



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**EFEECTO ANTIBACTERIANO “*In Vitro*” DEL EXTRACTO  
ETANÓLICO DE *Tropaeolum tuberosum* “ISAÑO” SOBRE  
*Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus* DE  
GESTANTES CON INFECCIÓN DEL TRACTO URINARIO**

**TESIS**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. YON MAMANI CCARITA**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:**

**LICENCIADO EN BIOLOGÍA**

**PUNO – PERÚ**

**2022**



## DEDICATORIA

*A Dios por darme la vida, salud y fuerzas necesarias para seguir adelante, y lograr mis metas, además de su amor e infinita bondad, por iluminar mi mente, fortaleciendo mi corazón.*

*A mis padres, Roque y Paula, con todo mi cariño y amor, porque a ellos les debo todo lo que soy, por su apoyo constante y su sacrificio incondicional, en los momentos más complicados y sobre todo siempre creyeron en mí persona, haciendo lo posible que llegara hasta aquí, para lograr mis metas, a ustedes mi eterno agradecimiento.*

*A mi amada novia Olinda por ser el apoyo incondicional en mi vida, ya que, con su amor y respaldo, han motivado lograr este objetivo.*

*A mis hermanos Hilario, Clara, Alex y Grover que siempre estaban ahí apoyándome para tener fuerzas necesarias, en los momentos más difíciles, me impulsaron a seguir adelante mediante las acciones de unidad y palabras reconfortantes.*

*A todos ellos que son una pieza fundamental en mi vida, porque de ellos aprendí y crecí, mental y espiritualmente, porque sé que, aunque muchos se alejaron, solo ellos siempre se mantendrían junto a mí, ya sea en los momentos de júbilo como en la dificultad, aun cuando no estemos físicamente juntos, nuestros corazones lo estarán eternamente unidos por siempre.*

*Yon Mamani Ccarita*



## AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar, a Dios, nuestro Padre Celestial, quien tiene todo el poder y la sabiduría, por su infinito amor y fortaleza, logré llegar hasta esta etapa de mi formación profesional.*

*A mi querida Alma mater, Universidad Nacional del Altiplano-Puno, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Biología, por acogerme y haberme dado la oportunidad de desarrollarme profesionalmente, que, en sus aulas, adquirí experiencias inolvidables.*

*A todos los docentes de la Escuela Profesional de Biología, que con su conocimiento y sabiduría me encaminaron contribuyendo en mi formación académica, para ser un buen Biólogo.*

*Agradezco de manera especial a mi director de tesis Mg. Dante Mamani Sairitupac; por su paciencia, exigencia, enseñanzas, orientación y amistad que me brindó en este tiempo de investigación, compartiendo sus sabias experiencias.*

*A todo el personal del Laboratorio del Centro de Salud Simón Bolívar de Puno, por haberme permitido realizar mi trabajo de investigación en su establecimiento, ya que, con su ayuda y aporte, incrementaron con más conocimientos en la ejecución de mi tesis.*

*A la presidente del jurado calificador de esta Tesis Dr. Youri Teresa del Carpio Condori y a los miembros de jurado, Dr. Roxana Medina Rojas, Mg. Ciria Trigós Rondón, por sus consejos y sugerencias durante las revisiones, correcciones del proyecto de investigación y dictamen del borrador de tesis.*

*A la Dr. Youri Teresa del Carpio Condori, por hacer posible la realización de los ensayos del estudio facilitándome el uso del Laboratorio de Microbiología.*

*Al Sr. Leónidas Tevés, Técnico de Laboratorio de Microbiología de la FCCBB, por haberme brindado las facilidades necesarias para el desarrollo de este trabajo.*

*Y a todos mis compañeros y amigos que estuvieron al lado mío dándome su apoyo emocional, motivándome y ayudándome en la realización de este trabajo.*

*¡Muchas gracias a todos!*



# ÍNDICE GENERAL

<b>DEDICATORIA</b>	
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	
<b>LISTA DE ACRÓNIMOS</b>	
<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>CAPITULO I</b>	
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<b>1.1 OBJETIVO GENERAL</b> .....	15
<b>1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	16
<b>CAPITULO II</b>	
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b>	
<b>2.1 ANTECEDENTES</b> .....	17
<b>2.2 MARCO TEÓRICO</b> .....	24
<b>2.2.1 Agentes bacterianos causantes de infecciones del tracto urinario</b> .....	24
a) <i>Escherichia coli</i> .....	24
b) <i>Klebsiella sp</i> .....	24
c) <i>Staphylococcus aureus</i> .....	25
<b>2.2.2 Resistencia bacteriana a los fármacos</b> .....	26
<b>2.2.3 Plantas medicinales</b> .....	28
<b>2.2.4 <i>Tropaeolum tuberosum</i> “isaño”</b> .....	29
<b>2.2.4.1 Aspectos generales</b> .....	29
<b>2.2.4.2 Taxonomía</b> .....	30
<b>2.2.4.3 Descripción botánica</b> .....	30
<b>2.2.4.4 Valor nutritivo</b> .....	31
<b>2.2.4.5 Usos</b> .....	33
<b>2.2.4.6 Efecto antibacteriano de <i>Tropaeolum tuberosum</i> “isaño”</b> .....	35
<b>CAPITULO III</b>	
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	
<b>3.1 ÁREA DE ESTUDIO</b> .....	37



