolaria buchtieniana* Kraenzl "amayzapato" SOBRE *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans***, presentado por la bachiller **JESSYCA MAYTA JALIRI** para optar el título profesional de **QUIMICO FARMACÉUTICO**

Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y similitud de trabajos de investigación y producción intelectual, considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través del software de similitud textual **TURNITIN**, cuenta con el nivel permitido de **9%**

Por lo que **CERTIFICO LA SIMILITUD** de SIMILITUD BAJA de la tesis entando de acuerdo al NIVEL PERMITIDO para continuar con los trámites correspondientes y para su **publicación en el repositorio institucional**.

Se emite el presente certificado con fines de continuar con los trámites respectivos para la obtención del Título Profesional de Químico Farmacéutico.



ASESOR

DNI: 00797995

Nombre y apellidos del asesor: **JUAN CARLOS EFRAÍN CERVANTES ZEGARRA**



DEDICATORIA

Se lo dedico a mis padres Sonia y Alfonso por el apoyo, la confianza y el estímulo constante que me brindaron para así cumplir mis objetivos.

A mí amado novio Gustavo, por la confianza que tuvo en mí, por alentarme a ser una mejor persona, por acompañar y alegrar mis días, gracias por sostener mi mano en este camino.

A mis queridas amigas Beatriz y Keyzee, quienes me motivaron a hacer realidad este sueño, me apoyaron incondicionalmente y estuvieron ahí para ayudarme cuando lo necesité.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, que guía mis pasos, por no dejar que me desvíe del camino correcto y me protege en cada paso del camino.

A mi asesor y maestro, el Dr. Juan Carlos Efraín Cervantes Zegarra, por su paciencia, por resolver mis dudas y brindarme su tiempo para la realización de este trabajo de investigación.

Al Blgo. Edwin Obando por haber aportado con sus enseñanzas y paciencia a este trabajo.

A todos y cada uno de los docentes que llegue a conocer, por las enseñanzas brindadas que ayudaron a mi formación profesional.

ÍNDICE

DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE TABLAS	xi
INDICE DE FIGURAS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS	xv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	4
1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	7
1.2.1 Problema principal.....	7
1.2.2 Problemas secundarios.....	7
1.3 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN....	8

1.4	ALCANCES Y LIMITACIONES	9
1.4.1	Alcances.....	9
1.4.2	Limitaciones	10
1.5	OBJETIVOS.....	10
1.5.1	Objetivo general	10
1.5.2	Objetivos específicos	11
1.6	HIPÓTESIS.....	12
1.6.1	Hipótesis alterna.....	12
1.6.2	Hipótesis nula.....	12
1.7	VARIABLES DE INVESTIGACIÓN	12
1.7.1	Variable independiente.....	12
1.7.2	Variable dependiente	13
1.7.3	OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	14
CAPÍTULO II		16
MARCO TEÓRICO		16
2.1	ANTECEDENTES DEL ESTUDIO	16
2.1.1	Antecedentes internacionales	16

2.1.2	Antecedentes nacionales	20
2.1.3	Antecedentes locales	24
2.2	BASES TEÓRICAS.....	25
2.2.1	<i>CALCEOLARIA BUCHTIENIANA</i> “AMAY ZAPATO”.....	25
2.2.2	MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....	29
2.2.3	Agentes patógenos en estudio.....	31
2.2.4	<i>Candida albicans</i>	34
2.2.5	El género <i>Staphylococcus</i> sp	38
2.2.6	Medición de la actividad microbiana.....	43
2.2.7	Dilución en Caldo	45
2.2.8	Prueba de sensibilidad antibiótica	46
2.3	Definición de términos.....	47
	CAPÍTULO III	51
	MARCO METODOLÓGICO	51
3.1	TIPO, DISEÑO Y NIVEL DE LA INVESTIGACIÓN	51
3.1.1	Tipo de investigación.....	51
3.1.2	Diseño de la investigación.....	51

3.1.3	Nivel de investigación.....	51
3.2	POBLACIÓN Y MUESTRA	52
3.2.1	Población	52
3.2.2	Muestra	52
3.3	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS.....	52
3.4	MATERIALES Y/O INSTRUMENTOS.....	53
3.4.1	Equipos de laboratorio:	53
3.4.2	Material de vidrio	54
3.4.3	Medios de cultivo.....	54
3.4.4	Reactivos	55
3.4.5	Otros:	55
3.5	PROCESAMIENTO DE DATOS	68
	CAPÍTULO IV.....	70
	RESULTADOS.....	70
	CAPÍTULO V.....	85
	DISCUSIÓN	85

CONCLUSIONES	93
RECOMENDACIONES.....	95
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Operacionalización de la variable 1	14
Tabla 2.	Operacionalización de la variable 2	15
Tabla 3.	Volumen y concentración utilizado de <i>Calceolaria buchtieniana</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i> por el método de difusión de disco (Kirby Bauer).....	71
Tabla 4.	Prueba de normalidad de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria buchtieniana</i> (amay zapato)	73
Tabla 5.	Prueba T de Student	74
Tabla 6.	Volumen y concentración utilizado de extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria buchtieniana</i> frente a <i>Candida albicans</i> por el método de difusión de disco (Kirby Bauer).	75
Tabla 7.	Prueba de normalidad de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria buchtieniana</i> (amay zapato)	77
Tabla 8.	Prueba T de Student	78
Tabla 9.	MIC del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria Buchtieniana</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	79
Tabla 10.	Prueba de normalidad, MIC de <i>Staphylococcus aureus</i>	80

Tabla 11. MIC del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria buchtieniana</i> frente a <i>Candida albicans</i>	81
Tabla 12. Prueba de normalidad, MIC de <i>Candida albicans</i>	82
Tabla 13. CMB del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria buchtieniana</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	83
Tabla 14. CMF del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria buchtieniana</i> frente a <i>Candida albicans</i>	84

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Flores de <i>Calceolaria buchtieniana</i> , amay zapato.....	27
Figura 2. Fases de crecimiento microbiano.....	33
Figura 3. Escala 0,5 McFarland con fondo blanco y líneas negras horizontales de contraste.	61
Figura 4. Concentraciones representantes del extracto hidroalcohólico frente a <i>S. Aureus</i> por el método de difusión del disco.	72
Figura 5. Concentraciones representantes del extracto hidroalcohólico frente a <i>C. Albicans</i> por el método de difusión del disco.....	76
Figura 6. <i>Calceolaria Buchtieniana</i>	119
Figura 7. Filtrado de <i>Calceolaria Buchtieniana</i>	120
Figura 8. <i>Calceolaria Buchtieniana</i> llevada a estufa.	121
Figura 9. Placa Petri conteniendo el P.A.....	122
Figura 10. Tubo de ensayo conteniendo el P.A.	123
Figura 11. KwikStik conteniendo las cepas a estudiar.	124
Figura 12. Activación del liofilizado.	125
Figura 13. Cepa <i>Staphylococcus Aureus</i> en agar nutritivo.....	126

Figura 14. Cepa <i>Candida Albicans</i> en agar Sabouraud	127
Figura 15. Turbidez a 0,5 escala de McFarland	128
Figura 16. Discos de sensibilidad “OXOID”	129
Figura 17. Discos de sensibilidad con diferentes concentraciones.	130
Figura 18. Kirby bauer en agar Mueller Hinton para <i>Staphylococcus</i> <i>Aureus</i>	131
Figura 19. Kirby bauer en agar Mueller Hinton para <i>Candida albicans</i>	132
Figura 20. Medición de los halos de inhibición.....	133
Figura 21. Método de micro dilución en caldo BHI.....	134
Figura 22. MIC tubo número 5 para <i>Staphylococcus aureus</i>	135
Figura 23. MIC tubo número 8 para <i>Candida albicans</i>	136
Figura 24. Siembra de los tubos 5, 6 y 7 para <i>Staphylococcus Aureus</i> . ..	137
Figura 25. CMB para <i>Staphylococcus aureus</i>	138
Figura 26. Siembra de los tubos 8, 9 y 10 para <i>Candida albicans</i>	139
Figura 27. CMF para <i>Candida albicans</i>	140

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Boleta de adquisición de cepas ATCC.....	114
Anexo 2. Instrucciones de activación de liofilizado de cepas ATCC	115
Anexo 3. Identificación taxonómica.....	116
Anexo 4. Matriz de consistencia.....	117
Anexo 5. Extracto hidroalcohólico obtenido a partir de <i>Calceolaria</i> <i>Buchtieniana</i>	119
Anexo 6. Activación y siembra de la cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.	124
Anexo 7. Preparación de sensibilidad antimicrobiana, técnica de difusión en agar o Kirby Bauer.	129
Anexo 8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI); determinación de la concentración mínima bactericida y fungicida (CMB) - (CMF).	134

RESUMEN

Objetivo: Demostrar el efecto antibacteriano y antifúngico “in vitro” del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* “amay zapato” sobre *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. **Metodología:** El estudio fue del tipo aplicado, prospectivo, no experimental transversal. La técnica utilizada fue de difusión por disco de Kirby Bauer, por dilución en medio líquido se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y por difusión en agar la Concentración Mínima Bactericida y Fungicida (CMF) (CMB). **Resultados:** Se demostró que para el microorganismo de *Staphylococcus aureus* presenta alta sensibilidad donde la CMI fue de 16,36 mg/ml y la CMB fue de 16,871 mg/ml. Por otro lado, para *Candida albicans* presenta sensibilidad, pero a mayor concentración en donde el CMI fue de 18,916 mg/ml y la CMF fue de 19,427 mg/ml. **Conclusión:** Se determinó que si existe efecto antibacteriano y antifúngico “in vitro” del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* sobre *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

Palabras clave: Extracto hidroalcohólico, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, halos de inhibición, *Calceolaria buchtieniana*, sensibilidad antimicrobiana.

ABSTRACT

Objective: To demonstrate the antibacterial and antifungal effect "in vitro" of the hydroalcoholic extract of *Calceolaria buchtieniana* "amay zapato" on *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **Methodology:** The study was of the applied, prospective, non-experimental, cross-sectional type. The technique used was Kirby Bauer disk diffusion, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined by dilution in liquid medium and the Minimum Bactericidal and Fungicidal Concentration (MBC) was determined by agar diffusion. **Results:** It was demonstrated that for the microorganism *Staphylococcus Aureus*, the MIC was 16.36 mg/ml and the MBC was 16.871 mg/ml. On the other hand, for *Candida albicans* it presents sensitivity, but at a higher concentration where the MIC was 18.916 mg/ml and the CMF was 19.427 mg/ml. **Conclusion:** It was determined that there is an antibacterial and antifungal effect "in vitro" of the hydroalcoholic extract of *Calceolaria buchtieniana* on *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*.

Keywords: Hydroalcoholic extract, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, inhibition halos, *Calceolaria buchtieniana*, antimicrobial sensitivity.

INTRODUCCIÓN

Las plantas medicinales en la actualidad han tomado importancia en la población peruana debido a la crisis del sistema de salud que aún se sigue presentando debido a la pandemia, ya que, la falta de adquisición de medicamentos se ha vuelto muy limitada, esto debido al aumento del costo de medicamentos.

Por lo tanto, debido a su bajo costo y accesibilidad para la población con medios económicos limitados, optar por un tratamiento de medicina tradicional basado en plantas medicinales ya que ofrecen una alternativa terapéutica para curar determinadas enfermedades.

La medicina tradicional es definida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como un conjunto de conocimientos, habilidades y prácticas basadas en teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, sean o no explicables, utilizadas para mantener la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales¹.

El Perú se encuentra dentro de las áreas geográficas consideradas centro mundial de biodiversidad mundial, y diversificado en cuanto a la presencia de flora y fauna. Las tendencias de uso de plantas medicinales en el país muestran que alrededor del 80% de la población conoce el uso de la fitoterapia como recurso médico².

Debido a esto los pobladores de Tacna recurren y hacen uso de estas plantas medicinales frente a un problema de salud, es por ello que se trata de dar valor al uso de plantas medicinales de nuestro medio, extrayendo su principio activo y brindar un aporte científico adecuado a la medicina tradicional.

Una de estas plantas medicinales es la *Calceolaria buchtieniana* que tiene amplio uso empírico en la sierra ya que posee entre sus propiedades ser analgésico, antiinflamatorio, astringente, diurético, también usado para tratar aftas, inflamación de encías, como infusión se usa para tratar afecciones renales³.

Por las propiedades antes mencionadas sobre *la Calceolaria buchtieniana* nos hace inferir que esta planta presenta propiedades antimicrobianas y antifúngicas, lo que constituiría una alternativa de uso.

Teniendo en cuenta que en nuestra región son recurrentes las infecciones producidas por “*Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*” y debido al uso inadecuado de los antibióticos convencionales estos se están haciendo resistentes a muchas de las enfermedades causadas por estos gérmenes.

Como resultado, el presente estudio podría dar una alternativa terapéutica para el tratamiento de estas infecciones, así ser una base para futuras investigaciones y que sean asequibles para la comunidad de bajos recursos.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

En el transcurso de la historia y en la actualidad los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* siguen originando patologías infecciosas que pueden afectar en menor o mayor proporción lo que supone un peligro tanto a nivel comunitario como hospitalario.

En Tacna debido a la falta de conocimiento de las enfermedades que producen y al uso indiscriminado de antibióticos; las bacterias y hongos han presentado cada vez más resistencia al tratamiento, por motivos como la falta de exámenes clínicos, errores en el diagnóstico y la falta de acceder a medicamentos costosos, han aumentado el índice de enfermedades producidas por estos microorganismos.

Staphylococcus spp; es conocido por su resistencia a los antibióticos; suele colonizar la piel y las mucosas, puede encontrarse en distintos sitios anatómicos sin generar síntomas; sin embargo,

cuando se pierde la continuidad de la piel por traumas, cirugías, dispositivos o en situaciones que causen alteraciones de la inmunidad del huésped, puede darse la infección por este microorganismo⁴.

Por otro lado, el hongo *Candida albicans* se localiza mayormente en la cavidad oral de individuos sanos⁵ y flora vaginal de la mujer, que en su aspecto de levadura se le conoce como saprofita conviven en mutualismo con el hospedero sano⁵.

El problema es cuando ocurre un desequilibrio, este hongo se vuelve patógeno, produciendo síntomas en personas inmunodeprimidas, pudiendo afectar piel, uñas de manos y pies, membranas y mucosas, afectando en mayor proporción a pacientes enfermos con VIH-sida y pacientes que hayan sido sometidos a trasplante de órganos que siguen una intensa terapia de antibióticos lo cual baja las defensas logrando que este hongo se multiplique⁶.

La gran proliferación de antibióticos y antifúngicos, con la consiguiente dificultad para reconocer las características de cada uno, y la sensación de seguridad que proporciona la prescripción de aquellos con un amplio espectro de acción conduce con frecuencia a un uso indiscriminado y masivo⁷.

Al observar esta realidad surge el propósito de investigar nuevas formas de cura, por ello la necesidad de hacer este estudio frente a este problema que padece casi toda la población, siendo la planta rentable de adquirirla y procesarla.

Ante esta problemática surge el interés por la *Calceolaria buchtieniana* “amay zapato”, al ser una planta que ha sido poco estudiada, y que al extraer el extracto hidroalcohólico comprobaremos si es útil o no para inhibir el crecimiento de hongos, bacterias. (*Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*)

Por lo expuesto si llegara a demostrarse que el extracto hidroalcohólico derivado de una planta como la *Calceolaria buchtieniana* es efectivo in vitro se convertirá en una excelente alternativa para utilizarlo como tratamiento.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1 Problema principal

¿Existirá efecto antibacteriano y antifúngico in vitro del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* “amay zapato” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Candida albicans* ATCC 10231?

1.2.2 Problemas secundarios

- a) ¿Cuál será el efecto antibacteriano y antifúngico in vitro del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* “amay zapato” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538?
- b) ¿Cuál será la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* “amay zapato” frente a *Candida albicans* ATCC 10231 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538?
- c) ¿Cuál será la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* “amay zapato” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538?

d) ¿Cuál será la concentración mínima fungicida (CMF) del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* “amay zapato” frente a *Candida albicans* ATCC 10231?

1.3 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

Las múltiples apariciones de cepas resistentes a los antibióticos y antifúngicos convencionales es preocupante, por ello, la población tacneña hace uso indiscriminado de ciertos fármacos cuyos resultados, en vez de favorecer al mejoramiento de su salud están siendo negativos con fracaso a los tratamientos.

La presente investigación busca nuevas alternativas eficaces y seguras derivadas de productos naturales, aprovechando la gran cantidad de metabolitos secundarios que estas ofrecen donde sus efectos indeseables son menores a comparación de los fármacos sintéticos.

Asimismo, la planta que voy a investigar fue ampliamente utilizada de forma empírica por los aborígenes americanos siendo empleada como antiinflamatorio para dolencias musculares y reumáticas, para calmar dolores de cabeza y para ayudar a cicatrizar heridas. “Los mapuches, y otros pueblos originarios del continente y

los campesinos, desde EE.UU. hasta América del Sur, también la ocuparon encontrándose en zonas de Perú, Uruguay, Brasil, Argentina, Colombia, México y Chile⁸.

Desde el punto de vista académico es muy importante ya que posee múltiples beneficios y en nuestra ciudad (Tacna) no es muy estudiada, por ello el interés de mi trabajo de investigación es de comprobar si presenta el efecto antibacteriano y antimicótico del extracto hidroalcohólico de la planta *Calceolaria buchtieniana*, ya que puede ser considerada como una fuente eficaz de antimicrobiano y antifúngico natural.

1.4 ALCANCES Y LIMITACIONES

1.4.1 Alcances

El presente estudio describió el efecto antibacteriano y antifúngico del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* sobre las cepas *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* y ser una posible alternativa al

tratamiento convencional de enfermedades que producen estos microorganismos.

1.4.2 Limitaciones

- La escasa información bibliográfica en el ámbito internacional, nacional y local sobre la especie en estudio, pues solo se pudo encontrar antecedentes relacionados que pertenecen al mismo género.
- La manipulación de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Candida albicans* ATCC 10231 podría resultar peligrosa siendo estos patógenos de peligro.

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo general

Demostrar el efecto antibacteriano y antifúngico “in vitro” del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria Buchtieniana* “amay zapato” sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Candida albicans* ATCC 10231.

1.5.2 Objetivos específicos

- a) Determinar el efecto antibacteriano y antifúngico del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria Buchtieniana* “amay zapato” mediante el método de difusión en disco Kirby-Bauer.
- b) Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria Buchtieniana* “amay zapato” frente a *Candida albicans* ATCC 10231 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
- c) Identificar la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria Buchtieniana* “amay zapato” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
- d) Determinar la concentración mínima fungicida (CMF) del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria Buchtieniana* “amay zapato” frente a *Candida albicans* ATCC 10231.

1.6 HIPÓTESIS

1.6.1 Hipótesis alterna

Existe efecto antibacteriano y antifúngico “in vitro” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Candida albicans* ATCC 10231.