<b>3.2 TIPO DE ESTUDIO .....</b>	<b>37</b>
<b>3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA.....</b>	<b>38</b>
<b>3.4 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN .....</b>	<b>39</b>
<b>3.5 METODOLOGÍA .....</b>	<b>43</b>
<b>CAPITULO IV</b>	
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
<b>4.1. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS UROPATÓGENAS DE <i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella sp</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>.....</b>	<b>55</b>
<b>4.2. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA <i>In Vitro</i> DE EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Tropaeolum tuberosum</i> “ISAÑO” SOBRE <i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella sp</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .....</b>	<b>57</b>
<b>4.3. SUSCEPTIBILIDAD ANTIBACTERIANA DE <i>Escherichia coli</i>, <i>Klebsiella sp</i> y <i>Staphylococcus aureus In Vitro</i>, FRENTE A LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE <i>Tropaeolum tuberosum</i> “ISAÑO”.....</b>	<b>61</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>75</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES .....</b>	<b>76</b>
<b>VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>77</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>89</b>

**FECHA DE SUSTENTACIÓN:** 06 de enero del 2022

**ÁREA:** Ciencias Biomédicas

**LÍNEA:** Diagnóstico y Epidemiología



## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Tubérculo de “isaño” negro. Colección de germoplasma de “isaño” del Centro Internacional de la Papa (CIP, 2013). ..... 35
- Figura 2. Diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.0001$ ) del efecto antibacteriano de extracto etanólico de “isaño” sobre bacterias uropatógenas representadas en letras diferentes (A, B y C)..... 58
- Figura 3. Diferencia estadística significativa del efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* a diferentes dosis frente a *Escherichia coli*, comparado con el antibiótico cefalexina..... 63
- Figura 4. Diferencia estadística significativa del efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* a diferentes dosis frente a *Klebsiella sp.* ..... 67
- Figura 5. Diferencia estadística significativa del efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* a diferentes dosis frente a *Staphylococcus aureus*, comparado con el antibiótico Oxacilina..... 71
- Figura 6. Proceso de identificación de las bacterias uropatógenas, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA-PUNO..... 89
- Figura 7. Bacterias uropatógenas de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*, identificadas, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA- PUNO..... 89
- Figura 8. Identificación de bacteria uropatógenas de *Escherichia coli* y *Klebsiella sp*, a partir de urocultivos positivos, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA- PUNO..... 90



- Figura 9. Filtrado y preparación de los discos de sensibilidad con el extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum*, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA- PUNO..... 90
- Figura 10. Extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* a diferentes concentraciones sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA- PUNO..... 91
- Figura 11. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* a dosis de 10, 20, 30, 40, y 50µl, y controles cefalexina (30µg) y oxacilina (1µg), en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA- PUNO..... 91



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Composición química del <i>Tropaeolum tuberosum</i> “isaño” (Laura y Torres, 2018).....	33
Tabla 2.	Diseño experimental para determinar la CMI del extracto etanólico de "isaño" sobre <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella sp</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .....	40
Tabla 3.	Diseño experimental para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana del extracto etanólico de "isaño" sobre de <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella sp</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	40
Tabla 4.	Bacterias uropatógenas en gestantes con infección de tracto urinario del Centro de Salud Simón Bolívar de Puno. ....	55
Tabla 5.	Concentración mínima inhibitoria (CMI) de extracto etanólico de <i>Tropaeolum tuberosum</i> “isaño”, sobre <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella sp</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .....	57
Tabla 6.	Promedios de halos de inhibición (mm) sobre <i>Escherichia coli</i> a diferentes dosis de extracto etanólico de <i>Tropaeolum tuberosum</i> , comparado con el control positivo (Cefalexina). ....	62
Tabla 7.	Susceptibilidad antimicrobiana de <i>Escherichia coli</i> a diferentes dosis de extracto etanólico de <i>Tropaeolum tuberosum</i> , según diámetro del halo de inhibición. ....	64
Tabla 8.	Halos de inhibición (mm) de <i>Klebsiella sp</i> a diferentes dosis de extracto etanólico de <i>Tropaeolum tuberosum</i> , comparado con el control positivo (Cefalexina).....	66





Tabla 9.	Susceptibilidad antimicrobiana de <i>Klebsiella sp</i> a diferentes dosis de extracto etanólico de <i>Tropaeolum tuberosum</i> , según diámetro del halo de inhibición. ....	68
Tabla 10.	Promedios de halos de inhibición (mm) de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes dosis de extracto etanólico de <i>Tropaeolum tuberosum</i> , comparado con el control positivo (Cefalexina). ....	70
Tabla 11.	Susceptibilidad antimicrobiana de <i>Staphylococcus aureus</i> a diferentes dosis de extracto etanólico de <i>Tropaeolum tuberosum</i> , según diámetro del halo de inhibición.....	72



## LISTA DE ACRÓNIMOS

<b>OMS</b>	: Organización Mundial de la Salud
<b>INS</b>	: Instituto Nacional de Salud.
<b>D.C.A</b>	: Diseño completamente al azar
<b>ITU</b>	: infecciones del tracto urinario
<b>CMI</b>	: concentración mínima inhibitoria
<b>UFC</b>	: Unidades Formadoras de Colonias
<b>a<sub>n</sub></b>	: aislamientos de uropatógenos
<b>Sp</b>	: especie
<b>µg</b>	: microgramo
<b>µl</b>	: microlitro
<b>EMB</b>	: Eosin Metil Blue
<b>MS</b>	: Manitol Salado
<b>TSI</b>	: Triple azúcar hierro
<b>LIA</b>	: Lisina hierro agar
<b>CS</b>	: Citrato Simmons
<b>BLEE</b>	: β-lactamasas de espectro extendido
<b>AMH</b>	: Agar Muller Hinton
<b>BaCl<sub>2</sub></b>	: Cloruro de bario
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	: Ácido sulfúrico



## RESUMEN

Las infecciones del tracto urinario de las gestantes son muy frecuentes en la actualidad, ya sea a nivel mundial, nacional, como en las que acuden al Centro de Salud Simón Bolívar de la ciudad de Puno, constituyendo uno de los principales problemas debido además a la resistencia a los antimicrobianos. En tal sentido teniendo como alternativa a las plantas medicinales, se planteó como objetivo, determinar el efecto antibacteriano *in vitro* de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*, procedentes de pacientes gestantes con infección urinaria. La identificación de bacterias uropatógenas fue, a partir de muestras de orina de gestantes con infección urinaria del Centro de Salud Simón Bolívar de Puno, seguidamente se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI), y susceptibilidad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” sobre estos uropatógenos. La identificación de bacterias uropatógenas fue por cultivo en agar Eosin Metil Blue (EMB) y agar Manitol Salado (MS). La obtención de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” fue por maceración en etanol (Quispe, 2018). La CMI del extracto etanólico se determinó por dilución en caldo Müller Hinton a diferentes concentraciones (SEIMC, 2000), y para la determinación de la susceptibilidad antimicrobiana, fue por el método de difusión en placa de Kirby-Baüer en agar Müller Hinton a diferentes dosis de extracto etanólico impregnados en discos de papel filtro, teniendo como controles discos antibióticos de Cefalexina y Oxacilina. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante análisis de varianza y prueba de rango múltiple de Tukey, en la que presentaron diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) a un  $\alpha = 0.05$ . Los uropatógenos identificados de *Escherichia coli* fueron 7, *Klebsiella sp* 1, y *Staphylococcus aureus* 2. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de “isaño” para *Escherichia coli* fue de 12.50%, *Klebsiella sp* 25.00% y *Staphylococcus aureus* 6.25%. Las respuestas de susceptibilidad antibacteriana de *E. coli* y *Klebsiella sp* frente a la máxima dosis aplicada de 50  $\mu$ l, fueron resistentes; y sensible frente a la dosis de 30  $\mu$ l en *S. aureus*. En conclusión, el extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” posee actividad antibacteriana frente a los uropatógenos identificados *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Staphylococcus aureus* en pacientes gestantes con infección urinaria del Centro de Salud Simón Bolívar de Puno.

**Palabras clave:** Efecto antibacteriano, concentración mínima inhibitoria, susceptibilidad antibacteriana, extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Staphylococcus aureus*, infección de tracto urinario.



## ABSTRACT

Urinary tract infections in pregnant women are very frequent today, either worldwide, nationally, or in those who attend the Simón Bolívar Health Center in the city of Puno, constituting one of the main problems also due to the antimicrobial resistance. In this sense, having medicinal plants as an alternative, the objective was to determine the in vitro antibacterial effect of the ethanolic extract of *Tropaeolum tuberosum* "isaño" on *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* and *Staphylococcus aureus*, from pregnant patients with urinary infection. The identification of uropathogenic bacteria was, from urine samples of pregnant women with urinary infection from the Simón Bolívar Health Center in Puno, then the minimum inhibitory concentration (MIC) and in vitro antibacterial susceptibility of the ethanolic extract of *Tropaeolum tuberosum* was determined "isaño" on these uropathogens. The identification of uropathogenic bacteria was by culture on Eosin Methyl Blue agar (EMB) and Mannitol Salted agar (MS). The obtaining of ethanolic extract of *Tropaeolum tuberosum* "isaño" was by maceration in ethanol (Quispe, 2018). The MIC of the ethanolic extract was determined by dilution in Müller Hinton broth at different concentrations (SEIMC, 2000), and for the determination of antimicrobial susceptibility, it was by the Kirby-Baier plate diffusion method on Müller Hinton agar at different doses. of ethanolic extract impregnated in filter paper discs, having as controls Cephalexin and Oxacillin antibiotic discs. The data were statistically analyzed using analysis of variance and Tukey's multiple range test, in which they presented statistically significant difference ( $P < 0.05$ ) at  $\alpha = 0.05$ . The identified uropathogens of *Escherichia coli* were 7, *Klebsiella sp* 1, and *Staphylococcus aureus* 2. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the ethanolic extract of "isaño" for *Escherichia coli* was 12.50%, *Klebsiella sp* 25.00% and *Staphylococcus aureus* 6.25%. The antibacterial susceptibility responses of *E. coli* and *Klebsiella sp* against the maximum applied dose of 50  $\mu$ l were resistant; and sensitive to a 30  $\mu$ l dose in *S. aureus*. In conclusion, the ethanolic extract of *Tropaeolum tuberosum* "isaño" has antibacterial activity against the identified uropathogens *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Staphylococcus aureus* in pregnant patients with urinary infection at the Simón Bolívar Health Center in Puno.