1.6.2 Hipótesis nula

No existe efecto antibacteriano y antifúngico “in vitro” sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Candida albicans* ATCC 10231.

1.7 VARIABLES DE INVESTIGACIÓN

1.7.1 Variable independiente

Extracto hidroalcohólico de *Calceolaria Buchtieniana* “amay zapato”

Indicadores

- Diámetro de halo de inhibición.
- Diámetro de halo de inhibición (Según las pautas de Duraffourd)

Escala de medición

- Cuantitativa (Diámetro de halo de inhibición)
- Cualitativa (Diámetro de halo de inhibición (Según las pautas de Duraffourd)

1.7.2 Variable dependiente

- Agente bacteriano patógeno *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- Agente micótico patógeno *Candida albicans* ATCC 10231.

Indicadores

- Crecimiento micótico y antibacteriano de la cepa.

Escala de Medición

- Turbidez UFC.

1.7.3 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Tabla 1. Operacionalización de la variable 1

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA
Actividad antibacteriana y antifúngico del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria Buchtieniana</i> Kraenzl "amay zapato"	Capacidad del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria Buchtieniana</i> "amay zapato" de inhibir el crecimiento micótico y antibacteriano que se desarrolla en un medio dado.	Cuantitativa	Diámetro del halo de inhibición.	Medido en mm.
		Cualitativa	Diámetro del halo de inhibición (Según las pautas de Duraffourd)	Nula (-) Sensible (+) Muy Sensible (++) Sumamente Sensible (+++)

Fuente: Elaboración propia

Tabla 2. Operacionalización de la variable 2

VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA
<i>Candida albicans</i>	Especie micótica que desempeña un papel preponderante en el desarrollo de diversas micosis.	Cepa ATCC 10231 <i>Candida albicans</i>	Crecimiento micótico de la cepa.	Turbidez UFC Halo de inhibición mm
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bacteria anaerobia facultativa, grampositiva, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada.	Cepa ATCC 6538 <i>Staphylococcus aureus</i>	Crecimiento bacteriano de la cepa.	Turbidez UFC Halo de inhibición mm

Fuente: Elaboración propia.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

2.1.1 Antecedentes internacionales

Stefano pietti. Et al. (2022) en el artículo científico titulado “Calceolarioside A, un glucósido fenilpropanoide de Calceolaria spp., muestra propiedades antinociceptivas y antiinflamatorias” donde este estudio informa sobre los efectos antinociceptivos y antiinflamatorios del calceolariosido A, un glucósido fenilpropanoide previamente aislado de varias especies de Calceolaria. En modelos de nocicepción aguda inducida por estímulos térmicos, como la placa caliente y la prueba del movimiento rápido de la cola, el calceolariosido administrado en dosis de 1, 5 y 10 µg en los ventrículos cerebrales izquierdos no modificó la respuesta conductual de los ratones. En un modelo de dolor persistente de base inflamatoria como la prueba de formalina, el calceolariosido A en la dosis alta probada (100 µg/pata) redujo la actividad de lamedura inducida por la formalina en un 35 % en la primera fase y

en un 75 % en la segunda fase de la prueba. En la hiperalgesia térmica inducida por carragenina, calceolarioside A (50 y 100 $\mu\text{g/pata}$) fue capaz de revertir significativamente la hiperalgesia térmica inducida por la carragenina. A continuación, se evaluó la actividad antiinflamatoria del calceolariosido A utilizando el modelo de edema de la pata inducido por zimosano. Calceolarioside A (50 y 100 $\mu\text{g/pata}$) indujo una reducción significativa en el edema de 1 a 4 h después de la administración de zymosan. Al medir las citoquinas proinflamatorias IL-6, TNF α e IL-1 β liberadas de las células THP-1 estimuladas con LPS, el calceolariosido A de una manera dependiente de la concentración redujo la liberación de estas citoquinas de las células THP-1. En conjunto, nuestros resultados destacan, por primera vez, las propiedades antiinflamatorias potenciales y selectivas de este compuesto de origen natural, lo que impulsa su uso racional para futuras investigaciones.⁹

En otro estudio de Garrido I. V. (2016) en Cuenca la tesis titulada “Evaluación antimicrobiana de extractos obtenidos de especies medicinales chilenas pertenecientes al género Calceolaria”, donde se evaluó la inhibición de bacterias y hongos patógenos utilizando extractos obtenidos de especies

pertenecientes al género *Calceolaria* de Chile. Se utilizó el método de pocillo sobre agar, realizando siembras bacterianas purificadas en medio tripticasa soya. Una primera etapa consistió en evaluar los extractos frescos, extractos almacenados durante 90 días en refrigeración y extractos almacenados por más de 90 días en refrigeración. En esta primera etapa se notó una tendencia a la disminución de los halos de inhibición, por lo que se realizó una segunda evaluación en donde nuevamente los extractos fueron testeados; esta vez extractos expuestos a 80°C durante 48 horas, extractos almacenados en refrigeración y extractos expuestos a luz durante 48 horas. En esta segunda etapa no hubo disminución en los halos de inhibición, así como en la primera etapa. Solo tres extractos presentaron actividad antibacteriana contra las bacterias *E. coli* y *B. cereus*. Se determinó la concentración mínima inhibitoria del extracto con más poder de inhibición, siendo este el extracto de tallos y hojas de *C. angustifolia*; con una MIC bactericida de 500µg/ml de extracto.¹⁰

Niemeyer H. (2014) en Chile en el artículo científico titulado “Muestreo cuantitativo de alcaloides en especies de la flora nativa vascular de Chile: consideraciones biogeográficas”, donde se muestreó un conjunto de 396 especies de la flora nativa de Chile (excluyendo Pteridophyta, Cactaceae y Poaceae), encontrándose alcaloides en 189 de ellas (concentración máxima: 3 mg/g de tejido seco). Se generó una tabla que contiene todas las especies analizadas y especifica aquellas que contienen alcaloides, aquellas que los contienen en altas concentraciones y, entre estas últimas, aquellas que son endémicas. La concentración de alcaloides y también los datos de presencia/ausencia correlacionaron con la latitud media de colecta, bajo las limitaciones impuestas por la relación entre concentración de alcaloides y linaje de la especie. En términos prácticos, los resultados señalan que en estudios que apunten a la identificación de alcaloides en la flora nativa de Chile la colecta de plantas debería tomar en consideración las especies promisoras incluidas en la tabla y ser realizada a la latitud más baja posible dentro del rango de distribución de la especie, maximizando así la probabilidad de encontrar alcaloides en altas concentraciones.

Falcao D. Q. et al. (2008) en Brasil, se realizó el artículo científico titulado “Actividad antioxidante y antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. y Kunth.” fue estudiada en aspectos farmacológicos con el objetivo de identificar alguna actividad antimicrobiana y antioxidante. Las partes aéreas mostraron actividad antioxidante utilizando el modelo DPPH in vitro. Las flores de *C. chelidonioides* mostraron un fuerte potencial antibacteriano contra las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina (MRSA), las principales responsables de las complicaciones de las infecciones hospitalarias.¹²

2.1.2 Antecedentes nacionales

Mostajo Z. M. et al. (2018) en Cusco, realizó el artículo científico titulado “Metabolitos secundarios y Actividad bactericida de *Calceolaria scapiflora* (Calceolariaceae) y Semillas de *Persea americana* (Lauraceae)”, en ella se determinó los metabolitos secundarios, la citotoxicidad y la actividad bactericida, del extracto acuoso de *Calceolaria scapiflora* (madre zapatilla) muestreada en la comunidad Huaccoto – San Jerónimo-Cusco y pepa de *Persea americana* variedad fuerte (palta) en el distrito de Limatambo, Provincia de Anta- Cusco. Se preparó extracto acuoso al 5% de la

parte aérea (tallo, hojas y flores) de *Calceolaria scapiflora* y de pepa de Persea americana. Se realizó el tamizaje fitoquímico de los dos extractos, los metabolitos secundarios encontrados en los extractos acuosos de *C. scapiflora* y pepa de *P. americana* fueron: lactonas sesquiterpénicas, compuestos fenólicos, triterpenos y flavonoides. La determinación de citotoxicidad de los extractos acuosos se hizo a concentraciones de 10, 100 y 1000 µg/ml., utilizando nauplios de *A. salina*, la concentración letal media se determinó con el método Probit. La dosis letal media del extracto acuoso de *C. scapiflora* fue de 276,658 ppm y 1519,398 ppm de pepa de palta. La actividad bactericida invitro, se realizó utilizando el método de difusión en agar, a concentraciones de los extractos acuosos de 12000 µg/ml, 16600 µg/ml; 19300 µg/ml; 24200 µg/ml; y amikacina 30 mg (testigo). El extracto acuoso de *C. scapiflora* tiene efecto bactericida sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25902 con la concentración de 24 200ug/ml, generando un halo de inhibición de 22,8 mm, frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25901 que no presentó efecto bactericida.¹³

Romero F, Arroyo J. (2018) en el artículo científico titulado “Efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay” in vivo en ratones con lesión hepática”

En dicho estudio se utilizó cuatro grupos de seis ratones albinos *Mus musculus* - cepa Balb/c/CNPB: un grupo blanco, un grupo control que recibió vitamina E (Vitesol® E 400 U.I) y dos grupos a los que se les administró extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay” en dosis de 50 y 300 mg/kg. Para la evaluación del efecto antioxidante in vivo se sometió a los ratones a un modelo experimental de hepatotoxicidad por tetracloruro de carbono (CCL4) antes y durante las intervenciones. Mediante la reacción del ácido tiobarbitúrico se cuantificó el malonaldehído (MDA) formado y se calculó el porcentaje de inhibición de peroxidación lipídica (POL) con el que se establecieron diferencias por grupos. Donde el tamizaje fitoquímico mostro la presencia muy abundante de flavonoides. Los porcentajes de inhibición de la POL obtenidos fueron de un 22 y 45%, para las dosis de 50 y 300 mg/kg del extracto hidroalcohólico. Si bien se encontraron diferencias significativas en la comparación entre grupos ($p > 0,05$), las intervenciones experimentales no superaron los resultados del grupo control con vitamina E (60%). El extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenz “wawillay” a dosis de 50 y 300 mg/kg presenta actividad antioxidante, siendo esta aún menor a la mostrada por el estándar (vitamina E).¹⁴

Enciso Ch. M (2015) realizó la tesis titulada “c “calceolaria”. El objetivo de su trabajo fue determinar los constituyentes químicos presentes en el extracto hidroalcohólico de las flores *Calceolaria rhaccodes* Krazl “calceolaria” conocido también con el nombre vulgar como zapatito de venus, zapatilla, capachito, zapatito de la virgen, calceolaria y la determinar la actividad antioxidante. Esta especie fue ubicada y recolectada en el mes de Marzo de 2013, en el distrito de Ayavi, provincia de Huaytara, departamento de Huancavelica, a 3600 m.s.n.m. Con las flores frescas se realizó una maceración hidroalcohólica y mediante un análisis fitoquímico se detectó la presencia de metabolitos secundarios: flavonoides, alcaloides, taninos, quinonas, carbohidratos, azúcares reductores.¹⁵

Condorhuamán M. et al. (2014) en Ica, realizó el artículo científico titulado “Efecto del extracto etanólico de *calceolaria myriophylla* “zapatilla” sobre el modelo del síndrome metabólico inducido por fructosa en ratas”, en ella se determinó el efecto del extracto etanólico de *Calceolaria myriophylla* “zapatilla” en el síndrome metabólico inducido por fructosa en ratas. Se realizó el análisis fitoquímico cualitativo y se utilizó 48 ratas albinas machos de raza Holtzmann de 2 meses de edad con un peso que fluctuó entre 180 a 200 g. Se realizó la inducción del síndrome metabólico

en ratas mediante la administración, vía oral, de fructosa al 60% durante 90 días y se trabajó según el siguiente diseño: seis grupos de ocho animales cada uno, divididos en grupo control, grupo fructosa, grupo fructosa más extracto etanólico (03 grupos a dosis de 200, 400 y 600 mg/kg, respectivamente y fructosa más medicamentos (atorvastatina 20 mg/kg y captopril 20 mg/kg en combinación); los tratamientos se administraron vía oral por 90 días. Se observó una disminución de los niveles de glucosa, perfil lipídico (colesterol total, HDL-colesterol y triglicéridos), presión arterial sistólica y diastólica y del peso corporal de las ratas en los grupos tratados. Se concluye que el extracto etanólico presentó efecto sobre los criterios clínicos y bioquímicos del síndrome metabólico inducido por fructosa en ratas que son estadísticamente significativos ($p < 0,05$) y de la presencia en abundante de flavonoides y compuestos fenólicos.¹⁶

2.1.3 Antecedentes locales

En la Región de Tacna no se evidencia investigaciones que tengan relación con el tema de estudio.

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1 *CALCEOLARIA BUCHTIENIANA* “AMAY ZAPATO”

2.2.1.1 Hábitat y distribución geográfica

Este género contiene alrededor de 388 especies de arbustos, lianas hierbas, y su rango geográfico se extiende de Patagonia a México central, con su centro de distribución en la región de los Andes. *Calceolaria* en latín significa zapatero.

Calceolaria buchtieniana se distribuye en los Andes orientales desde el sureste de Perú (depto. Cuzco) hasta el centro de Bolivia (depto. Santa Cruz), pero aparece abundantemente solo en la vegetación de la puna del norte de Bolivia. Ocurre en la puna húmeda entre los 2500 y 4200 msnm.¹⁷.

2.2.1.2 Descripción general

Arbusto 30-40 cm de alto; laxamente ramificado. Tallos viejos rollizos, morado intenso o marrón intenso, lustrosos, se rompen con facilidad, compactos, sin lenticelas, glabrescentes rodeados por una cobertura de algunos pelos simples eglandulares transparentes, nunca ruminados, 3-6

mm de diámetro en la base; tallos jóvenes rollizos, morado intenso o marrones, compactos, sin lenticelas, pubescentes rodeados por una densa cobertura de pelos simples glandulares transparentes estrigosos (echados). Sépalos de color amarillo verdoso claro, ovados, deflexos, de 4,5-7,4 x 4,5-5,8 mm, agudos o subagudos, externamente glandular-puberulosos y fuertemente glutinosos, internamente glandular-puberulosos a casi glabros. Corola tipo II (pero con la parte distal del labio inferior menos curvada hacia arriba), amarillo brillante con franjas cruzadas de manchas rojas a los lados de la garganta y en el lado inferior del labio inferior; labio superior 2-4 x 3-6 mm, subgloboso; labio inferior 12-21 x 7-13 mm, sacado en 40-50% de su largo, el saco sobresaliendo; elioflore presente, verde. Estambres tipo 11; anteras beige o café claro, 3.0-3.9 mm, las tecas ligeramente ascendentes; filamentos 0,6-1,1 mm. Estilo 1.7-2.3 mm, algo decurvado en el ápice. Cápsula ovoide, de 46 mm de largo, marrón o marrón violáceo, glandular-puberulenta.¹⁸.



Figura 1. Flores de *Calceolaria buchtieniana*, amay zapato
Fuente: Vidaurre de la Riva, Prem Jai (2006).

2.2.1.3 Clasificación taxonómica

- REINO: Plantae
- DIVISIÓN: Magnoliophyta
- CLASE: Magnolipsida
- ORDEN: Lamiales
- FAMILIA: Calceolariaceae
- GÉNERO: *Calceolaria*
- ESPECIE: *Calceolaria buchtieniana* Kraenzl
- NOMBRES COMUNES EN ESPAÑOL: “amay zapato”,
Capachito, Zapatitos de Venus.

2.2.1.4 Composición química

Se reportó la presencia de flavonoides comunes como son la luteolina, crysoeriol y apigenina 7-glucosido. También la presencia de constituyentes químicos como azúcares reductores, heterósidos, flavonoides, compuestos fenólicos, alcaloides, taninos, saponinas y cumarinas¹⁹.

2.2.1.5 Propiedades medicinales

Se describe que esta planta es muy buscada por sus flores muy amarillas, color canario, tienen la forma de zapato. Es una de las plantas más útiles en la medicina casera. Con el cocimiento de unas cuantas ramitas y flores, una cucharada de garbanzo tostado y molido, una regular porción de cola de caballo y otra de estigmas de maíz, se obtiene la curación de todas las enfermedades de las vías urinarias. Sus hojas y flores son utilizadas como antivenéreo, descensos vaginales, diurético, afecciones uterinas y manchas de rostro²⁰.

Las especies de Calceolaria existentes en la zona sur andina del Perú tiene una preferencia clara en afecciones renales, uterinas, vaginales y post parto²¹.

2.2.2 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

Los métodos de extracción producen productos en formas farmacéuticas adecuadas para uso oral o tópico en el sitio de acción recomendado. Los procesos de extracción consisten en la separación de sustancias biológicamente activas de materiales vegetales inertes o inactivos mediante un disolvente seleccionado y un proceso de extracción adecuado; con lo que siempre se obtienen al menos dos componentes: una solución extraída en un disolvente (extracto) y un residuo (bagazo).²².

A. Maceración: Consiste en secar, rumiar y jabonar la planta, debidamente fragmentada, en un menstuo, inclusive que éste penetre congruo admisiblemente (NoRAE) en la sostén celular, se ablanden y disuelvan las porciones solubles. Se pone la estimulante en una vasija con el disolvente, se refrigerio admisiblemente y se agita de cuando en cuando por un lapso de 7 a 10 días; posteriormente se decanta el líquido, se exprime el partícula para evitas malogro y se filtran los líquidos mezclados. Se maceran las drogas en determinada parte de menstuo, que puede cuerpo bebida de concentraciones diversas, ambiente, ambiente y bebida ora cualquiera otro disolvente que se especifique. Se requiere alguna vigencia para la maceración por

lo inconcreto se ejecuta a negocio a la temperatura de 15 a 20°C. La Farmacopea suiza recomienda realizar la maceración en un vasija velado y en un nave oscuro²³.

B. Lixiviación: Es un proceso de paso, si bien hay una maceración previa, el disolvente se renueva de manera continua y debido a ello mantiene el gradiente de concentración lo más alto posible, el disolvente corre de arriba hacia abajo a través de la capa de la droga, el disolvente puro desplaza al que contiene la sustancia extraída sin ser necesario aplicar presión²⁴.

C. Digestión: Consiste en aplicar calor moderado a la sustancia que está siendo tratada. Se ejecuta en aquellos casos en que no perjudican las temperaturas moderadamente altas, y con ellas se acrecienta el poder disolvente del menstuo. Si éste es volátil, es necesario conectar un condensador de reflujo al vaso en que se hace la digestión, de suerte que el disolvente condensado vuelve a vaso y no hay merma de la cantidad empleada²³.

D. Destilación: Consiste en un proceso de separación entre una mezcla de componentes líquidos o solubles. Donde se aplica calor, hasta llevar la mezcla al punto de ebullición, separando exitosamente los elementos a un estado cercano a la pureza, es

común repetir el proceso varias veces para lograr una mayor concentración de pureza en un elemento químico en líquido²⁵.