**Keywords:** Antibacterial effect, minimum inhibitory concentration, antibacterial susceptibility, ethanolic extract of *Tropaeolum tuberosum*, *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Staphylococcus aureus*, urinary tract infection.



# CAPITULO I

## INTRODUCCIÓN

Las infecciones del tracto urinario (ITU) son una de las principales causas de infección bacteriana que afecta a personas de diversas edades a nivel mundial, nacional y en la región de Puno, así como a pacientes que acuden al Centro de Salud Simón Bolívar de la Ciudad de Puno, siendo especialmente importante en mujeres gestantes. Estas enfermedades de salud pública se reportan a menudo, siendo los principales causantes *Escherichia coli* con 90%, seguido de *Klebsiella sp.* 6%, *Proteus sp.* 5%, *Enterobacter sp.* 2%, *Pseudomonas aeruginosa* 2% (Baca, 2017), *Streptococcus* del grupo B y *Staphylococcus* coagulasa negativo y con menor frecuencia por microorganismos menos comunes como *Gardnerella vaginalis* y *Ureaplasma ureolyticum* (Alzamora, 2015). La prevalencia de infección del tracto urinario en gestantes del Hospital Manuel Núñez Butrón de Puno entre julio del 2016 y junio del 2017 fue 7.8%; con mayor proporción en el grupo de edad de 18 a 29 años, así como en las que tenían instrucción secundaria, en las amas de casa y en las que procedían de zona urbana; presentándose en el tercer trimestre del embarazo (Gavino, 2017).

En los microorganismos causales de la infección de tracto urinario se ha visto un cambio en el comportamiento y en el patrón de resistencia antibacteriana, convirtiéndose en un problema de gran interés a nivel mundial, en América Latina como en el Perú (Cuba, 2013). Estudios en el país indican que un 40 y 60 % de la población se auto médica (Arratea y Mamani, 2017), esto conlleva al incremento en los últimos años de la resistencia bacteriana frente a los antibióticos, siendo la resistencia antimicrobiana un problema de salud pública que viene afectando en el Perú, destacando que en el año 2010 *Staphylococcus aureus* alcanzó un 60.7 % y *Escherichia coli* un 50 % de resistencia, a



penicilinas requiriendo tratamientos alternativos más costosos y muchas veces la presencia de numerosos efectos colaterales registrados por el MINSA, siendo una de las causas el mal uso y abuso de los antibióticos, ya sea en el hogar, hospitales y centros de salud (Huaman y Oroche, 2016), por ello es necesario disponer de nuevos agentes antibacterianos como los extractos etanólicos, ya que presentan un gran potencial sobre estos patógenos (Ortega, 2018).

Ante el preocupante incremento de la resistencia bacteriana, en la actualidad a nivel mundial se viene estudiando y valorando el uso de productos naturales, como fuente de nuevos y variados elementos antibacterianos, como los extractos hidroalcohólicos (Coronado y Cauna, 2018), sin embargo durante mucho tiempo el uso de las plantas medicinales se ha basado en conocimientos empíricos, utilizándose como fuente para la elaboración de medicamentos en forma de preparados tradicionales, centradas en ser agentes de salud en múltiples culturas del mundo, transmitidas a través de generaciones, perfeccionándose a lo largo del tiempo, ayudado por ensayos químicos, farmacológicos, toxicológicos y clínicos, que busca los principios activos para explicar en forma racional el uso terapéutico de una planta y que permite la vigencia de su empleo, sin embargo no todas las especies cuentan con este tipo de estudios, hay muchos aspectos que permanecen empíricos (Díaz y Garzon, 2017), las cuales en la actualidad están siendo estudiadas científicamente por investigadores con el fin de recuperar y probar sus principios activos, como el efecto que tiene sobre nuestro organismo (Zapata, 2017), como antiinflamatorios, analgésicos, digestivos, antipiréticos, antidiarreicos, entre otros efectos (Quispe, 2018). A pesar de tener una historia larga historia de saber popular, ha sido menospreciada por los profesionales de la salud (Laura y Torres, 2018) es por ello esta investigación se propuso extraer el extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” que contiene isotiocianato, presentes como glucosinolatos que son conocidos por sus propiedades



antibióticas, insecticidas, nematecidas y diuréticas que justifican su amplio uso en la medicina andina. Además se ha demostrado que “isaño” posee una alta capacidad antioxidante, debido a sus compuestos fenólicos, antocianicos y carotenoides (Pacheco, 2015).

Por lo tanto es imprescindible el descubrimiento y desarrollo de una nueva generación de sustancias antibacterianas que combatan de forma más eficiente a estos microorganismos productoras de infecciones del tracto urinario, mediante la obtención de los extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño”, para ofrecer una nueva alternativa de solución a los problemas causados por los microorganismos, orientando su uso en el futuro, como agente antibacteriano, un producto ecológico a bajos costos y accesibles a la población de bajos recursos económicos, de manera que esta información científica que se ofrece a través de esta tesis, contribuirá a mejorar conocimientos de nuestra realidad, esperamos que pueda inducir a futuros trabajos de investigación para resolver gradualmente la validación científica de estos valiosos recursos de la zona sur Peruana. Por lo considerado se plantearon los siguientes objetivos:

### **1.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto antibacteriano *in vitro* de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus* de gestantes con infección de tracto urinario.



## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Identificar bacterias uropatógenas de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus* de gestantes con infección del tracto urinario del Centro de Salud Simón Bolívar de Puno.
- b) Determinar la concentración mínima inhibitoria *in vitro* de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*.
- c) Determinar la susceptibilidad antibacteriana *in vitro* de las cepas identificadas de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*, frente a diferentes dosis de los extractos etanólicos de *Tropaeolum tuberosum* “isaño”.





## CAPITULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1 ANTECEDENTES

La prevalencia de infección de tracto urinario (ITU) en gestantes en el Hospital Manuel “Núñez Butrón” de Puno entre julio del 2016 y junio del 2017 fue mayor a lo reportado internacionalmente, pero inferior a lo encontrado a nivel nacional y regional; la ITU tuvo una prevalencia de 7.8%; presentándose en el III trimestre del embarazo en un 80.9% (Gavino, 2017) y en el estudio de casos y controles en las Unidades de Medicina Familiar del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) Querétaro, periodo octubre 2010 a octubre 2011, de las adolescentes con parto pretérmino el 54,3% presentaron infección de vías urinarias, mientras que solo 33,8% de estas presentaron parto a término, en conclusión las infecciones vaginales y urinarias incrementan dos veces el riesgo de presentar parto pretérmino en adolescentes (Ugalde *et al.*, 2012).

La frecuencia de bacteriuria asintomática fue del 10,6 %, el uropatógeno más frecuentemente aislado fue la *Escherichia coli* en un 25 % de los casos, seguida por *Enterococcus faecalis* en un 20,8 %, la resistencia a la ampicilina fue del 33,3 y 20 % respectivamente; el resto de enterobacterias identificadas presenta una resistencia natural a dicho antibiótico (Campo *et al.*, 2017), la frecuencia de bacteriuria asintomática fue tres veces mayor en gestantes que retuvieron la orina, y las gestantes que tenían relaciones sexuales diarias tuvieron 70% mayor posibilidad de hacer bacteriuria asintomática (Campos *at al.*, 2013), donde bacterias que se aislaron a partir de muestras de orinas, las que presentaron mayor frecuencia fueron *Escherichia coli*, seguido de *Klebsiella sp* y un caso positivo a *Staphylococcus aureus*, (Mamani, 2017).



En un estudio efectuado en pacientes que finalizaron el embarazo en la Clínica Jesús del Norte del distrito de Independencia de Lima, Perú, entre enero de 2016 y diciembre del 2017, se registraron 1455 pacientes que cumplieron con el criterio de inclusión; de éstas 7.4% tuvieron infección de la vía urinaria, el microorganismo aislado con más frecuencia fue *Escherichia coli* en 63.6% (Quirós & Apolaya, 2018), así como en pacientes que acuden por consultorio externo del hospital III ESSALUD Juliaca mayo - julio 2012” se estudió a un total de 141 pacientes provenientes de los diferentes consultorios de atención, se encontraron 109 cepas de *E. coli*, 6 para *S. epidermidis*, 5 cepas para *E. cloacae*, *E. aerogenes* y *K. ascorbata* respectivamente; solo 2 cepas se hallaron para *K. pneumoniae* y *S. xylosum*; otros uropatógenos mostraron solo 7 cepas (Cuba, 2013), estas enfermedades de salud pública se reportan a menudo siendo los principales causantes *Escherichia coli* con 90 %, seguido de *Klebsiella sp.* 6 %, *Proteus sp.* 5 %, *Enterobacter sp.* 2 %, *Pseudomona aeruginosa* 2 % (Baca, 2017),

El extracto hidro alcohólico de hojas y flores mastuerzo presenta efecto antibacteriano *in vitro* sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 con una CMI de 8,75% (v/v), por el método de macrodilución en tubos utilizando 10 concentraciones, a partir del extracto que presentó mayor halo de inhibición (Chirinos & Chota, 2018), así como también otro estudio de extracto etanólico de flores y hojas de mastuerzo sobre *Escherichia coli* uropatógena menciona que la CIM para *E. coli* uropatógena fue del 75% (750µg/ml) donde concluye que el extracto etanólico de *Tropaeolum majus* tiene efecto antimicrobiano “*in vitro*” sobre *Escherichia coli* uropatógena (Aguirre, 2017).

El extracto etanólico de flores y hojas de *Tropaeolum majus* "mastuerzo" sobre *Escherichia coli* uropatógena, la CIM para *E. coli* uropatógena fue del 75% (750µg/ml) donde concluye que el extracto etanólico de mastuerzo tiene efecto antimicrobiano “*in vitro*” sobre *Escherichia coli* uropatógena (Aguirre, 2017), y el extracto acuoso del



“isaño” presenta efecto antibacteriano obteniéndose la CMI a una concentración de 18.75mg/ml, la cepa ATCC de *Escherichia coli* con efecto bacteriostático (Candia, 2016).

Las propiedades terapéuticas del isaño y su uso en la medicina popular andina, para tratar los malestares urinarios y de próstata en forma de infusión debido a la presencia de un alto contenido de isotiocianatos en los tubérculos de isaño, los cuales son conocidos por sus propiedades antibióticas, insecticidas, nematicidas, diuréticas y anticancerígenas (Ramón, 2017), por tanto el isaño se emplea en enfermedades como cálculos del aparato renal, como un antibiótico natural, sobre cepas de *Staphylococcus* (Córdova & Inga, 2019), así como también *Tropaeolum majus L.* contiene un solo glucosinolato, que es la glucotropaeolina el principio activo tóxico principal que es un aceite esencial glucósido que ingerido en dosis terapéuticas se le atribuyen propiedades bacteriostáticas y antimicóticos (Gamarra y Ramos, 2017), estos glucosinolatos volátiles tales como los isotiocianatos que han mostrado un amplio rango de efectos antibacteriano antifungicos, que están presentes en varias especies de la familia tropaeolaceae, como el *Tropaeolum majus L.* “mastuerzo de las indias” y *Tropaeolum tuberosum* “isaño” donde la producción de los glucosinolatos dentro de la planta ocurre cuando está amenazada por los insectos (Huanquis y Leon, 2015).

*Tropaeolum tuberosum sub sp. tuberosum* contiene p-methoxybenzylglucosinolate como su principal metabolito secundario, las actividades antibacterianas de glucosinolatos e isotiocianatos han sido reconocidos por muchas décadas contra numerosos patógenos humanos, como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Candida sp* (Moreno, 2017), es por ello el isaño tiene un sin número de aplicaciones en la medicina tradicional se usa, como antibiótico, contra *Candida albicans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus*, buenos contra las dolencias genitourinarias (Doylet y Rodríguez, 2018), pero muestra que las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia*



*coli*, no fueron inhibidas por los extractos acuoso en solución salina obtenidos de los tubérculos de isaño amarillo y rojo, frente al control positivo de Ciprofloxacino y Amikacina que presentó halo de 30 mm y 36 mm de diámetro (Aguas, 2019).

El extracto acuoso del isaño presenta efecto antibacteriano obteniéndose halos de inhibición promedio de 22 mm de diámetro para cepas ATCC de *Escherichia coli*, a concentración de 50 y 75 mg/ml, demostrando ser mejor frente a cepas ATCC que para cepas clínicas (Candia, 2016), así también el extracto de hojas y tallos del *Tropaeolum majus L.* tienen actividad antibacteriana para *Staphylococcus epidermidis Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* (Zanetti *et al.*, 2003), estas bacterias Gram negativas presentan una pared celular, que es una barrera que impide la penetración de los antibióticos y que varía según las diferentes especies, sin embargo, la pared celular en las bacterias grampositivas usualmente no es una barrera difícil de vencer (Patiño, 2003).

En este estudio se investigó la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de tres variedades rosada, amarilla y negra del tubérculo isaño frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Cándida albicans*, se evaluó mediante difusión de agar en disco por el método Kirby Bauer, de manera que el ensayo con 10 µl de extracto etanólico de la variedad negra dio resultados inhibitorios intermedios y los de 20 y 40 µl indica claramente sensibilidad de *E. coli* y *S. aureus* (Chica y Guayaquil, 2019), así como diámetros de halos de inhibición de los extractos de isaño negro, oscilaron entre los 3.75 mm, a una concentración de 30% del extracto, 8.75 mm, a una concentración de 50% del extracto y de 16.63 mm a una concentración del 100% del extracto; mientras con extractos de isaño amarillo oscilaron entre 3 mm con extractos al 50% y 10.50 mm a concentraciones de 100% de extracto frente *Escherichia coli*, (Quispe, 2018).



Pruebas *in vitro* demuestra que el extracto de isaño *Tropaeolum tuberosum* en concentración 1:2 y 1:4 (333 mg/ml y 200 mg/ml) inhibió el crecimiento de *Listeria monocytogenes* presentando la sensibilidad, mientras que las concentraciones 1:6 y 1:8 fueron resistentes permitieron el crecimiento de la bacteria (Poma & Paz, 2017), pero no hubo actividad antimicrobiana de ninguno de los extractos etanólico o acuoso de isaño ya sea de tallos, hojas y mezcla de ambos, frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, posiblemente por la baja concentración de los isotiocianatos en la parte aérea de la planta (Diaz & Garzon, 2017), porque al contener una elevada concentración de glucosinolatos aromáticos que al ser hidrolizados se transforman en isotiocianatos, compuestos químicos responsables de otorgar el típico sabor picante a los tubérculos, los isotiocianatos son conocidos por sus propiedades antibióticas, insecticidas, nematocidas, anticancerígenas y diuréticas, lo que contribuye a sustentar el uso tradicional del isaño en la medicina folclórica de los Andes (CIP, 2013).

Isaño y ulluco presentan la capacidad antimicrobiana, donde el extracto de tubérculo de isaño tuvo un efecto bacteriostático sobre *Candida utilis*, mientras que tubérculo y hojas de ulluco tuvo un efecto bactericida sobre *Escherichia coli*, estos dos tubérculos poseen potencial para la extracción de compuestos antioxidantes y antimicrobianos permitiendo, de esta manera, establecer alternativas de uso para los tubérculos y subproductos (hojas y tallos) (Mejía *et al.*, 2018), y se demostró que el extracto acuoso de *Ullucus tuberosus*, etanólico de *Tropaeolum tuberosum* y además del acuoso y etanólico de *Solanum phureja* poseen efecto antibacteriano *in vitro* contra la bacteria *Staphylococcus aureus*, en cambio todos los extractos etanólicos de las plantas *S. phureja*, *T. tuberosum*, *U. tuberosus* y *Oxalis tuberosa* tienen actividad antibacteriana contra *S. typhimurium* (Silva, 2018), por ello en la comunidad Huatacana, municipio de Mocomoco, del departamento de la Paz de acuerdo a los conocimientos locales de los



agricultores en esta zona entre los usos medicinales tradicionales del isaño se ha reportado su utilidad para reducir las inflamaciones del riñón y de la próstata (Aruquipa *et al.*, 2017).