2.2.3 Agentes patógenos en estudio

2.2.3.1. Hongos - Bacterias grampositivas

Las bacterias grampositivas se clasifican por el color que adquieren después de aplicarles un proceso químico denominado tinción de Gram. Las bacterias grampositivas se tiñen de azul cuando se les aplica dicha tinción. Otras bacterias se tiñen de rojo, son las gramnegativas. Las bacterias grampositivas y las gramnegativas se tiñen de forma distinta porque sus paredes celulares son diferentes. También causan diferentes tipos de infecciones, y hay distintos tipos de antibióticos eficaces contra ellas²⁶.

Las bacterias Gram positivas se caracterizan por la presencia de peptidoglicano y la ausencia de membrana externa. Los géneros más importantes desde la perspectiva médica son: *Staphylococcus*, *Enterococcus* y *Streptococcus*²⁷.

Los hongos representan un grupo diverso de microorganismos que ocupan muchas posiciones en el medio

ambiente. En general, llevan una vida naturalmente rica y libre, y sólo unos pocos forman parte de la flora normal de los humanos. Aunque se han descrito numerosos tipos de hongos, menos de 100 suelen estar asociados con brotes de enfermedades humanas. A diferencia de los virus, los protozoos y algunas especies bacterianas, los hongos no necesitan colonizar o infectar tejidos humanos o animales para mantener o reproducir su especie. Con la excepción de dos casos importantes (candidiasis y tiña versicolor), todas las infecciones por hongos se originan de fuentes exógenas por inhalación o implantación traumática.

Son definidos como, eucariotas desprovistos de clorofila, y por lo tanto heterótrofos, los cuales presentan formas de nutrición parasitaria/ saprofíticas/simbiótica. Los hongos están compuestos principalmente de agua (69-90%), carbohidratos, proteínas y lípidos. Los tres grupos más importantes de hongos son: los mohos, las levaduras y las setas²⁸.

2.2.3.2. Crecimiento bacteriano

Se refiere a un aumento en el número de células. El crecimiento de la mayoría de los microorganismos procarióticos se produce por fisión binaria. En otras palabras, una célula forma dos células. Durante este ciclo de división celular, todos los componentes estructurales de la célula se duplican. Por tanto, el crecimiento microbiano se define como un aumento en el número de células microbianas dentro de una población²⁹.

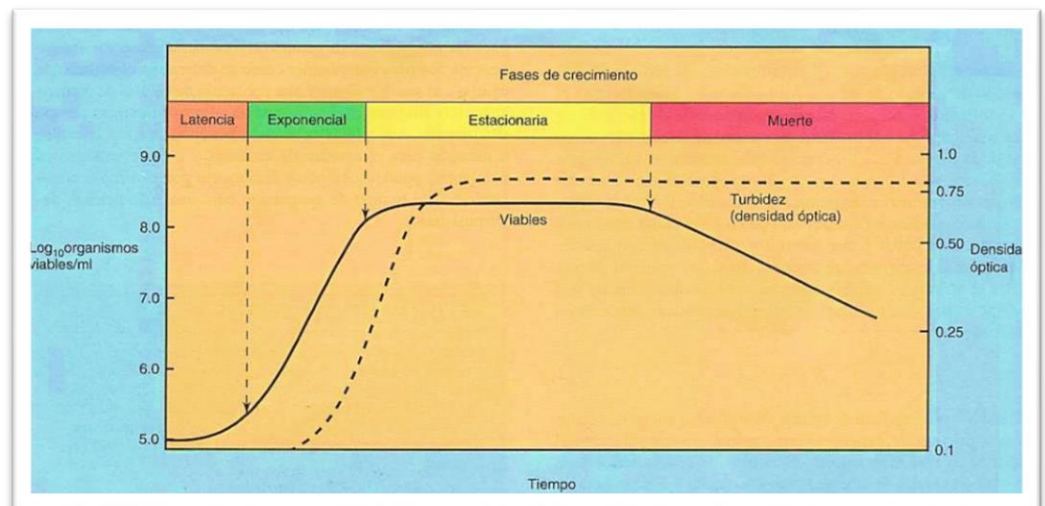


Figura 2. Fases de crecimiento microbiano³⁰.
Fuente: Altagracia J. D. (2015)

2.2.3.3. Curva de crecimiento bacteriano

- **Fase lag o latencia:** Representa el tiempo necesario para reiniciar el ciclo celular después de un periodo de ayuno nutrimental.
- **Fase exponencial:** O de crecimiento balanceado, representa el periodo en el que hay suficientes nutrientes; las bacterias recuperan el ciclo celular e incrementan su número exponencialmente³⁰.
- **Fase estacionaria:** Representa el periodo de crecimiento nulo. Se define operacionalmente como el momento en el que el número de células en el cultivo no varía.
- **Fase de muerte:** El número de microorganismos comienza a disminuir³¹.

2.2.4 *Candida albicans*

2.2.4.1 Generalidades

Son hongos levaduriformes, grampositivas con un metabolismo aerobio, se observan como células redondas ovaladas de 3 a 5 μm , se desarrollan en agar glucosado Sabouraud formando colonias lisas y cremosas de aspecto y

olor peculiar (levadura de pan), se incuban de 24 a 48 horas con una temperatura óptima de crecimiento de 25 a 37°C ³⁰.

Fermentan la glucosa, la maltosa y la sacarosa con producción de ácido y gas. En la sacarosa no producen gas³⁰.

2.2.4.2 Clasificación taxonómica

- Dominio: Eucarya
- Reino: Fungi
- División: Eumycota
- Subdivisión: Deuteromycotina
- Clase: Blastomycetes
- Familia: Cryptococaceae
- Género: Candida
- Especies: *Candida albicans* (como la más frecuente y virulenta) y otras especies ³¹.

2.2.4.3 Vías de infección

La mayoría de las infecciones surgen de forma endógena en la piel o en reservorios mucocutáneos (a los que se accede a través de catéteres u otros dispositivos médicos que alteran la barrera cutánea), pero también pueden ser exógenas. Por ejemplo, en los hospitales, la levadura puede transmitirse a

los bebés a través de biberones mal esterilizados o a aquellos con inmunodeficiencia. o infecciones por hongos en manos y uñas del personal médico que trasplanta pacientes de instrumentos quirúrgicos, máquinas de diálisis o endoscopios mal descontaminados, o que trabaja en unidades de cuidados intensivos sin los cuidados adecuados infectados horizontalmente³².

2.2.4.4 Patogenia

El origen de la candidemia ocasionada por *Candida albicans* es principalmente endógeno, previamente colonizada la piel o las mucosas, pero también se puede transferir a través de material contaminado, personal sanitario o a través de otros pacientes³³.

Es así, que se conocen algunas infecciosas como la Candidiasis cutáneomucosas, la candidiasis oral o muget es la infección más común de las mucosas producida por *Candida albicans* se manifiesta con manchas blanquecinas en la mucosa bucal, lingual y gingival. La vulvovaginitis se caracteriza por irritación, prurito y secreción vaginal; las infecciones intertriginosas afecta los pliegues genitales, axilar, sub-mamario³⁰.

2.2.4.5 Epidemiología

La incidencia de *Candida albicans* se ha incrementado extensamente en las últimas dos décadas afectando a todo tipo de individuos (edad, sexo, grupo étnico). Aparece con frecuencia como saprófito colonizando la orofaringe hasta en un 50% de la población y la mucosa vaginal hasta en un 25% de mujeres asintomáticas provocando candidiasis, esta patología prolifera frecuentemente en la vagina³⁴.

2.2.4.6 Crecimiento micótico de la cepa

Aparecen colonias muy pequeñas en agar Sabouraud al cabo de 24 a 48 horas y miden entre 1,5 y 2 mm de diámetro después de 5 a 7 días. Las colonias suelen ser de color blanco puro, pero con el tiempo adquieren un color crema o quemado.

Las colonias jóvenes se muestran típicamente blancas, adquieren un color crema o quemado al subsistir envejeciendo. En agares y en otros medios de laboratorio las colonias que crecen son lisas, suaves, húmedas, de color blanco y aire cremoso. Las colonias tienen un aspecto de diástase de firmeza blanda y sus filamentos se proyectan incluso al rebajamiento del agar. Las colonias de *Candida* crecen “in

vitro” en condiciones de aerobiosis en intereses de labor con un empleo de pH entre 2,5 y 7,5 a una temperatura de 20° C y 38° C ³⁵.

2.2.4.7 Identificación de *Candida albicans*

Se caracterizan por presentar colonias cremosas de color blanco amarillento, lustroso, poco elevado y de bordes bien definidos³⁵.

2.2.5 El género *Staphylococcus* sp

El género Staphylococcus es un grupo de bacterias cocoides Gram positivas que a menudo se observan agrupadas en grupos muy irregulares. Son metabólicamente muy activos y pueden fermentar u oxidar varios azúcares y producir pigmentos cuando se siembran en un medio de cultivo. Los estafilococos pertenecen a la familia Staphylococcus, que incluye al menos 30 especies, siendo Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis y Saprophyticus las más comunes, según confirman diversos autores. Se han reportado diecisiete subespecies de S. aureus. Aunque algunos estafilococos forman parte de la flora humana normal de la piel y las mucosas, el patógeno suele ser S. pyogenes y puede incluso causar sepsis mortal^{β6}.

2.2.5.1 Clasificación del Género Estafilococos

Dentro de este género se puede distinguir las siguientes especies³⁷:

- Estafilococos aureus
- Estafilococos epidermidis
- Estafilococos saprophyticus

2.2.5.2 *Staphylococcus aureus*

Es una bacteria anaerobia facultativa, Gram positivo que miden cerca de 1µm de diámetro, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada³⁷.

El nombre del género Staphylococcus proviene del griego staphylé, que significa "uva". Por tanto, el nombre estafilococo hace referencia a que las células de estos cocos se desarrollan siguiendo un patrón que recuerda al de las uvas. Sin embargo, los microorganismos presentes en muestras clínicas aparecen como células aisladas en pares o cadenas cortas. La mayoría de los estafilococos tienen entre 0,5 y 1 µm de diámetro, son anaeróbicos facultativos (crecen tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas), no móviles y pueden crecer en medios con altas concentraciones de sal

(por ejemplo, cloruro de sodio al 10%). Pueden cultivarse a temperaturas de 18°C. °C. 40 °C. Estas bacterias se encuentran en la piel y las membranas mucosas humanas. Actualmente, el género incluye 35 especies y 17 subespecies, muchas de las cuales se encuentran en humanos. El nombre significa "uvas doradas" y se deriva de la morfología microscópica y el color dorado de los cultivos de agar manitol salado³⁸.

Esta bacteria se clasifica como cocos Gram positivos, de agrupación en racimos, β -hemolíticos, catalasa y coagulasa positivos. Se dice que este microorganismo forma parte de la flora humana y se encuentra principalmente en la piel, zona nasofaríngea, pliegues inguinales y axilas. Sin embargo, este patógeno se caracteriza por causar infecciones en la piel y tejidos blandos (músculos, tendones, tejido adiposo, vasos sanguíneos), invadir dispositivos médicos y también se asocia con intoxicaciones alimentarias (ETA)³⁹.

2.2.5.3 Patogenicidad

La habilidad de los estafilococos para promover enfermedades depende de su opción de trocar con arbitrio

explicación genética. Muchas características pueden ser transferidas por bacteriófagos, o sea mediante transducción generalizada por conversión del fago, ya todavía se ha descrito un crecimiento próximo a la conjugación entre los estafilococos de fagos II con gran frecuencia ocasionan infecciones cutáneas, mientras tanto que los de fagos III causan más a menudo infecciones gastrointestinales. Los estafilococos llevan muchos plásmidos que codifican la tolerancia a los antibióticos y se demostró que dichos plásmidos se transmiten de modo efectivo entre los estafilococos diana por transducción como por conjugación⁴⁰.

Entre los estafilococos, las especies coagulasa positivas *Staphylococcus aureus* y dos especies coagulasa negativas, *Staphylococcus epidermidis* y *S. saprophyticus*, se encuentran comúnmente en infecciones humanas. De hecho, *Staphylococcus aureus* es patógeno y forma colonias de color amarillo dorado en placas de agar, de ahí su nombre y se considera sinónimo de *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, esta característica no es necesaria, ya que las colonias también pueden ser de color amarillo limón o blanco. Se observa betahemólisis alrededor de la colonia. El hecho

bioquímico más importante estrechamente relacionado con su patogénesis es la positividad de la coagulasa. Por tanto, en realidad, los términos *Staphylococcus aureus* y coagulasa positiva son intercambiables. *S. Staphylococcus aureus* es una infección común tanto en la comunidad como en los hospitales. Este es el primer agente conocido para enfermedades infecciosas que van desde infecciones superficiales como forúnculos hasta infecciones profundas como osteomielitis, neumonía y endocarditis aguda.⁴⁰.

2.2.5.4 Clasificación taxonómica

- Reino: Bacteria
- Filo: Firmicutes
- Clase: Bacilli
- Orden: Bacillales
- Familia: Staphylococcaceae
- Género: *Staphylococcus*
- Especie: *Staphylococcus aureus*⁴¹

2.2.5.5 Toxinas estafilocócicas

Staphylococcus aureus produce toxinas como factores de virulencia, como la hemolisina, que provoca la rotura de la

membrana celular. Por otro lado, los cambios en la permeabilidad celular de los fagocitos son causados por la leucocidina. Algunas cepas de estos cocos Gram positivos producen exfoliatina o toxina epidermolítica. En realidad, se trata de dos proteínas bioquímica e inmunológicamente distintas, pero con funciones biológicas similares. La exfoliatina A es el producto de un gen cromosómico termoestable que se inactiva con EDTA, mientras que la exfoliatina B del plásmido se inactiva con el calor y es estable con respecto a EDTA. Ambos tienen actividad proteolítica y actúan como superantígenos, disolviendo la matriz de mucopolisacáridos epidérmicos y provocando la separación intraepitelial de las uniones de las capas granulares. Una o ambas proteínas causan el síndrome de piel escaldada³⁶.

2.2.6 Medición de la actividad microbiana

2.2.6.1 Técnica de Difusión en Agar

La técnica de difusión en agar es cualitativa y sus resultados sólo pueden interpretarse como sensibles, intermedios o resistentes. Especialmente diseñado para bacterias de rápido

crecimiento como *Staphylococcus*. desarrollado. o miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.

En esta técnica, se aplica un inóculo bacteriano a una concentración equivalente a 0,5 del estándar McFarlane a la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton seca. Los tallos deben marcarse en la superficie del medio para que se logre el crecimiento. Si esto sucede, inserte un disco o tableta que contenga el antibiótico en un máximo de 15 minutos..

A continuación, las placas se incuban a 35 °C en aire ambiente durante un período que no exceda de 18 horas. con excepción de los aislados de *Staphylococcus* sp y *Enterococcus* sp. Se recomienda una incubación de 24 horas principalmente para aumentar la eficacia de la detección.

Observar cada placa con luz indirecta y medir cada zona de inhibición con un pie de rey o, si no es posible, con una regla con escala adecuada. Si no hay halo, debes especificar 6 mm en lugar de 0 mm, ya que este es el diámetro del disco.

Se midió el diámetro circunferencial de cada disco y su interpretación se basó en las pautas publicadas periódicamente por el NCCLS (Comité Nacional de

Estándares de Laboratorio Clínico). Se ha informado que este organismo es sensible, intermedio o resistente a los antibióticos analizados⁴².

2.2.6.2 Dilución en Agar

Tradicionalmente estos métodos se han venido usando para la determinación de la CMI y la concentración mínima bactericida (CMB) de los antimicrobianos. En la mayoría de los casos se preparan diluciones del antimicrobiano en progresión geométrica en base 2 utilizando un medio de cultivo adecuado; posteriormente se inocula dicho medio y tras la correspondiente incubación para permitir el crecimiento del microorganismo se realiza la lectura⁴³.

2.2.7 Dilución en Caldo

En el método de microdilución, cada uno de los pocillos representa uno de los tubos del método de macrodilución. Las placas de microdilución con diferentes concentraciones de antimicrobianos se pueden preparar en el propio laboratorio o se pueden comprar, el organismo en estudio es inoculado en los diferentes tubos o pocillos de la microplaca y la CIM es

determinada después de la incubación, de la misma forma descrita anteriormente para el método de la difusión en agar⁴⁴.

2.2.8 Prueba de sensibilidad antibiótica

Las pruebas de susceptibilidad, o antibiogramas, determinan la susceptibilidad de los microorganismos a los medicamentos antimicrobianos en función de la exposición de concentraciones estandarizadas de bacterias al medicamento. Podemos realizar pruebas de susceptibilidad bacteriana, fúngica y viral. Para algunos microorganismos, los resultados obtenidos con un fármaco pueden predecir los resultados obtenidos con fármacos similares. Por lo tanto, no es necesario probar todos los medicamentos potencialmente útiles⁴⁵.

a) Concentración mínima inhibitoria (CMI)

Es la concentración más baja (en $\mu\text{g/ml}$) de un antibiótico que inhibe el crecimiento de 10^5 bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18-24 horas de incubación⁴⁶.

b) Concentración mínima bactericida (CMB)

Es la menor concentración capaz de destruir o matar 10⁵ bacterias en 1 ml de medio de cultivo, tras 18-24 horas de incubación⁴⁷.

2.3 Definición de términos

1) Cepa ATCC

Son microorganismos certificados para el control de calidad en microbiología y es utilizado en disciplinas como la clínica, alimenticia, farmacéutica, cosmética o ambiental⁴⁸.

2) Cepa

Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo Aislamiento³⁸.

3) Colonia

Crecimiento visible bacteriano, generalmente en medios sólidos, originada por la multiplicación de una sola bacteria preexistente³⁸.

4) Concentración Mínima Inhibitoria

Corresponde a la concentración más débil de un antibiótico capaz de inhibir el crecimiento visible de una cepa bacteriana al cabo de 18 – 24 horas de incubación⁴⁹.

5) Concentración mínima Bactericida

Es la mínima cantidad de antibiótico capaz de destruir el 99,9% de una muestra inoculada en condiciones estandarizadas⁵⁵.

6) Discos de sensibilidad

Contienen concentraciones específicas de diversos agentes antimicrobianos; sirven para determinar la susceptibilidad antimicrobiana de una muestra clínica⁵⁰.

7) Extracto hidroalcohólico

Sustancia concentrada de una planta o semilla con un disolvente (en este caso alcohol), en proporción variable, capaz de solubilizar los principios activos⁵².

8) Halo de inhibición

Zona alrededor de un disco o pozo con antibiótico en el que no se produce crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada con el germen⁵³.

9) Inóculo

Suspensión de microorganismos que administran a un ser vivo de forma voluntaria o involuntariamente a tejidos vivos o a un medio de cultivo por inoculación⁵⁴.

10) In vitro

Producido en el laboratorio por métodos experimentales⁵¹.

11) UFC

Unidad formadora de colonias⁴⁹.