El *Tropaeolum majus L.* (mastuerzo) era usada desde tiempos muy antiguos por nuestros antepasados para combatir distintas enfermedades, entre sus componentes se encuentra la glucotropaeolina, que al ser hidrolizado forma el bencil isotiocianato (BIT) que fomenta la apoptosis celular, mayor contenido de bencil isotiocianato extraído con CO<sub>2</sub> supercrítico a partir de hojas de mastuerzo (Espinoza *et al.*, 2017), por ello extracto etanólico de flores y hojas de *Tropaeolum majus* "mastuerzo" sobre *Escherichia coli* uropatógena según la Escala de Duraffourd fue sensible a las concentraciones de 25% y 50% y muy sensible a la concentración del 75% del extracto etanólico donde concluye que el extracto etanólico de *Tropaeolum majus* "mastuerzo" tiene efecto antimicrobiano "in vitro" sobre *Escherichia coli* uropatógena (Aguirre, 2017), con respecto al extracto etanólico de las hojas de mastuerzo a concentraciones de 30%, 40% y 50% produjo halos de inhibición promedios de 20.11, 23.57 y 26.55 mm en las cepas de *Escherichia coli* por lo tanto el extracto etanólico tiene efecto inhibitorio *in vitro* sobre la bacteria, el cual es estadísticamente dependiente de la cepa de *E. coli* y de las concentraciones del extracto (Tenorio & Estrada, 2016).

Extracto etanólico de las flores y hojas de *Tropaeolum majus* "mastuerzo" con efecto inhibitorio frente a *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 25923 (SARM), utilizando el método de difusión en disco de Kirby y Bauer, evidenciando a través de los halos de inhibición de las unidades formadoras de colonias presentando mayor sensibilidad con la concentración de 210.7ug/ml, comparable con la Vancomicina (Aspauza, 2015), en cuanto al extracto hidroalcohólico de hojas y flores mastuerzo presenta efecto antibacteriano *in vitro* sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175



evidenciándose un mayor diámetro de halo de inhibición al 40% del extracto de 16 mm (Chirinos & Chota, 2018), además la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de “mastuerzo” *Tropaeolum majus L.* frente a *Escherichia coli* mediante el ensayo disco difusión mostraron halo de inhibición para los discos con extractos de 5µl hasta la concentración de 60% a partir de las hojas con 11.60 mm, y de las flores 9.00 mm además frente a *Staphylococcus aureus* mostraron halo de inhibición a partir de las hojas 8.70, y de las flores 9.40 mm (Huanquis & Leon, 2015).

Metabolitos secundarios de los tubérculos de *Tropaeolum tuberosum*. Ssp *tuberosum* variedad amarilla los más abundantes tenemos alcaloides, triterpenos y esteroides, fenoles, taninos pirocatecólicos, flavonoides del tipo catequinas, cumarinas y aminoácidos de los cuales contenido de fenoles y flavonoides se van degradando a medida que aumenta la temperatura, por lo que se pierde potencial farmacológico al cocinarla, y compuestos como la betaína y el beta sitosterol, posiblemente con mayor interés farmacéutico (Durazno & Herrera, 2018), por ello extracto acuoso del “isaño” presenta efecto antibacteriano obteniéndose en análisis fitoquímico la presencia de flavonoides, taninos, esteroides, alcaloides, y glicósidos; los cuales evidencian actividad antibacteriana sobre microorganismos (Candia, 2016).

Mediante el tamizaje fitoquímico y de la Cromatografía de los extractos metanólico y acuoso del *Tropaeolum tuberosum*, variedad rosada, se comprobaron la presencia de metabolitos secundarios siguientes: alcaloides, triterpenos, esteroides, quinonas, cumarinas, taninos, saponinas, antocianidinas, azúcares, variando en la intensidad de coloración o precipitado ello corrobora la aplicación etnofarmacológica para tratar distintas enfermedades mediante ingesta tanto del tubérculo completo o en productos farmacéuticos utilizando sus metabolitos secundarios (Villacis y Viñan, 2018),



los estudios demuestran que los metabolitos, en su mayoría secundarios, tales como alcaloides, flavonoides, terpenos, saponinas, fenoles y quinonas, que han sido reportados con actividad antimicrobiana (Rodríguez *et al.*, 2017).