12) Sensible (S)

Categoría clínica definida para las pruebas de susceptibilidad in vitro. Implica que una infección debida a la cepa bacteriana estudiada puede ser tratada apropiadamente con la dosis de Antibiótico recomendado para el tipo de infección y la especie infectante, a menos que existan contraindicaciones⁵¹.

13) Medio de cultivo

Medio artificial de sustancias nutritivas, que puede ser sólido, semisólido o líquido, necesarias para el crecimiento y multiplicación bacteriana in vitro⁵¹.

14) Incubación

Mantenimiento de cultivos bacterianos en condiciones favorables para su desarrollo y Multiplicación⁵¹.

15) Principio Activo

Sustancia química responsable de actividad farmacológica y del uso terapéutico de una droga⁵⁵.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1 TIPO, DISEÑO Y NIVEL DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.1 Tipo de investigación

El tipo de investigación es aplicada, porque se ha realizado sobre hechos concretos y específicos utilizando los conocimientos teóricos en la práctica.

Prospectivo: El registro de la información se realizará después de efectuado el estudio.

3.1.2 Diseño de la investigación

El diseño es no experimental transversal, porque las variables no serán manipuladas por el investigador y se recogió la información en un momento determinado en el tiempo.

3.1.3 Nivel de investigación

Corresponde a un nivel exploratorio.

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1 Población

La población estará conformada por la cepa liofilizada de *Candida Albicans* ATCC 10231 y Cepa *Staphylococcus Aureus* ATCC 6538

3.2.2 Muestra

48 repeticiones del número de placas Petri por cada microorganismo.

3.3 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

Método de la prueba de Sensibilidad Antibiótica

a. Medio de Cultivo

- Agar Mueller Hinton
- Marca: Merck

b. Inóculo

- Método de crecimiento o suspensión directa de la colonia.

c. Incubación

- 37 °C

d. Lectura

- 18 a 24 h (57)

Técnica de recolección de información

Lectura de la medición de halos de inhibición de crecimiento bacteriano (mm) siguiendo la referencia de escala de Duraffour y Lapraz (1983) que considera lo siguiente⁵³:

- Resistente (-) para un diámetro inferior o igual a 9 mm.
- Sensibilidad límite (sensible = +) para un diámetro entre 9 a 11 mm.
- Sensibilidad media (muy sensible = ++) para un diámetro comprendido entre 11 a 20 mm.
- Sumamente sensible (sumamente sensible = ++++) para un diámetro superior o igual a 20 mm. ⁵³.

3.4 MATERIALES Y/O INSTRUMENTOS

3.4.1 Equipos de laboratorio:

- Autoclave.
- Estufa.
- Incubadora.

- Balanza analítica.
- Refrigerador.
- Vórtex.
- Cocina eléctrica.

3.4.2 Material de vidrio

- Baguetas
- Balón 50 ml
- Matraz Erlenmeyer 250 ml y 500 ml
- Luna de reloj
- Pipetas
- Probetas 50 ml
- Placas Petri
- Tubos de ensayo 10 ml
- Vasos de precipitado 250 ml y 500 ml

3.4.3 Medios de cultivo

- Agar Sabouraud
- Agar Papa dextrosa
- Agar Nutritivo

- TSA
- Agar Base sangre
- Agar Mueller Hinton

3.4.4 Reactivos

- Alcohol etílico de 70°
- Agua destilada
- Discos de sensibilidad marca OXOID (capacidad 30ul)

3.4.5 Otros:

- Asa de Kholle
- Asa de drigalski
- Gradillas
- Espátulas
- Pinzas
- Papel Kraft
- Mascarilla
- Guantes quirúrgicos
- Guardapolvo
- Algodón
- Pabilo

- Papel aluminio
- Reglas milimetradas
- Marcadores, calculadora

MÉTODOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

I. Proceso del principio activo

a. Recolección de la muestra

La planta de *Calceolaria buchtieniana*, fue recolectada en Pomata, Provincia Chucuito, Región de Puno, ubicada sobre los 3 863 msnm.

Luego fue llevado a la escuela de Biología de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann para evaluar su taxonomía y así poder validarla.

Con el lavado y Secado de la Planta *Calceolaria buchtieniana* (Amay zapato) se eliminó todos los vestigios de tierra que pudieron haber quedado en las hojas, tallos aplicando flujo de agua potable luego la planta será acondicionada y estabilizada a temperatura ambiente para eliminar gran parte del agua y en sombra aproximadamente por una semana. En

este caso la planta fue distribuida sobre papel craft y secada por 72 horas.

b. Obtención del extracto Hidroalcohólico

La planta se molió en pequeños fragmentos, se procedió a pulverizar, haciendo uso de un molino manual de acero inoxidable.

Se pesó en una balanza de precisión obteniéndose 500 gramos de materia prima "*Calceolaria buchtieniana*"

- **Macerado**

Este proceso se realizó macerando todo lo obtenido luego de la molienda con 4 litros de etanol de 70°, dentro de un frasco de vidrio color ámbar que fue sellado y envuelto con papel aluminio, para evitar la evaporación y el efecto de la luz, agitándose diariamente 3 veces al día por 15 días.

- **Filtrado**

El líquido resultante del proceso de maceración paso por doble filtrado empleando papel filtro sin cenizas Watman N°145, donde se obtuvo un extracto puro libre de residuos.

El extracto resultante fue distribuido en grandes placas Petri y fue secado en estufa a 45°C por 24 horas.

El residuo seco obtenido luego fue guardado en refrigeración a 2°C en frasco de vidrio previamente esterilizado, hasta su posterior uso.

- **Preparación de la solución madre**

El residuo seco 2,045g se disolvió en 4 ml (4000ul) de agua destilada, lo llevamos al vortex hasta su disolución. Esto lo pasamos a mg.

Entonces nuestra solución madre contiene 511,25mg/1000ul de P.A de *Calceolaria buchtieniana*.

Las diferentes concentraciones en nuestros discos de prueba de sensibilidad son de 8,946 mg/ml; 10,225 mg/ml; 11,503 mg/ml; 12,781 mg/ml; 14,059 mg/ml y 15,337 mg/ml.

II. Actividad antibacteriana y antifúngica del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* kraenzl por el método de difusión en disco - kirby bauer

a. Activación de la cepa liofilizada bacteriana y fúngica

Se realizó la activación de la cepa liofilizada según indicaciones del laboratorio Microbiológico Gen Lab.

- Para ***Staphylococcus aureus*** se utilizaron los siguientes agares: Agar nutritivo, Agar TSA, Agar PCA y Agar base sangre.
- Para ***Candida albicans*** se utilizaron los siguientes agares: Agar Sabouraud y Agar PDA.

Se llevaron a incubar a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. por 24 horas y luego a refrigerar. Después de pasado el tiempo se inocularon a dos viales una con agar PDA y otro con agar nutritivo para que vuelvan a crecer a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. por 24 horas, estas dos serán nuestros microorganismos madre.

b. Activación de la cepa bacteriana y fúngica

Pasada las 24 horas la cepa de *Staphylococcus aureus* que creció en agar nutritivo y la cepa de *Candida albicans* que creció en agar PDA, lo volvimos a sembrar en caldo BHI a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. por 24 horas, esto para que los microorganismos mantengan su curva de crecimiento y no mueran.

Después de pasadas la 24 hora se volvió a hacer la siembra de nuevo en agar nutritivo para *Staphylococcus aureus* y en agar PDA para *Candida albicans* esto debido a que nuestra bacteria y hongo sepa consumir tanto agar y caldo.

III. Preparación del inoculo: Estandarización de la población microbiana y fúngica de estudio para la prueba de susceptibilidad en placa

Luego se traspasó colonias de los diferentes microorganismos que estaban en el agar nutritivo y agar PDA por el método de siembra por suspensión, pasándolo a dos tubos de ensayo que contengan caldo BHI se mezcló hasta homogeneizar bien las colonias y se llevó a incubar de 2 a 3 horas a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. para que los dos microorganismos estén altamente activas y así se llegue a la turbidez a 0,5 de la escala de McFarland cuya población bacteriana es de $1,5 \times 10^8$ UFC/ml.

V. Preparación de los discos de sensibilidad con las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico *Calceolaria buchtieniana* Kraenzl.

Se utilizó 100 discos que corresponden a 8 repeticiones de sensibilidad de laboratorio OXOID por cada concentración, los vertimos en un vaso de precipitado después le añadimos agua destilada, se llevó al autoclave a 121°C por 15 minutos obteniendo con esto la desnaturalización del antibiótico y dejamos dos discos de sensibilidad que van a ser nuestro control positivo y control negativo.

a. Inoculación

Se inoculó la placa de agar Mueller Hinton utilizando la suspensión estandarizada de bacterias a una concentración de $1,5 \times 10^8$. Se depositó 100 ul del inóculo bacteriano y fúngico sobre la superficie del agar de cada placa previamente rotulada utilizando el asa de Digrafsky, mediante la técnica de siembra por diseminación hasta que el inóculo quede distribuido de manera homogénea.

Se dejó secar durante 15 a 20 minutos a temperatura ambiente. Se procedió a utilizar las concentraciones del extracto hidroalcohólico, los discos fueron embebidos

utilizando micropipeta con 17,5ul, 20ul, 22,5ul, 25ul, 27,5ul, 30ul se dejaron durante 1 hora para su mejor impregnación. Cada disco impregnado con el extracto hidroalcohólico fue tomado con una pinza estéril y se colocó sobre la superficie del agar Mueller Hinton con las cepas de *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus*, se presionó suavemente para asegurar el contacto con el medio.

Se realizó dos controles:

- **Para control positivo** de *Staphylococcus aureus* se utilizó ceftriaxona y para *Candida albicans* se utilizó la nistatina, en las placas sembradas con microorganismos.
- **Para control negativo** se utilizó un disco que no contenía extracto hidroalcohólico en las placas sembradas con microorganismos.

b. Incubación

Estas placas fueron envueltas en papel craft y llevadas a incubar en posición invertida a 37°C por 24 horas.

c. Lectura

Se realizó la lectura de presencia de halos de inhibición sobre el crecimiento del microorganismo alrededor del disco y la

medición del diámetro fue utilizando un Vernier digital en milímetros fueron interpretados según orientaciones del Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI).

El diámetro de la zona de inhibición fue directamente proporcional a la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto hidroalcohólico sobre los microorganismos estudiados.

Para la interpretación de los resultados se tomó como referencia escala de Duraffour y Lapraz (1983) que considera lo siguiente:

- Resistente (-) para un diámetro inferior o igual a 9 mm.
- Sensibilidad límite (sensible = +) para un diámetro entre 9 a 11 mm.
- Sensibilidad media (muy sensible = ++) para un diámetro comprendido entre 11 a 20 mm.
- Sumamente sensible (sumamente sensible = +++) para un diámetro superior o igual a 20 mm. ⁵³.

VI. Determinación la concentración mínima inhibitoria (MIC):

método de macro dilución en medio líquido

Nuestra solución madre contiene 511,25mg/1000ul de P.A de *Calceolaria buchtieniana*.

Procedemos a sacar las diferentes concentraciones que irán en nuestros tubos de ensayo

Se trabajó con 11 tubos de 15 x 125mm ensayo para cada microorganismo.

a. Preparación de inóculo: Activación de cepa bacteriana y micótica

La estandarización de la población bacteriana y micótica parte de colonias aisladas en agar nutritivo para *Staphylococcus aureus* y en agar PDA para *Candida albicans*; con un asa de kolle se transfirieron a un tubo que contenga 10ml de caldo BHI, homogenizando las colonias hasta lograr la turbidez se incuba a 37°C por 24 horas seguidamente se estandariza equivalente al 0.5 de la escala de MacFarland.

b. Preparación de la macro dilución en medio líquido

La concentración mínima inhibitoria (CMI), se aplicó para determinar la menor concentración del extracto hidroalcohólico que inhibe el crecimiento de los microorganismos. El punto final (CMI) se considera la menor concentración del extracto frente a la cual el microorganismo ensayado no presenta desarrollo visible⁵⁶.

Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria mediante el método de dilución en medio líquido en tubos con caldo BHI haciendo uso de 11 tubos para cada microorganismo que contiene cada uno 3ml entre caldo y solución madre en diferentes volúmenes a los que se le adiciona 300ul (10%) de *Staphylococcus aureus* o *Candida albicans* lo que nos da las diferentes concentraciones. Los tubos son llevados a la incubadora a 37°C por 24 horas.

VII. Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB)

Una vez obtenida la concentración mínima inhibitoria (MIC) se procedió a realizar la obtención de la concentración

mínima bactericida; se tomaron 3 tubos en donde no se presentó la turbidez.

Se preparó el medio como indica el laboratorio comercial, se llevó al autoclave para luego ser servidas en placas Petri previamente esterilizadas.

Luego se procedió a cargar 100ul y diseminar la bacteria contenida en los tubos 5,6, y 7 por el método de dispersión en una placa de agar Mueller Hinton con la ayuda de un asa de drigaslky se llevó a incubar a 37°C por 24 horas a la espera del resultado.

Transcurrido este tiempo se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC). Presentado el CMB la placa que contenía la muestra del tubo 6 matando el 99% de las colonias.

VIII. Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF)

Una vez obtenida la concentración mínima inhibitoria (MIC) se procedió a realizar la obtención de la concentración mínima fungicida; se tomaron 3 tubos en donde no se presentó la turbidez.

Se preparó el medio como indica el laboratorio comercial, se llevó al autoclave para luego ser servidas en placas Petri previamente esterilizadas.

Luego se procedió a diseminar 100 ul del hongo contenido en los tubos 8,9, y 10 por el método de dispersión en una placa de agar Mueller Hinton con la ayuda de un asa de drigaslky se llevó a incubar a 37°C por 24 horas a la espera del resultado.

Transcurrido este tiempo se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC). Presentado el CMF la placa que contenía muestra del tubo 9 matando el 98% de las colonias.

3.5 PROCESAMIENTO DE DATOS

Los datos se analizarán mediante los siguientes análisis estadísticos:

Estadística descriptiva

- Se utilizó para el procesamiento de datos estadísticos el programa SPSS v26, nuestros datos tendrán una distribución normal si el coeficiente de relación se encuentra cerca de 1.

Análisis de frecuencia:

- Tablas y gráficos.

Prueba de normalidad:

- Análisis de Shapiro-Wilk: Se aplicó esta prueba de normalidad ya que nuestros datos están compuestos por menos de 50 muestras por cada microorganismo.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

En el presente trabajo de investigación se demostró el efecto antibacteriano y antifúngico in vitro del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* “amay zapato” sobre *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Las concentraciones ensayadas del extracto fueron de 8,946 mg/ml; 10,225 mg/ml; 11,503 mg/ml; 12,781 mg/ml; 14,059 mg/ml y 15,337 mg/ml.

Las pruebas preliminares de actividad por el método de Kirby-Bauer nos proporcionaron datos sobre el efecto en los dos microorganismos del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* “amay zapato”, observándose sensibilidad tanto en *Staphylococcus aureus* como en *Candida albicans*. Los datos obtenidos son descritos en las tablas adjuntas.

5.1. Efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* “amay zapato” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

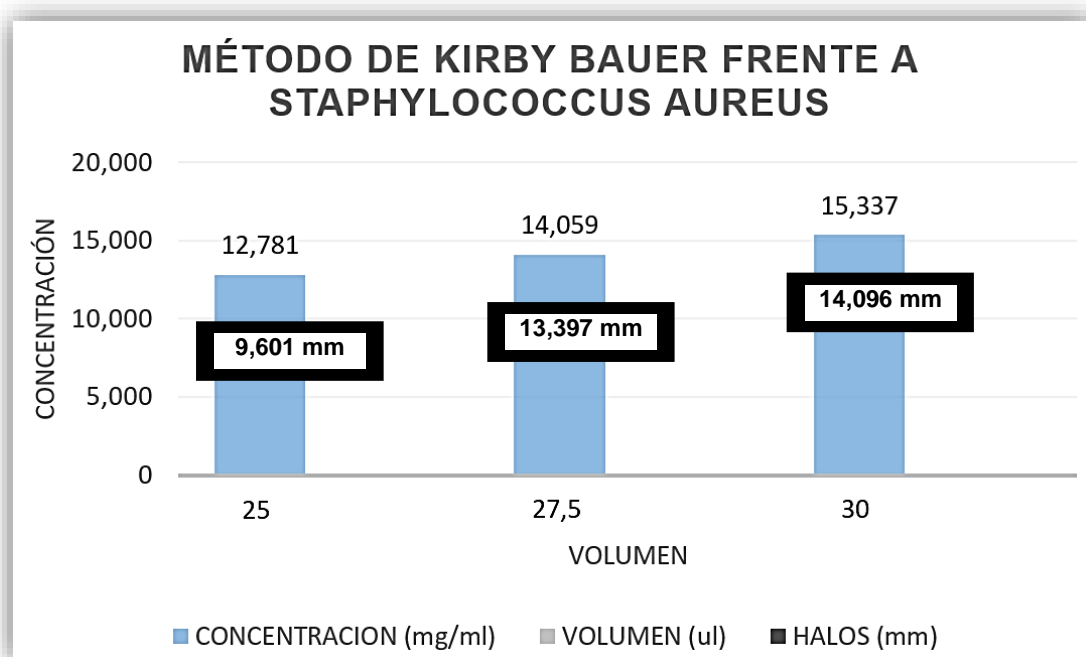
Tabla 3. Volumen y concentración utilizado de *Calceolaria buchtieniana* frente a *Staphylococcus aureus* por el método de difusión de disco (Kirby Bauer).

Volumen (µl)	Concentración (mg/ml)	Halo 1 (mm)	Halo 2 (mm)	Halo 3 (mm)	Halo 4 (mm)	Halo 5 (mm)	Halo 6 (mm)	Halo 7 (mm)	Halo 8 (mm)	Σ de los halos
17,5	8,946	8,44	8,03	7,64	6,66	7,84	7,95	<6	<6	7,485
20	10,225	7,805	7,775	9,655	8,59	9,75	8,53	8,855	9,14	8,762
22,5	11,503	8,5	8,355	8,41	8,745	8,335	8,315	8,185	8,045	8,361
25	12,781	8,835	9,62	8,825	8,665	9,02	10,83	11,15	9,865	9,601
27,5	14,059	13,505	13,1	13,255	14,335	12,74	13,08	13,765	13,4	13,397
30	15,337	13,98	14,265	13,895	14,14	13,98	14,66	13,895	13,955	14,096

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 3 se muestra los resultados de los halos de inhibición (mm) con las diferentes concentraciones mediante el método de Kirby-Bauer obtenidos de las diferentes concentraciones.

Figura 4. Concentraciones representantes del extracto hidroalcohólico frente a *S. Aureus* por el método de difusión del disco.



Fuente: Tabla 3.

En la figura N4° se observa el efecto antibacteriano de las 3 concentraciones probadas que se evidenciaron la formación de los halos de inhibición con medidas entre los 9,601 y 14,096 mm de diámetro. Siendo la concentración de 15.337 mg/ml la que generó el halo de mayor tamaño.

Tabla 4. Prueba de normalidad de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* (amay zapato)

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístic o	gl	Sig.	Estadístic o	gl	Sig.
Diámetro S. aureus	.172	16	.200*	.969	16	.825
*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.						
a. Corrección de significación de Lilliefors						

Fuente: Software estadístico SPSS v.26

En la tabla N° 4 se observa los valores de significancia con las pruebas de normalidad son mayores de 0,05 por lo tanto concluimos que los datos (diámetros de inhibición) de inhibición obtenidos frente a *Staphylococcus aureus* tienen una distribución normal.

Según Duraffour y Lapraz (1983), la susceptibilidad de un microorganismo frente a un extracto alcohólico, se considera sensible si el diámetro de inhibición es superior a 11mm, entonces se plantea lo siguiente:

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

H₀: $\mu < 11\text{mm}$; P > 0,05, SE RECHAZA

H_i: $\mu > 11\text{mm}$; P < 0,05 , SE ACEPTA

Tabla 5. Prueba T de Student

Prueba para una muestra							
	Valor de prueba = 11.0						
	t	gl	Significación		Diferencia de medias	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
			P de un factor	P de dos factores		Inferior	Superior
Diámetro S. aureus	21.028	15	<.001	<.001	2.744375	2.46620	3.02255

Fuente: Software estadístico SPSS v.26

INTERPRETACIÓN

Como el valor de la significancia nos da un valor de $p = <0.001$; entonces aceptamos la hipótesis alterna, por lo que decimos que los halos de inhibición que produce el extracto alcohólico sobre el *Staphylococcus Aureus*, son mayores a 11 mm, que es el diámetro que según Duraffour y Lapraz, se necesita para que se demuestre la acción de un extracto frente a un microorganismo. Por lo que se concluye que existe efecto antibacteriano del extracto alcohólico frente a *Staphylococcus Aureus*.

5.2. Efecto antifúngico in vitro del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* “amay zapato” frente a cepas de *Candida albicans* ATCC 10231.

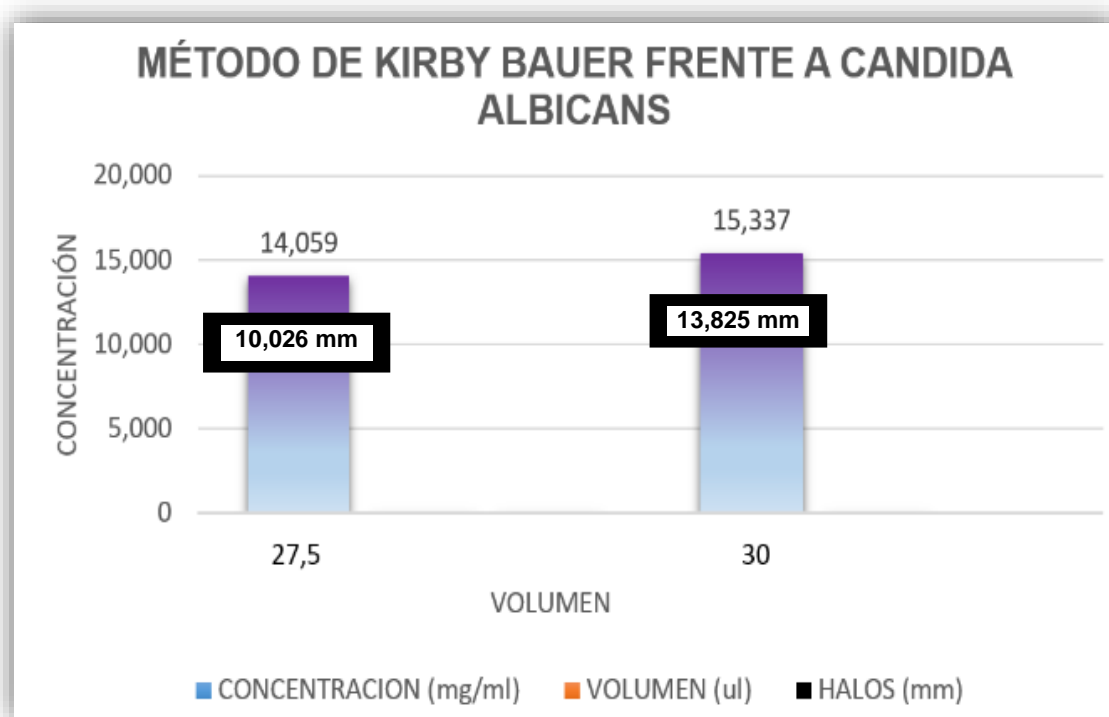
Tabla 6. Volumen y concentración utilizado de extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* frente a *Candida albicans* por el método de difusión de disco (Kirby Bauer).

Volumen (µl)	Concentración (mg/ml)	Halo 1 (mm)	Halo 2 (mm)	Halo 3 (mm)	Halo 4 (mm)	Halo 5 (mm)	Halo 6 (mm)	Halo 7 (mm)	Halo 8 (mm)	∑ de los halos
17,5	8,946	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6
20	10,225	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6
22,5	11,503	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6
25	12,781	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6
27,5	14,059	9,795	9,485	10,08	9,54	10,115	10,4	10,4	10,4	10,026
30	15,337	13,51	12,405	14,37	14,06	12,85	16,23	13,89	13,29	13,825

Fuente: Elaboración propia

En la tabla N° 6 se muestra los resultados de los halos de inhibición (mm) con las diferentes concentraciones mediante el método de Kirby-Bauer obtenidos de las diferentes concentraciones.

Figura 5. Concentraciones representantes del extracto hidroalcohólico frente a *C. Albicans* por el método de difusión del disco.



Fuente: Tabla 6.

En la figura N5° se observa el efecto antifúngico de las 2 concentraciones probadas que se evidenciaron la formación de los halos de inhibición con medidas entre los 10,026 y 13,825 mm de diámetro. Siendo la concentración de 15,337 mg/ml la que generó el halo de mayor tamaño.

Tabla 7. Prueba de normalidad de los halos de inhibición del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* (amay zapato)

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Diámetro C. albicans	.170	16	.200*	.919	16	.162
*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.						
a. Corrección de significación de Lilliefors						

Fuente: Software estadístico SPSS v.26

En la tabla N° 7 se observa los valores de significancia con las pruebas de normalidad son mayores de 0,05 por lo tanto concluimos que los datos (diámetros de inhibición) de inhibición obtenidos frente a *Candida. Albicans* tienen una distribución normal.

Según Duraffour y Lapraz (1983), la susceptibilidad de un microorganismo frente a un extracto alcohólico, se considera sensible si el diámetro de inhibición es superior a 11mm, entonces se plantea lo siguiente:

PLANTEAMIENTO DE LA HIPOTESIS

H0: $\mu < 11\text{mm}$; P > 0,05, SE RECHAZA

Hi: $\mu > 11\text{mm}$; P < 0,05, SE ACEPTA

Tabla 8. Prueba T de Student

Prueba para una muestra							
	Valor de prueba = 11.0						
	t	gl	Significación		Diferencia de medias	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
			P de un factor	P de dos factores		Inferior	Superior
Diametro C. albicans	3.792	15	<.001	.002	1.65312	.7239	2.5824

Fuente: Software estadístico SPSS v.26

INTERPRETACIÓN

Como el valor de la significancia nos da un valor de $p = <0.001$; entonces aceptamos la hipótesis alterna, por lo que decimos que los halos de inhibición que produce el extracto alcohólico sobre el *Candida. Albicans*, son mayores a 11 mm, que es el diámetro que según Duraffour y Lapraz, se necesita para que se demuestre la acción de un extracto frente a un microorganismo. Por lo que se concluye que existe efecto antimicótico del extracto alcohólico frente a *Candida. Albicans*.

5.3. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* “amay zapato” frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 9. MIC del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria Buchtieniana* frente a *Staphylococcus aureus*.

Concentración del extracto hidroalcohólico mg/ml												Control	
T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8	T 9	T 10	T 11	T 12	T 13	
15,335	15.593	15,848	16,104	16,36	16,615	16,871	17,126	17,382	17,638	17,893	(+)	(-)	
30ul	30.5ul	31ul	31,5ul	32ul	32,5ul	33ul	33,5ul	34ul	34,5ul	35ul			
S. A	T	T	T	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	T	NT	

T(n): N° tubo.

T: Presenta turbidez.

NT: No presenta turbidez

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla N° 9 muestra la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria frente a los diferentes tratamientos del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* “amay zapato”, donde se observa que a partir del tubo 5 se inhibe el crecimiento bacteriano. Por tanto, la CMI para Cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 fue de 16,36 mg/ml.

Tabla 10. Prueba de normalidad, MIC de *Staphylococcus aureus*.

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Concentración de PA para <i>S.aureus</i>	.103	11	.200*	.968	11	.860
*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.						
a. Corrección de significación de Lilliefors						

Fuente: Software estadístico SPSS v.26

Interpretación: Según se observa en la tabla N°10 los valores de P son mayores de 0.05, por lo que podemos decir que los valores de las concentraciones para determinar el MIC de *Staphylococcus.aureus* tienen una distribución normal.

5.4. Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana*

“amay zapato” frente a cepas de *Candida albicans*.

Tabla 11. MIC del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* frente a *Candida albicans*

	Concentración del extracto hidroalcohólico mg/ml											Control	
	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8	T 9	T 10	T 11	T 12	T 13
	15,337 30ul	15.848 31ul	16,36 32ul	16,871 33ul	17,382 34ul	17,893 35ul	18,405 36ul	18,916 37ul	19,427 38ul	19,938 39ul	20,45 40ul	(+)	(-)
C. A	T	T	T	T	T	T	T	NT	NT	NT	NT	T	NT

T(n): N° tubo.

T: Presenta turbidez.

NT: No presenta turbidez

Fuente: Elaboración propia.

En la tabla N° 11 muestra la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria frente a los diferentes tratamientos del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* “amay zapato”, donde se observa que a partir del tubo 8 se inhibe el crecimiento micótico. Por tanto, la CMI para Cepa *Candida albicans* ATCC 10231 fue de 18,916 mg/ml.

Tabla 12. Prueba de normalidad, MIC de *Candida albicans*.

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
Concentración de PA para <i>C.albicans</i>	.091	11	.200*	.968	11	.869
*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.						
a. Corrección de significación de Lilliefors						

Fuente: Software estadístico SPSS v.26

Interpretación: Según se observa en la tabla N° 12 los valores de P son mayores de 0.05, por lo que podemos decir que los valores de las concentraciones para determinar el MIC de *Candida Albicans* tienen una distribución normal.

5.5. Concentración Mínima Bactericida (CMB) del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* “amay zapato” frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

Tabla 13. CMB del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* frente a *Staphylococcus aureus*

N° Tubos	N° Placas	Conc. mg/ml	UFC/placa	Obs
5	1	16,36	3	
6	2	16,871	1	CMB
7	3	17,126	1	

Fuente: Tabla 9.

En la tabla N°13 se muestra la determinación de la Concentración Mínima Bactericida, basados a partir de los resultados obtenidos de la tabla N° 9; tomando los tres tubos en donde no se evidenció turbidez. Encontrándose que en el tubo N° 6 a concentración de 16,871mg/ml se ubica el CMB ya que se registra un crecimiento de ≤ 1 UFC/placa.

5.6. Concentración Mínima Fungicida (CMF) del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* “amay zapato” frente a cepas de *Candida albicans*.

Tabla 14. CMF del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* frente a *Candida albicans*

N° Tubos	N° Placas	Conc. mg/ml	UFC/placa	Obs
8	1	18,916	9	
9	2	19,427	2	CMF
10	3	19,938	2	

Fuente: Tabla 11.

En la tabla N°14 se muestra la determinación de la Concentración Mínima Fungicida, basados a partir de los resultados obtenidos de la tabla N° 11; tomando los tres tubos en donde no se evidenció turbidez. Encontrándose que en el tubo N° 9 a concentración de 19,427 mg/ml se ubica el CMF ya que se registra un crecimiento de ≤ 1 UFC/placa.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

La mayoría de las plantas medicinales cultivadas o que crecen en nuestro ámbito territorial se han utilizado para fines terapéuticos desde tiempos remotos y ancestrales hasta la actualidad, siendo utilizados en su mayoría por los sectores más desfavorecidos.

Actualmente representan una enorme reserva de diversidad estructural y bioactividades, pudiendo utilizarse directamente o como punto de partida para la obtención de nuevas moléculas, además de permitir el descubrimiento de nuevos fármacos⁵⁷ ya que la automedicación hace que cada vez los microorganismos patógenos presenten resistencia hacia los fármacos conocidos.

Por consiguiente, en el presente trabajo de investigación se demostró el efecto antibacteriano y antifúngico in vitro del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* Kraenzl “amay zapato” sobre *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

Se utilizó el método de difusión en disco basado en el trabajo de Kirby Bauer y siguiendo el método que el Instituto de estándares para laboratorio clínico (NCCLS) indica; en el cual se depositó sobre la superficie de agar Mueller Hinton de una placa petri previamente inoculada para ambos microorganismos, discos de sensibilidad de prueba antimicrobiana (OXOID) impregnados del extracto vegetal cuya capacidad máxima por disco es de 30 ul. Tan pronto el disco impregnado se puso en contacto con la superficie húmeda del agar, el disco absorbe agua y el extracto vegetal difunde al agar. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición⁵⁸. Y según escala de Duraffour y Lapraz si el halo dio un diámetro mayor a 11 mm. el resultado es positivo, pero si el halo dio un diámetro entre 9 a 11 mm. La actividad se considera intermedia o moderada, y si el halo fue inferior a 9 mm. Se considera sin actividad o negativo⁵³.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se procede a realizar la presente discusión:

Al realizar el método de difusión en disco (Kirby - Bauer) del extracto hidroalcohólico de la *Calceolaria buchtieniana* sobre las cepas

de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, se obtuvo como resultado que posee acción sobre cada microorganismo; en primer lugar, para la cepa de *Staphylococcus aureus* a concentración del extracto hidroalcohólico de 15,337 mg/ml, formó un halo de inhibición bacteriano de 14,096 mm y según la escala de Duraffour y Lapraz al ser el halo de inhibición mayor a 11 significa que el microorganismo es sensible al extracto hidroalcohólico de *Calceolaria Buchtieniana* Kraenzl, por lo que se afirma que presenta efecto antibacteriano.

En segundo lugar, para la cepa de *Candida albicans* a la concentración de 15,337 mg/ml del extracto hidroalcohólico generó un halo de inhibición de 13,825 mm siendo el diámetro de inhibición menor a comparación con la cepa anterior.

Esto demuestra según la escala de Duraffour y Lapraz por la medición de los halos de inhibición que el extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* presenta mayor halo de sensibilidad siendo antibacteriano que antifúngico. Este resultado es similar con el artículo científico realizado por Mostajo M. et al (2018) en Cusco en donde utilizó la planta *Calceolaria*, pero de la especie *scapiflora* en donde utilizó extracto acuoso al 5% en vez de hidroalcohólico y refiere que la

actividad antibacteriana in vitro, se realizó utilizando toda la planta (tallos hojas y flores) de *Calceolaria. scapiflora* y dio como resultado tener efecto bactericida sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25902 con la concentración de 24,200ug/ml, generando un halo de inhibición de 22,8 mm.¹³

Por otro lado, en el artículo científico realizado por Falcao D. Q. et al. (2008) en Brasil, en donde hizo uso de la *Calceolaria*, pero a diferencia de la especie *Buchtieniana*, utilizó *Calceolaria Chelidonioides*, sostuvo que la actividad antibacteriana y antifúngica se debió al uso del extracto etanólico solo de las flores a concentración de 50mg/ml de *C. chelidonioides* mostrando fuerte potencial antibacteriano contra las cepas de *Staphylococcus Aureus* resistentes a la meticilina (MRSA) y el extracto de hojas similar al control elaborado con vancomicina a una concentración de 1mg/ml.¹² En el caso de los hongos se utilizó como control anfotericina B (1mg/ml) en donde se observó un halo de inhibición de menor diámetro, presentando moderada actividad antifúngica. A diferencia de Falcao de solo utilizar extracto etanólico de las flores, en nuestro estudio se hizo extracto

hidroalcohólico utilizando como solvente alcohol al 70° en toda la planta (tallos, hojas y flores). Y bajo el fundamento de este estudio al ser las plantas de la misma familia taxonómica se puede relacionar con nuestro resultado al demostrar mayor actividad antibacteriana y menor actividad antifúngica frente a la cepa de *Candida Albicans*, a concentración del extracto hidroalcohólico de 15,335 mg/ml, generando un halo de inhibición de 14,096 mm como antibacteriano y como antifúngico un halo de inhibición menor 13,825 mm.

Esta propiedad antibacteriana y antifúngica radica en los metabolitos secundarios que conforman esta familia de plantas Calceolariaceae. Al ser nuestra planta de estudio perteneciente a esta familia pero ser de diferente especie se puede inferir que presenta los mismos metabolitos. Trabajos de tesis como el de Enciso M¹⁵ (2015) en donde realizó el análisis fitoquímico de *Calceolaria scapiflora* detectó la presencia de: flavonoides; las cuales han demostrado in vitro su eficacia antimicrobiana frente a una amplia variedad de microorganismos; taninos que en estudios publicados reflejan que pueden ser tóxicos frente a hongos filamentosos / levaduras. De igual forma Mostajo M. et al.¹³ (2018) del análisis fitoquímico de las

estructuras aéreas (tallos, hojas y flores) de *C. scapiflora* y semillas de *P. americana* var. mostró la presencia de metabolitos importantes, se encontró una cantidad abundante de compuestos fenólicos en *Calceolaria scapiflora*. Teniendo en cuenta estas investigaciones se puede decir que los responsables de la formación de halos de inhibición son dichos metabolitos (compuestos fenólicos, taninos) presentes en esta familia *Calceolariaceae* y a estos se deben la actividad antibacteriana y antifúngica que presenta la planta estudiada *Calceolaria buchtieniana* Kraenzl.

Con respecto a la Concentración Mínima Inhibitoria el extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana*, frente a *Staphylococcus aureus*, esta se presentó a la concentración de 16,36 mg/ml, siendo la menor concentración que inhibe el crecimiento bacteriano, en cambio para *Candida albicans* fue de 18,916 mg/ml (tabla 9 y 11), al ser nuestra planta perteneciente al género “calceolaria” dichos resultados tienen relación con el trabajo de investigación de Garrido I. V¹⁰. (2016) en donde evaluó la inhibición de bacterias y hongos patógenos utilizando extractos obtenidos de especies pertenecientes al género *Calceolaria* de Chile en donde sólo tres extractos presentaron actividad

antibacteriana contra las bacterias *E. coli* y *B. cereus*, y menor poder fungicida por ello determinó la concentración mínima inhibitoria del extracto que presentó más poder de inhibición bacteriano, siendo este el extracto de tallos y hojas de *C. angustifolia*; con una MIC bactericida de 500µg/ml de extracto.

Con respecto a la Concentración Mínima Bactericida, el extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* frente a *Staphylococcus Aureus*, la menor concentración capaz de reducir en un 99% de la población bacteriana se presentó en la concentración de 16,871 mg/ml. Visualizándose la formación de una sola colonia.

Enseguida se determinó la Concentración Mínima Fungicida (CMF) para *Candida albicans* en donde la menor concentración capaz de reducir la población bacteriana fue a una concentración de 19,938 mg/ml, concentración bastante elevada y con una susceptibilidad del 98% visualizándose dos colonias, estos resultados nos indican que para causar efecto fungicida sobre la población de hongos aislada, se requieren elevadas concentraciones de *Calceolaria buchtieniana*.

No hay trabajos reportados en la ciudad de Tacna respecto al efecto antibacteriano y antifúngico in vitro del extracto hidroalcohólico

de *Calceolaria buchtieniana* “amayzapato” frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

CONCLUSIONES

PRIMERA: Se determinó que existe efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* Kraenzl “amay zapato” para *Staphylococcus aureus* basado en el método de Kirby – bauer a una concentración de 15,337mg/ml formando un halo de inhibición de 14,096 mm y la interpretación según la escala del grado de sensibilidad de Duraffourd y lapraz es sensible (+)

SEGUNDA: Se determinó que existe efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* Kraenzl “amay zapato” para *Candida albicans* basado en el método de Kirby – bauer a una concentración de 15,337 mg/ml con el cual formó un

halo de inhibición 13,825 mm y la interpretación según la escala del grado de sensibilidad de Duraffourd y lapraz es sensible (+)

TERCERA: Se identificó la concentración mínima inhibitoria (MIC) para *Staphylococcus aureus* a la concentración de 16,36 mg/ml, mientras que para *Candida albicans* a una concentración de 18,916 mg/ml.

CUARTA: Se determinó que la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* Kraenzl. “amay zapato” fue a una concentración de 16,871mg/ml obteniendo disminución bacteriana en un 99.9%.

QUINTA: Se determinó que la concentración mínima fungicida (CMF) del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* Kraenzl “amay zapato” se halló en la concentración de 19,938 mg/ml, obteniendo disminución bacteriana en un 98%.

RECOMENDACIONES

PRIMERA: Tomando en cuenta el presente trabajo se recomienda para futuras investigaciones que el extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana Kraenzl* se realice frente a bacterias gram negativas, de tal modo que se abarcaría las bacterias gram (+) y gram (-) y así se convertiría en una alternativa natural y completa.

SEGUNDA: Asimismo se recomienda realizar pruebas in vivo mediante otros ensayos microbiológicos usando diferentes solventes y concentraciones para así valorar la efectividad y toxicidad que pueden proporcionar los principios activos de *Calceolaria buchtieniana Kraenzl* a través de su aplicación en alguna forma farmacéutica ya que posee múltiples beneficios terapéuticos.

TERCERA: Por último, realizar los métodos de extracción y Screening fitoquímico de las partes de la planta por separado (tallos, hojas

y flores) para así saber que parte de la planta contiene el efecto terapéutico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Medicina Tradicional | INSTITUTO NACIONAL DE SALUD [Internet]. [citado el 15 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://web.ins.gob.pe/es/salud-intercultural/medicina-tradicional>
2. SITUACIÓN DE LAS PLANTAS MEDICINALES EN PERÚ. [citado el 10 de enero de 2023]; Disponible en: www.paho.org
3. thyriflora Grah C, florida R. Hierba dulce / Palo dulce. 2001 [citado el 11 de enero de 2023]; Disponible en: <http://www.chileflora.com/Florachilena/FloraSpanish/HighResPages/SH0036.htm>
4. Kattya B, Calvay GM, Obtener P, Titulo EL, de Biólogo P. Edu.pe. [citado el 13 de enero de 2023]. Disponible en: <https://repositorio.unp.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12676/2926/BIOL-MIC-CAL-2020.pdf?sequence=1&isAllowed=y&fbclid=IwAR3PtqYjw9eY80OUPq1ZVnfNKG87tnDwZJ9xXdEZUM68I34mefM30P98q38>.

5. Rodriguez AP, Miguel J. FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA EFECTO ANTIMICÓTICO IN VITRO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE *Allium sativum* (AJO) EN TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO.
6. Caballero Monge B, Meza Lopez B, Cáceda V, Alexander H. FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA EFECTO ANTIMICÓTICO IN VITRO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Hamelia patens* Jacq. (arco sacha) FRENTE A LA CEPA DE *Candida albicans* TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO AUTORES: ASESOR. [citado el 12 de febrero de 2023]; Disponible en: <https://orcid.org/0000-0002-7549-7256>
7. Prevalencia de infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en heridas crónicas en atención primaria de Lleida: estudio retrospectivo [Internet]. [citado el 12 de febrero de 2023]. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1134-928X2015000400008&fbclid=IwAR27oeJ3cylypfukacrZ3ktxX4jScLVWxW6lObeYYVXeaYW56SbjyXm-dhs

8. Investigador UBB descubre potencial uso de moléculas químicas de Calceolaria para desarrollo de biopesticidas - Portal de Actualidad Universidad del Bío-Bío [Internet]. [citado el 2 de marzo de 2023]. Disponible en: <http://noticias.ubiobio.cl/2014/09/22/investigador-ubb-descubre-potencial-uso-de-moleculas-quimicas-de-calceolaria-para-desarrollo-de-biopesticidas/?print=print>
9. Pieretti S, Saviano A, Mollica A, Stefanucci A, Aloisi AM, Nicoletti M. Calceolarioside A, a Phenylpropanoid Glycoside from Calceolaria spp., Displays Antinociceptive and Anti-Inflammatory Properties. *Molecules* 2022, Vol 27, Page 2183 [Internet]. el 28 de marzo de 2022 [citado el 2 de marzo de 2023];27(7):2183. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/27/7/2183/htm>
10. Rodríguez G, Victoria I. Evaluación antimicrobiana de extractos obtenidos de especies medicinales chilenas pertenecientes al género Calceolaria. 2016 [citado el 2 de marzo de 2023]; Disponible en: <http://repositorio.udec.cl/handle/11594/3278>

11. Medicinales Aromáticas P. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Quantitative screening for alkaloids of native vascular plant species from Chile: biogeographical considerations Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales. 2014 [citado el 2 de marzo de 2023];13(1). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85629766011>
12. Falcão, D. Q., Costa, E. R., Alviano, D. S., Alviano, C. S., Kuster, R. M., & Menezes, F. S. (2006). Atividade antioxidante e antimicrobiana de *Calceolaria chelidonioides* Humb. Bonpl. & Kunth. Revista Brasileira de Farmacognosia: Orgao Oficial Da Sociedade Brasileira de Farmacognosia, 16(1), 73–76. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2006000100013>
13. Mostajo-Zavaleta MN, De F, Torre-Mayorga L, Tito R. Metabolitos secundarios y Actividad bactericida de *Calceolaria scapiflora* (Calceolariaceae) y Semillas de *Persea americana* (Lauraceae). Cantua [Internet]. el 19 de julio de 2018 [citado el 2 de marzo de 2023];17(1):36–42. Disponible en: <https://revistas.unsaac.edu.pe/index.php/cantu/article/view/758/1008>
14. Mendoza-Romero F, Arroyo-Acevedo J. Efecto antioxidante del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria engleriana* Kraenzl “wawillay” in vivo en

15. ratones con lesión hepática. Rev. Peru Med. Integr. [Internet]. 25 de marzo de 2019 [citado 12 de junio de 2023];3(3):118-22. Disponible en: <https://rpm.pe/index.php/rpmi/article/view/525>.
16. Enciso Chinchá MA. Estudio fitoquímico y determinación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico de las flores de *Calceolaria rhacodes* Krazl “calceolaria”. Repositorio institucional - WIENER [Internet]. 2015 [citado el 6 de marzo de 2023]; Disponible en: <https://repositorio.uwiener.edu.pe/handle/20.500.13053/286>
17. Condorhuamán M, Arroyo JL, Herrera O, Rojas LA. EFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Calceolaria myriophylla* “ZAPATILLA” SOBRE EL MODELO DEL SÍNDROME METABÓLICO INDUCIDO POR FRUCTOSA EN RATAS. Cienc Invest [Internet]. el 31 de diciembre de 2014 [citado el 6 de marzo de 2023];17(2):98–101. Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/13597>
18. Puppo P. El género *Calceolaria* (Calceolariaceae) en el departamento de Lima-Perú. Rev Peru Biol [Internet]. 2006 [citado el 6 de marzo de 2023];13(1):85–93. Disponible en:

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332006000100004&lng=es&nrm=iso&tlng=es

19. worldfloraonline.org [Internet]. Worldfloraonline.org. [citado el 8 de junio de 2023]. Disponible en: <http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000579325>
20. Leiva González S. Diversidad del género *Calceolaria* L. (Calceolariaceae) en el distrito Salpo, provincia Otuzco, región La Libertad, y una nueva especie del norte del Perú. *Arnaldoa*. el 31 de agosto de 2018;25(2).
21. Efecto hipotensor del extracto acuoso de *Calceolaria myriophylla* kraenz en ratas hipertensas inducidas por L-NAME [Internet]. [citado el 7 de marzo de 2023]. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/238>
22. Bussmann RW. PLANTAS MEDICINALES DE LOS ANDES Y LA AMAZONIA-La Flora mágica y medicinal del Norte del Perú Medicinal plants and their ecology in Northern Peru and Southern Ecuador View project Ethnobotany and livelihoods in Madagascar and Eastern Africa View project. [citado el 7 de marzo de 2023]; Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/283355334>

23. Rodríguez Berrios KYX. Comparación del efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de las semillas de moringa oleífera frente a gentamicina y nitrofurantoína, sobre escherichia coli ATCC 35218 Tacna – 2017. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann [Internet]. 2018 [citado el 7 de marzo de 2023]; Disponible en: <http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/3311>
24. Almeyda Rodas WA. Fenoles totales y actividad antioxidante del extracto atomizado de las hojas de Calceolaria engleriana Kraenzl “wawillay”, Ayacucho 2017. 2017; [citado el 7 de marzo de 2023]. Disponible en: http://repositorio.unsch.edu.pe/bitstream/UNSCH/4134/1/TESIS%20Far465_Alm.pdf
25. Extracción. - la solución extraída en su disolvente (solución extractiva) - su residuo - PDF Descargar libre [Internet]. [citado el 7 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://docplayer.es/3583073-Extraccion-la-solucion-extraida-en-su-disolvente-solucion-extractiva-su-residuo.html>
26. Destilación | ✓ Métodos de Separación de Mezclas [Internet]. [citado el 7 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://metodosdeseparaciondemezclas.com/destilacion/>

27. Introducción a las bacterias grampositivas - Infecciones - Manual MSD versión para público general [Internet]. [citado el 13 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-pe/hogar/infecciones/infecciones-bacterianas-bacterias-grampositivas/introducci%C3%B3n-a-las-bacterias-grampositivas>
28. MELLA M S. Avances terapéuticos contra infecciones producidas por especies Gram positivas resistentes. Revista chilena de infectología [Internet]. 2002 [citado el 13 de marzo de 2023]; 19:237–46. Disponible en: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182002019300015&lng=es&nrm=iso&tlng=es
29. De F, Farmacéuticas C, Biotecnológicas Y, Profesional E, Farmacia DE, Bioquímica Y. Evaluación In Vitro del Efecto Antimicrobiano del Aceite Esencial de Luma Chequen (Molina) A. Gray (Arrayán) sobre Staphylococcus Aureus, Staphylococcus Epidermidis, Escherichia Coli, Pseudomona Aeruginosa y Candida Albicans. Universidad Católica de Santa María - UCSM [Internet]. el 21 de junio de 2017 [citado el 8 de marzo de 2023]; Disponible en: <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/6322>

30. Crecimiento bacteriano. Modelos predictivos de ComBase [Internet]. [citado el 16 de marzo de 2023]. Disponible en: http://coli.usal.es/web/demos/demo_alteracion/FactoresCrecimiento/FactoresCrecimiento.html
31. Microbiología: Curva del Crecimiento [Internet]. [citado el 16 de marzo de 2023]. Disponible en: <http://microbiologia3bequipo5.blogspot.com/2014/10/curva-del-crecimiento.html>
32. Curva de crecimiento bacteriana en la producción de proteínas recombinantes [Internet]. Gov.py. [citado el 16 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.conacyt.gov.py/node/1915>
33. Bravo Ramos CL, Saravia Chaiña M. Efecto antimicrobiano in vitro del extracto de *Lessonia nigrescens* (aracanto) frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Universidad Católica de Santa María [Internet]. el 29 de octubre de 2019 [citado el 8 de marzo de 2023]; Disponible en: <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/9570>
34. Algunas consideraciones sobre *Candida Albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta Odontol Venez* [Internet]. 2002 [citado el 16 de marzo de 2023];40(1):9–17. Disponible en:

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-63652002000100003&lng=es&nrm=iso&tlng=es

35. Ciencias Farmacéuticas Y Bioquímica F DE, Bioquímico Bach F, Astocondor Jenny Janet Bach L, Henostroza Mery Ysabel P, Roa Chunga Luis Q. Efecto antifúngico del extracto hidroalcohólico de las hojas de petiveria alliacea L. (mucura) frente a cepas de candida albicans in vitro. Repositorio Institucional - UIGV [Internet]. el 6 de septiembre de 2018 [citado el 8 de marzo de 2023]; Disponible en: <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/2989>
36. Rodriguez AP, Miguel J. FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA EFECTO ANTIMICÓTICO IN VITRO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE Allium sativum (AJO) EN TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO.
37. Wilman Ruíz Vigo D, Milagros Ñontol Vásquez Stephany Daleska Portal Díaz Asesor L, Blgo Héctor Emilio Garay Montañez M. UNIVERSIDAD PRIVADA ANTONIO GUILLERMO URRELO Facultad de Ciencias de la Salud. 2020

38. UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA FACULTAD DE CIENCIA DE LA SALUD ESCUELA PROFESIONAL DE ODONTOLOGÍA "EFECTO ANTIMICÓTICO DEL EXTRACTO ACUOSO Y ETANÓLICO DE LA *Caesalpinia spinosa* SOBRE LA *Candida albicans* ATCC.
39. Katty B, Calvay GM, Obtener P, Título EL, De Biólogo P. UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS.
40. Alejandra Lida Espinoza Mormontoy B. Actividad antioxidante y antibacteriana in vitro del extracto seco hidroalcohólico al 70% de *Caiophora cirsiifolia* C. Presl "Ccori kisa" sobre cepas ATCC y cepas aisladas de *Staphylococcus aureus*. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco [Internet]. 2018 [citado el 8 de marzo de 2023]; Disponible en: <https://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/20.500.12918/3559>
41. Yeni Huaman Enriquez Bach Yaneth Roxana Oroche Soto B, Lelia Rodríguez Torres McM, Carlos Moreyra Pachas Blga Lilia D Gutierrez Moreno QA. UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA Tesis para Optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico PRESENTADO POR:

“DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y CLOROFÓRMICOS DE *Oenothera rosea* ‘YAWAR CHONQ’A’ Y *Geranium sessiliflorum* ‘OJOTILLO’ FRENTE A *Staphylococcus aureus* CEPA ATCC Y *Escherichia coli* CEPA ATCC Y DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA POR VÍA ORAL”.

42. Garzón JP, Martínez SR, L MM. *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. NOVA [Internet]. el 23 de octubre de 2019 [citado el 8 de marzo de 2023];17(32):25–38. Disponible en: <https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/1030>
43. Choque C, Mariza M, Pauro Q, Elvira V, Asesor QF, Torres QF, et al. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana In Vitro del Extracto de *Achyrocline Alata* (Huirá Huirá) en Cepas de *Staphylococcus Aureus*, *Escherichia Coli* y *Pseudomona Aeruginosa*. Universidad Católica de Santa María - UCSM [Internet]. el 24 de noviembre de 2017 [citado el 8 de marzo de 2023]; Disponible en: <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/6847>
44. Bobadilla AE, Enrique L, Sanchez Moreno A, Melvin H. Efecto antibacteriano in vitro de extractos hidroalcohólicos de los frutos de

Vaccinium corymbosum (arándano) y vaccinium floribundum (mullaca) sobre staphylococcus aureus. Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote [Internet]. el 22 de febrero de 2021 [citado el 16 de marzo de 2023]; Disponible en: <https://repositorio.uladech.edu.pe/handle/20.500.13032/20493>

45. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio [Internet]. [citado el 9 de marzo de 2023]. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010
46. García Rodríguez Rafael Cantón J Elías García Sánchez M^a Luisa Gómez-Lus Luis Martínez Martínez Carmen Rodríguez-Avial Jordi Vila JA. Procedimientos en Microbiología Clínica.
47. Scanned Document [Internet]. [citado el 9 de marzo de 2023]. Disponible en: https://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:5QofUyjFDMAJ:https://www.ispch.cl/sites/default/files/resolucion/2016/04/Resolucion_Exenta_N_1350.pdf&cd=6&hl=es-419&ct=clnk&gl=pe
48. Pruebas de sensibilidad o antibiogramas - Enfermedades infecciosas - Manual MSD versión para profesionales [Internet]. [citado el 9 de marzo


- de 2023]. Disponible en: <https://www.msdmanuals.com/es-pe/professional/enfermedades-infecciosas/diagn%C3%B3stico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas>
49. Ispch.cl. [citado el 9 de marzo de 2023]. Disponible en: https://www.ispch.cl/sites/default/files/Recomendacion_Contro_Calidad_Bacteriologia.pdf
50. Paredes F, Roca JJ. Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Offarm* [Internet]. el 1 de marzo de 2004 [citado el 9 de marzo de 2023];23(3):116–24. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-accion-antibioticos-perspectiva-medicacion-antimicrobiana-13059414>
51. La importancia de las cepas ATCC Microbiologics en tus cultivos para microbiología – MDM Científica [Internet]. [citado el 9 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://mdmcientifica.com/cepasatcc/>
52. Rodríguez Berrios KYX. Comparación del efecto antimicrobiano in vitro del aceite esencial de las semillas de moringa oleífera frente a gentamicina y nitrofurantoína, sobre escherichia coli ATCC 35218 Tacna – 2017. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann [Internet]. 2018 [citado el

- 9 de marzo de 2023]; Disponible en:
<http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/3311>
53. Discos para pruebas de sensibilidad | Fisher Scientific [Internet]. [citado el 9 de marzo de 2023]. Disponible en:
<https://www.fishersci.es/es/es/browse/90222069/susceptibility-testing-discs>
54. Neyra Guerrero B, Percy Asesor J, Paola Beatriz La Serna Solari MC. Facultad de Ciencias de la Salud Escuela Académico Profesional de Estomatología tesis para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista. [citado el 9 de marzo de 2023]. Disponible en:
<https://repositorio.uss.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12802/4528/Neyra%20Guerrero%20Jes%C3%BAs%20Percy.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
55. Definición de inóculo [Internet]. [citado el 9 de marzo de 2023]. Disponible en: <https://www.onsalus.com/definicion-de-inoculo-18541.html>
56. Maquera Coillo JB. Actividad antibacteriana del extracto del *Pelargonium hortorum* (geranio) frente a *Streptococcus mutans*. Tacna 2016. Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann [Internet]. 2019 [citado el 16 de marzo de 2023]; Disponible en:
<http://repositorio.unjbg.edu.pe/handle/UNJBG/3656>

57. Espadero M, Avilés H, Armijos L, Ávila L, Idrovo L, Idrovo M, et al. EVALUACIÓN MICROBIOLÓGICA Y COMPOSICIÓN QUÍMICA DE EXTRACTOS ORGÁNICOS DE *Euphorbia aff. viridis* (Klotzsch & Garcke) Boiss SOBRE *Staphylococcus Aureus*, *Klebsiella Pneumoniae* Y *Escherichia Coli*. LA GRANJA Revista de Ciencias de la Vida [Internet]. 2019 [citado el 17 de marzo de 2023];29(1):119–29. Disponible en: http://scielo.senescyt.gob.ec/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1390-85962019000100119&lng=es&nrm=iso&tlng=es
58. Las plantas medicinales como fuentes de fármacos [Internet]. Farmaceuticos.com. [citado el 19 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.farmaceuticos.com/pam/temas/plantas-medicinales/las-plantas-medicinales-como-fuentes-de-farmacos/>
59. Picazo JJ, Cantón R, Elías J, Sánchez G, Luisa M, Luis G-L, et al. Procedimientos en Microbiología Clínica [Internet]. Seimc.org. [citado el 19 de junio de 2023]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientos-microbiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>

ANEXOS

Anexo 1. Boleta de adquisición de cepas ATCC.



GenLab
del Perú SAC
Tecnologías para la Vida

COTIZACION GL - 22 / 053222

FECHA: miércoles, 20 de Abril de 2022

CLIENTE: UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE G
ATENCION: jesyca mayta jessy.a0366@gmail.com

REFERENCIA: Cepas de referencia
Los Precios Incluyen I.G.V. (18%) de Ley

PRECIO: **NUEVOS SOLES** VALIDEZ: 7 DIAS
ENTREGA: **A 60 DIAS** PAGO: **FACTURA 30 DIAS**

CODIGO	PRODUCTO	PRECIO UNITARIO S/.	CANT	PRECIO TOTAL S/.
H05595-A	KWIK-STIK Staphylococcus aureus subsp. aureus derived from ATCC® 6538P™ Marca: Microbiologics Cod. Proveedor: 0827P Expira: No menor a 06 meses. KWIK-STIK: Pack de 2 cepas liofilizadas no mayor al 3er. pasaje + Certificado de Análisis. Producto sujeto a disponibilidad del proveedor y a la política de fechas de expira de Microbiologics.	430.74	1	430.74
H03918-A	KWIK-STIK Candida albicans derived from ATCC® 10231™ Marca: Microbiologics Cod. Proveedor: 0443P Expira: No menor a 06 meses. KWIK-STIK: Pack de 2 cepas liofilizadas no mayor al 3er. pasaje + Certificado de Análisis. Producto sujeto a disponibilidad del proveedor y a la política de fechas de expira de Microbiologics.	476.04	1	476.04
TOTAL				906.77



Ver términos y condiciones.

BLGA. TANIA HERNANDEZ
Asesor Comercial
thernandez@genlabperu.com

Realice el pago con cheque a nombre de GEN LAB DEL PERU S.A.C., en caso de Depósito Bancario, realice el abono en nuestra Cuenta Bancaria:
 Banco Continental - Soles 0011-0139-0100024183-34 ó Banco BCP - Soles 193-1440607-0-84
 CCI Continental - Soles 011-139-000100024183-34 ó CCI Banco BCP - Soles 002-193-001440607084-18


Jr. Capac Yupanqui N° 2434 - (Alt. Cdra. 8 Av. 2 de Mayo) - Lince - Lima 14 PERU
 Telf.: 2037500 / 2037504 TeleFax: (51-1) 2037501
 e-mail: ventas@genlabperu.com

Anexo 2. Instrucciones de activación de liofilizado de cepas ATCC

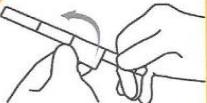



INSTRUCCIONES CON ILUSTRACIONES

- 1




Deje que la bolsa de KWIK-STIK sin abrir se adapte a la temperatura ambiente. Abra la bolsa rasgando a la altura de la muesca y quite la unidad de KWIK-STIK.
- 2




Retire la porción de la etiqueta de tirar y rasgar y colóquese a la placa de cultivo principal o al registro de CC. No desarme el dispositivo durante la hidratación.
- 3


Sobre el borde de la mesa de trabajo o la encimera, agriete la ampolla en la parte superior de KWIK-STIK (justo debajo del menisco del líquido de la ampolla) para liberar el líquido hidratante.
- 4




Manténgalo vertical y golpee suavemente sobre una superficie dura para facilitar el flujo del líquido por el mango hasta la parte inferior de la unidad que contiene el gránulo.
- 5



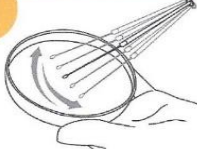
Apriete la parte inferior de la unidad para que el gránulo se disuelva en el líquido hasta lograr una suspensión homogénea.
- 6




De inmediato, sature el hisopo abundantemente con el material hidratado y transfíralo al medio con agar correspondiente o utilícelo según el procedimiento operativo estándar del laboratorio.
- 7



Inocule la placa de cultivo principal girando con suavidad el hisopo sobre un tercio de la placa.
- 8



Por medio de un asa esterilizada, haga estrías para facilitar el aislamiento de la colonia.
- 9

Descarte el KWIK-STIK de forma apropiada para desechos de riesgo biológico. 
- 10

De inmediato, incube la(s) placa(s) invertida(s) de cultivo principal Inoculada(s) a temperatura y en condiciones apropiadas para el microorganismo.
Para ver el método de cultivo ingrese a la página del producto en www.microbiologics.com.

PL 194.SPAN.LA Rev D
2021.MAY.14

Español

Página 6 de 7

Anexo 3. Identificación taxonómica

CONSTANCIA DE IDENTIFICACION TAXONOMICA

Yo Dr. Pablo Juan Franco León Docente de la Facultad de Ciencias, de la Cátedra de Botánica de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, dejo constancia que:

La muestra alcanzada al laboratorio de Botánica por **Jessyca Mayta Jaliri**, identificado con DNI N° 47571102; estudiante de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna, cuya determinación taxonómica servirá para la realización del proyecto de Tesis: "Efecto antibacteriano y antifúngico in vitro del extracto hidroalcohólico de *Calceolaria buchtieniana* Kraenzl "Amayzapato" sobre *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, ha sido estudiada y clasificada como: *Calceolaria buchtieniana* Kraenzl y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISIÓN MAGNOLIOPHYTA

CLASE MAGNOLIOPSIDA

ORDEN LAMIALES

FAMILIA CALCEOALIACEAE

GÉNERO *Calceolaria*

ESPECIE *Calceolaria buchtieniana*

Nombre vulgar: Amayzapato

Se expide la presente Constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que hubiera lugar.

Tacna, 14 de junio del 2022



Blgo. Pablo Juan Franco León
C.B.F. 2097

Anexo 4. Matriz de consistencia

Efecto antibacteriano y antifúngico in vitro del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria buchtieniana</i> Kraenzl "amay zapato" sobre <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Candida albicans</i>					
PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA	TÉCNICAS/INSTRUMENTO
<p>Problema general ¿Existirá efecto antibacteriano y antifúngico in vitro del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria buchtieniana</i> "amay zapato" sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Candida albicans</i> ATCC 10231?</p> <p>Problema específicas a) ¿Cuál será el efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria buchtieniana</i> "amay zapato" sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538? b) ¿Cuál será el efecto antifúngico in vitro del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria buchtieniana</i> "amay zapato" sobre <i>Candida albicans</i> ATCC 10231? c) ¿Cuál será la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria buchtieniana</i> "amay zapato" frente a</p>	<p>Objetivo General Demostrar el efecto antibacteriano y antifúngico "in vitro" del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria buchtieniana</i> "amay zapato" sobre <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p> <p>Objetivos Específicos a) Determinar el efecto antibacteriano y antifúngico del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria buchtieniana</i> "amay zapato" mediante el método de difusión en disco Kirby-Bauer. b) Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria buchtieniana</i> "amay zapato" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538. c) Identificar la concentración mínima bactericida (CMB)</p>	<p>Hipótesis alterna Existe efecto antibacteriano y antifúngico "in vitro" sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p> <p>Hipótesis nula No existe efecto antibacteriano y antifúngico "in vitro" sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p>	<p>Variable Independiente Extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria buchtieniana</i> "amay zapato"</p> <p>Indicador:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Diámetro de halo de inhibición. • Diámetro de halo de inhibición (Según las pautas de Duraffourd) <p>Variable Dependiente</p> <ul style="list-style-type: none"> • Agente bacteriano patógeno <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 • Agente micótico patógeno <i>Candida albicans</i> ATCC 10231. <p>Indicador: Crecimiento micótico y antibacteriano de la cepa.</p>	<p>TIPO DE ESTUDIO Aplicada, prospectivo</p> <p>DISEÑO DE INVESTIGACION No experimental, transversal</p> <p>NIVEL DE INVESTIGACIÓN: Exploratorio.</p> <p>POBLACIÓN: Cepas liofilizadas de <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 y Cepa <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538</p> <p>MUESTRA: 48 Repeticiones del número de placas Petri.</p>	<p>Método: Prueba de sensibilidad antibiótica (PSA).</p> <p>Análisis: Estadística descriptiva e inferencial</p> <p>Técnicas de recogida de datos: Medición de halos de inhibición de crecimiento bacteriano.</p> <p>Materiales</p> <ul style="list-style-type: none"> • Agar Sabouraud • Agar Papa dextrosa Petri. • Agar Nutritivo • TSA • Agar Base sangre

<p><i>Candida albicans</i> ATCC 10231 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538?</p> <p>d) ¿Cuál será concentración mínima bactericida (CMB) y la concentración mínima fungicida (CMF) del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria buchtieniana</i> "amay zapato" frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 y <i>Candida albicans</i> ATCC 10231?</p>	<p>del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria buchtieniana</i> "amay zapato" frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.</p> <p>d) Determinar la concentración mínima fungicida (CMF) del extracto hidroalcohólico de <i>Calceolaria buchtieniana</i> "amay zapato" frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.</p>		<p><u>Escala de Medición</u> Turbidez UFC</p>		<ul style="list-style-type: none"> • Agar Mueller Hinton <p>-Material de vidrio -Equipos de Laboratorio</p>
---	---	--	--	--	--

Anexo 5. Extracto hidroalcohólico obtenido a partir de *Calceolaria Buchtieniana*.

1° Pesado de la planta "*Calceolaria Buchtieniana*"



Figura 6. *Calceolaria Buchtieniana*
Fuente: Elaboración propia.

2° Doble filtrado del extracto hidroalcohólico para que quede libre de impurezas.



Figura 7. Filtrado de *Calceolaria Buchtieniana*
Fuente: Elaboración propia.

3° Extracto hidroalcohólico llevado a la estufa a 40°C por 24 horas.



Figura 8. *Calceolaria Buchtieniana* llevada a estufa.
Fuente: Elaboración propia.

4° Luego de permanecer en la estufa se obtuvo la muestra, la cual raspamos con un bisturí.



Figura 9. Placa Petri conteniendo el P.A
Fuente: Elaboración propia.

5° Se puso en un tubo de ensayo el P.A dando un peso de 2g el cual fue disuelto con la ayuda de un rotador con 4 ml de agua destilada.



Figura 10. Tubo de ensayo conteniendo el P.A.
Fuente: Elaboración propia.

Anexo 6. Activación y siembra de la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Candida albicans* ATCC 10231.

1° Se procede a revisar que las cepas ATCC con las que vamos a trabajar, hayan llegado en óptimas condiciones.



Figura 11. KwikStik conteniendo las cepas a estudiar.
Fuente: Elaboración propia.

2° Con todas las medidas de seguridad activamos el liofilizado
conteniendo las cepas en los diferentes agares para su crecimiento.

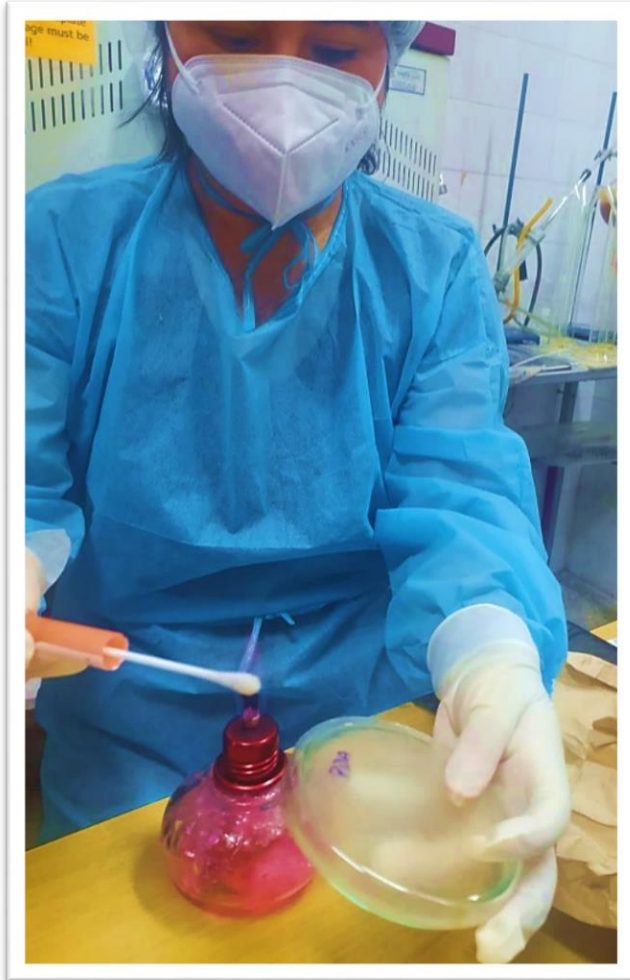


Figura 12. Activación del liofilizado.
Fuente: Elaboración propia.

3° Se activaron los liofilizados de los dos microorganismos a las 24 horas y se guardaron a refrigerar.



Figura 13. Cepa *Staphylococcus Aureus* en agar nutritivo.
Fuente: Elaboración propia

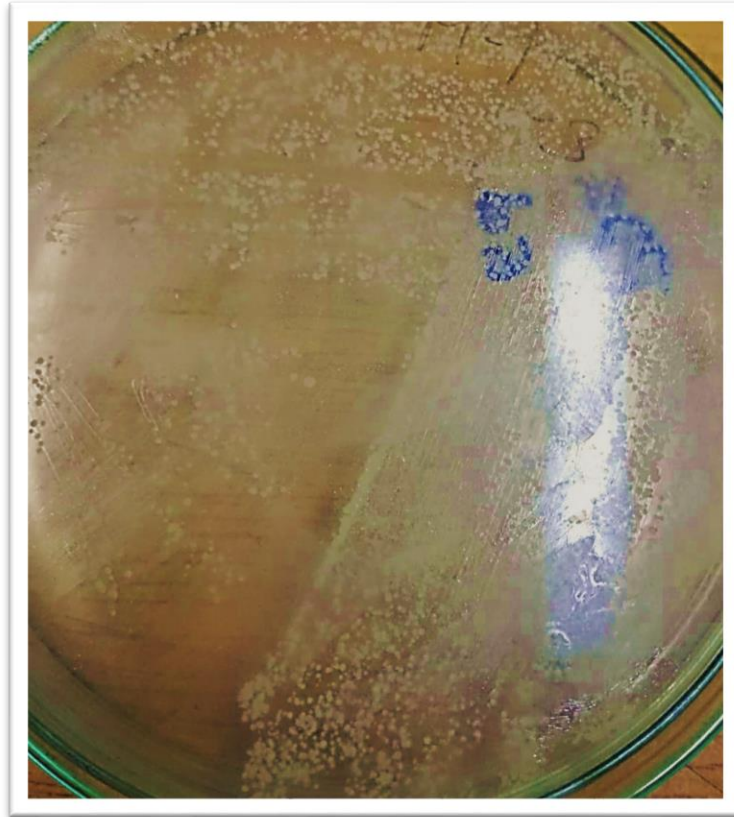


Figura 14. Ceba *Candida Albicans* en agar Sabouraud
Fuente: Elaboración propia

3° Se tomó muestra de cada microorganismo para hacer siembra en caldo BHI 24 horas a 37°C, pasado el tiempo se vuelve a sembrar en agar nutritivo y despues otra vez en caldo de 2-3 horas a 37° para observar la turbidez a la escala de Mc Farland.



Figura 15. Turbidez a 0,5 escala de McFarland
Fuente: Elaboración propia

Anexo 7. Preparación de sensibilidad antimicrobiana, técnica de difusión en agar o Kirby Bauer.

1° Los discos de sensibilidad los humedecemos con agua destilada y los colocamos en las paredes en un vaso de precipitado, enseguida forramos la parte superior de este con papel craft para llevarlo al autoclave por 15 min. y así desnaturalizar al antibiótico. Dejamos dos discos de sensibilidad para que sea nuestro control positivo.



Figura 16. Discos de sensibilidad “OXOID”
Fuente: Elaboración propia

2. Una vez que nuestros discos de sensibilidad han sido desnaturalizados, con la ayuda de una micropipeta los humedecemos con las las diferentes concentraciones de *Calceolaria Buchtieniana*.

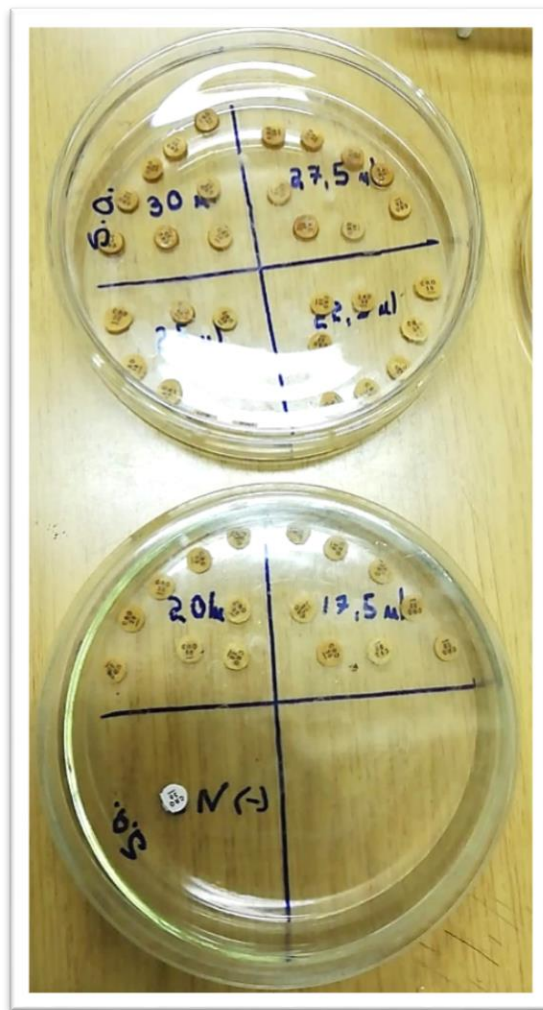


Figura 17. Discos de sensibilidad con diferentes concentraciones.
Fuente: Elaboración propia

3. En las placas Petri que contienen agar Mueller Hinton se hizo siembra de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* una vez que presentaron crecimiento se colocó los discos con nuestro P.A formando halos de inhibición.

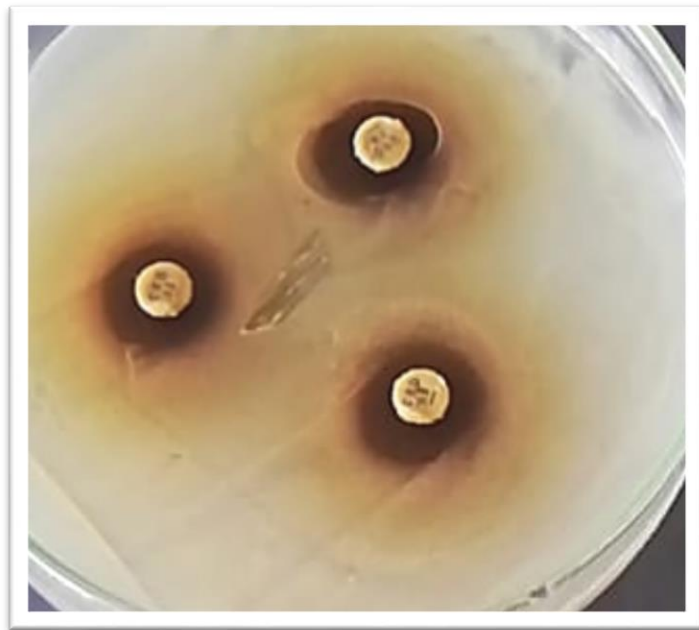


Figura 18. Kirby bauer en agar Mueller Hinton para *Staphylococcus Aureus*

Fuente: Elaboración propia

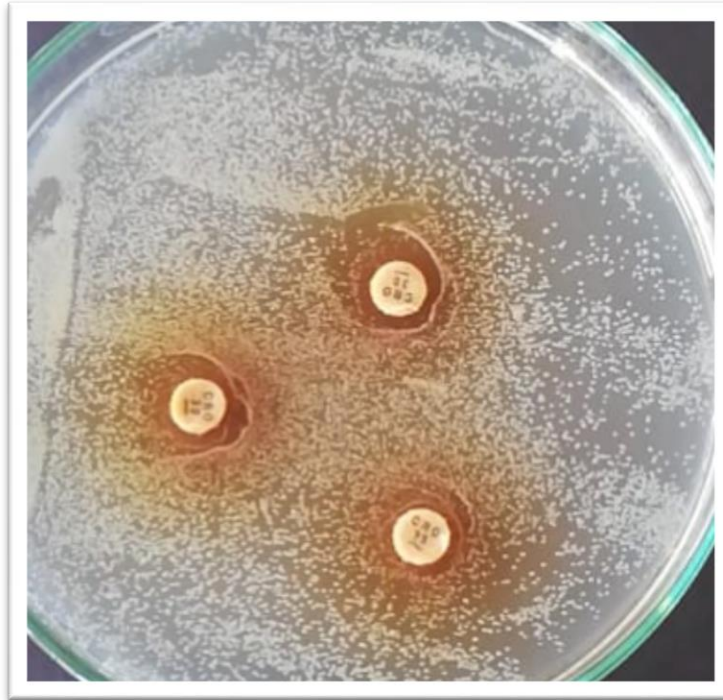


Figura 19. Kirby bauer en agar Mueller Hinton para *Candida albicans*.

Fuente: Elaboración propia

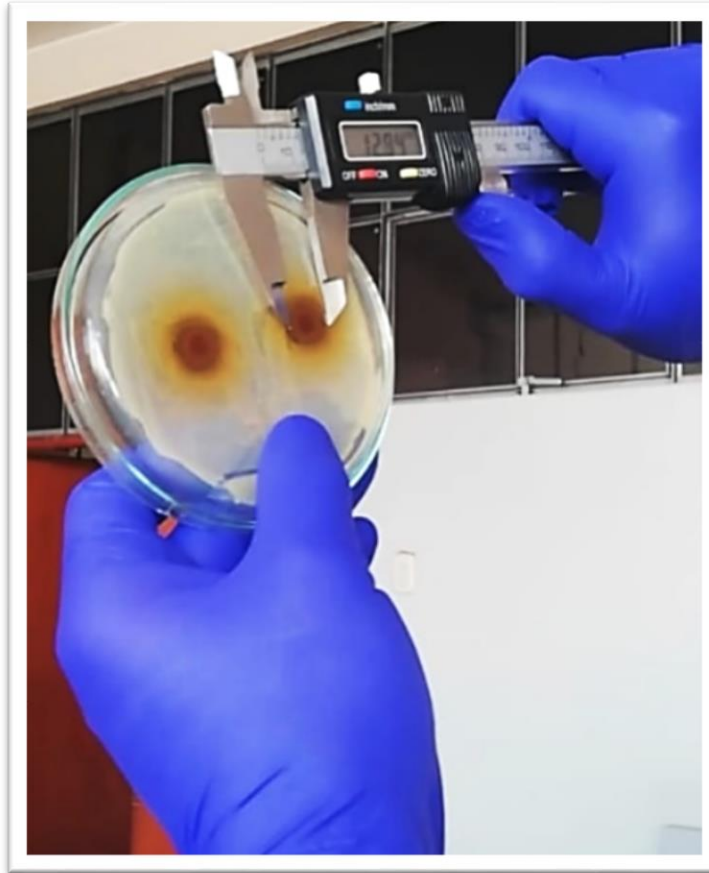


Figura 20. Medición de los halos de inhibición.
Fuente: Elaboración propia

Anexo 8. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI); determinación de la concentración mínima bactericida y fungicida (CMB) - (CMF).

1. Preparamos 11 tubos que contienen el P.A con cada una de las diferentes concentraciones por triplicado para así observar en que tubo se presenta el MIC para cada microorganismo.



Figura 21. Método de micro dilución en caldo BHI.
Fuente: Elaboración propia

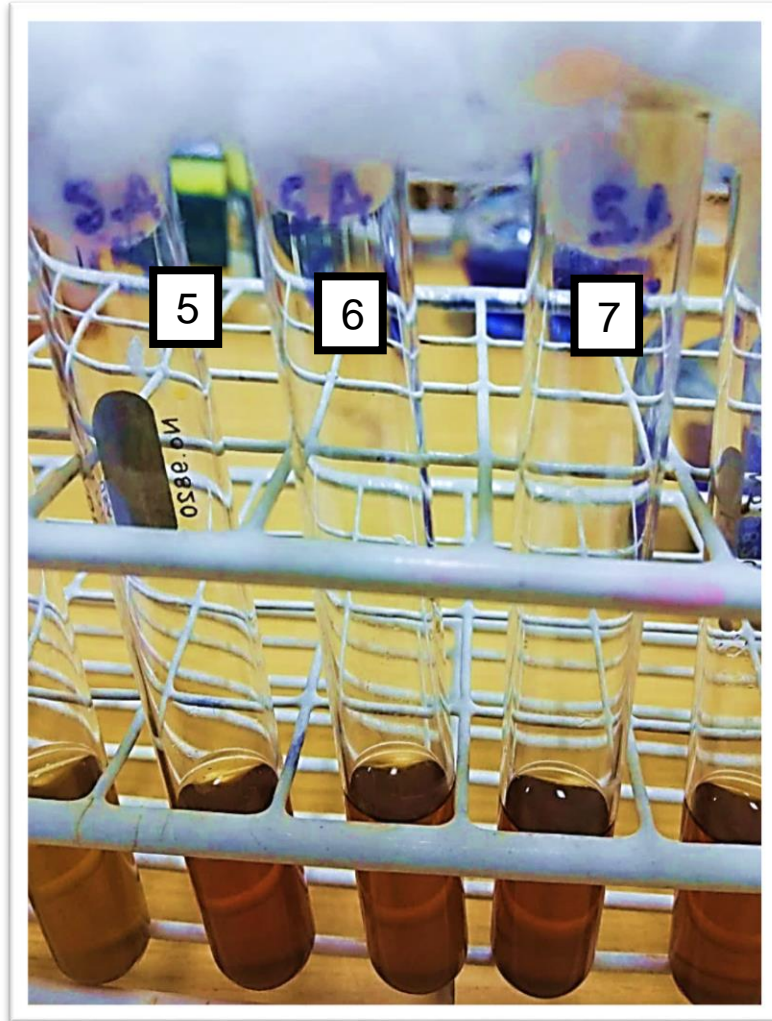


Figura 22. MIC tubo número 5 para *Staphylococcus aureus*.
Fuente: Elaboración propia

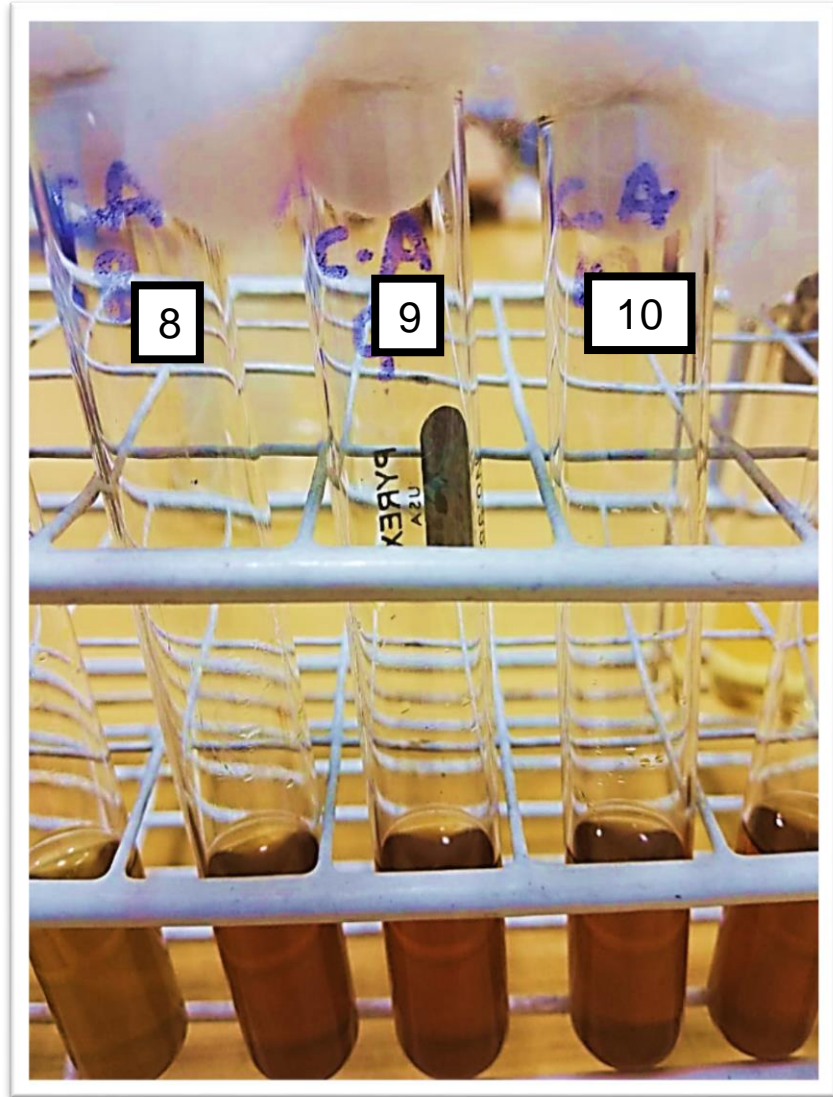


Figura 23. MIC tubo número 8 para *Candida albicans*.
Fuente: Elaboración propia

2. Se tomo los dos tubos consecutivos a partir del tubo numero 5 y se hizo siembra por diseminación para así saber el CMB para *Staphylococcus Aureus*.



Figura 24. Siembra de los tubos 5, 6 y 7 para *Staphylococcus Aureus*.

Fuente: Elaboración propia

3. Pasado las 24 horas se observó el crecimiento de colonias presentando la placa Petri que fue sembrada con el tubo número 6 solo una colonia matando así al 99% de bacterias.

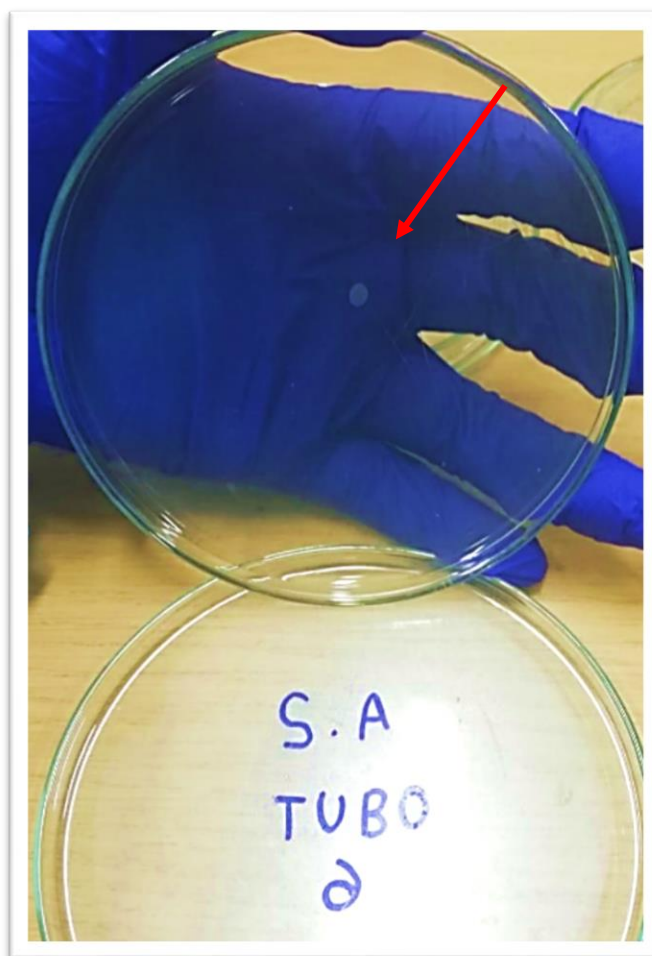


Figura 25. CMB para *Staphylococcus aureus*.
Fuente: Elaboración propia

4. Se tomó los dos tubos consecutivos a partir del tubo número 8 y se hizo siembra por diseminación para así saber el CMF para *Candida albicans*.

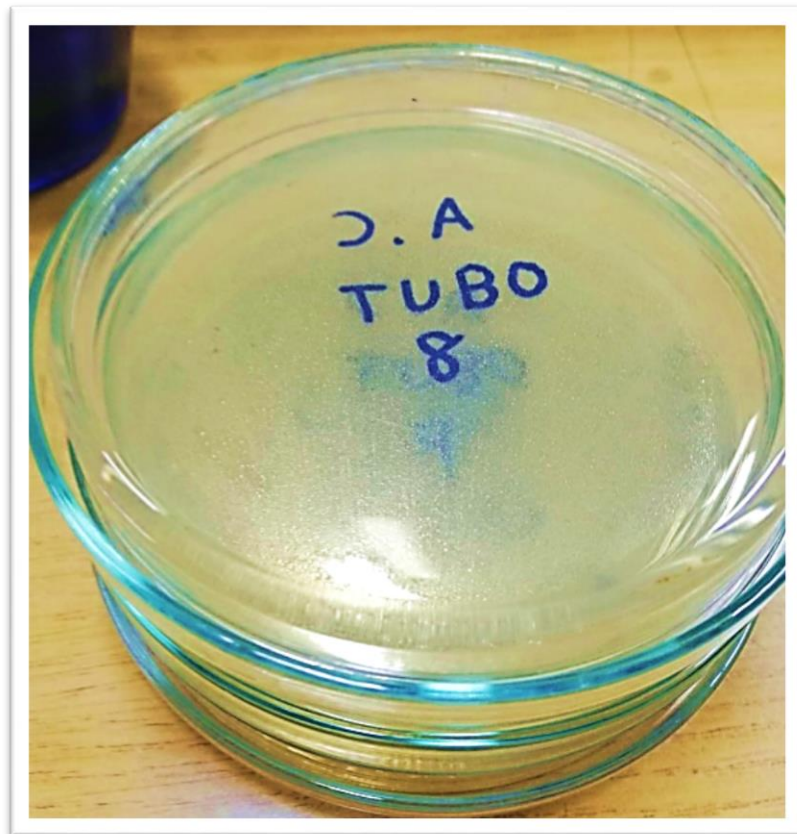


Figura 26. Siembra de los tubos 8, 9 y 10 para *Candida albicans*.
Fuente: Elaboración propia

5. Pasado las 24 horas se observó el crecimiento de colonias presentando la placa Petri que fue sembrada con el tubo número 9 solo dos colonias matando así al 98% de hongos.

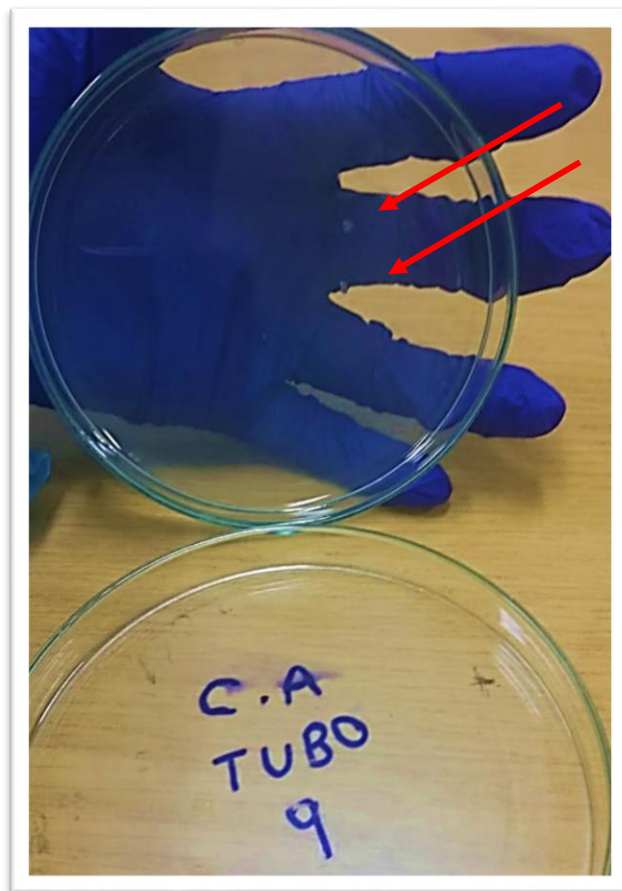


Figura 27. CMF para *Candida albicans*.
Fuente: Elaboración propia