## 2.2 MARCO TEÓRICO

### 2.2.1 Agentes bacterianos causantes de infecciones del tracto urinario

#### a) *Escherichia coli*

*Escherichia coli* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos gram negativos miden de 2-4  $\mu\text{m}$  de ancho, con fimbria y flagelos periticos, no esporulados, que se desarrollan con facilidad en medios simples, con única fuente de carbono como glicerol o glucosa, crece rápido ya sea en condiciones anaerobias como aerobias de 12 a 18 horas de incubación en promedio. En medio de agar crece colonias de 2 a 5 milímetros de diámetro, lisas y con bordes completos, en medios de caldo de cultivo se observa una turbidez difusa. Todas las enterobacterias son fermentadoras de glucosa, que reducen los nitratos a nitritos siendo oxidasa negativos (Castro, 2014), *Escherichia coli* uropatógeno constituyen un tipo específico de extra intestinal caracterizados por un especial potencial patógeno sobre el aparato tracto urinario, según un criterio basado en su origen, aquellas aisladas de la orina de pacientes con infección del tracto urinario. La infección del tracto urinario complicada incluye cuadros de bacteriemia o sepsis de origen urinario, también podrían considerarse *Escherichia coli* uropatógeno las cepas aisladas de hemocultivos (Merino, 2018). Su clasificación es de acuerdo a su patogenicidad, virulencia y toxicidad en: Enteroagregativa, enteropatógena, enterotoxigénica, enterohemorrágica y adherencia difusa (Silva, 2018).

#### b) *Klebsiella sp*

*Klebsiella pneumoniae* forma parte de la familia Enterobacteriaceae y es la especie de mayor trascendencia del género bacteriano *Klebsiella* que son bacilos





gramnegativos cortos y anchos, no flagelados por lo que son inmóviles. Son fermentadoras de la lactosa, productoras de gas, se localiza en el aparato respiratorio asociadas con infecciones de vías urinarias, (Acosta, 2014), es una bacteria, anaerobia facultativa, usualmente encapsulada, ampliamente esparcida en el ambiente, y presente de manera especial en las superficies mucosas de mamíferos; colonizando en los seres humanos el tracto gastrointestinal y la nasofaringe (Echeverri y Cataño, 2010), actualmente es uno de los patógenos causantes de infección intrahospitalaria más comunes, posee mecanismos de resistencia antibacteriana a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos y que causa gran morbilidad y mortalidad, en especial en unidades de cuidados intensivos, neonatales, médicos y quirúrgicos (Bailón y Sacsquispe, 2013).

### c) *Staphylococcus aureus*

El género de este microorganismo está formado por cocos Gram positivos, con diámetro que va de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ , se observan como células únicas, como en pares, tétradas, cadenas cortas o también se pueden observar formando racimos de uvas, es así como se describe a los cocos que son responsables de inflamación y expulsión de pus (Morán, 2018), en medio de cultivo crece formando colonias lisas, elevadas, brillantes con bordes enteros, las colonias presentan una consistencia cremosa, con una coloración amarillenta o dorada, por la producción de un pigmento carotenoide (Diaz y Garzon, 2017), esta coloración de pigmento amarillo posiblemente le confiera cierta protección a los efectos antimicrobianos de la radiación solar, para su metabolismo tiende a producir catalasa y degrada los azúcares por el proceso de fermentación, una de sus características que presenta esta bacteria es aerobio y anaerobio facultativo (Aquino, 2017). Dentro del género *Staphylococcus*, existen más de 45 especies diferentes, de las cuales varias son consideradas como parte de la flora normal de la piel y las mucosas, no obstante, ciertos factores del huésped y del germen, pueden favorecer el desarrollo de infecciones, por este



género, como los componentes de la estructura de *Staphylococcus aureus*, así como su capacidad de síntesis de diferentes toxinas y enzimas, le permiten evadir la respuesta inmunitaria sobre la infección (Orjuela, 2016).

### 2.2.2 Resistencia bacteriana a los fármacos

La resistencia antibacteriana se define como el mecanismo mediante el cual la bacteria puede reducir la acción de los agentes antimicrobianos (Meriño *et al.*, 2021). La resistencia se manifiesta cuando las dosis no letales inducen una alza en las tasas de mutación o la transferencia horizontal de material genético, entonces, la selección de la mutante resulta de un mecanismo fisiológico que es empleado en un microorganismo o ambiente diferente concediéndole mayores probabilidades de sobrevivir (Ponce *et al.*, 2015), estas mutaciones cromosomales e intercambio de material genético de otras bacterias o fagos (virus que utilizan bacterias para su desarrollo y reproducción), es a través de mecanismos como: transformación, transducción, transposición, conjugación. Como también la resistencia bacteriana puede ser natural o intrínseca y adquirida, y debe ser analizada desde varios puntos de vista como; farmacocinético, farmacodinámico, poblacional, molecular y clínico. Los principales mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias son: Bombas de eflujo o expulsión del antibiótico del interior de la célula bacteriana, modificación o inactivación del antibiótico mediante enzimas hidrolíticas, bloqueo de la penetración del antibacteriano mediante modificación del sitio activo, alteración o disminución de la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, biofilmes, sobre expresión del sitio blanco (Calderon y Aguilar, 2016).

Dentro de las bacterias resistentes tenemos *Escherichia coli*, que es el principal agente etiológico de las ITU adquiridas en la comunidad y el que más se ha asociado a recidivas, esta incrementó su resistencia a través de múltiples mecanismos relacionados con el uso masivo e irracional de antibióticos, lo que dificulta el tratamiento en la práctica



médica. El significado social de la identificación de los patrones locales de resistencia antimicrobiana de la bacteria *E. coli* está en que se reconoce que presenta un patrón alarmante de resistencia antimicrobiana, que incluyen a los antimicrobianos carbapenémicos, situación que ha sido señalada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) cuando la incluyó en una lista de bacterias para las que se necesitan rápidamente nuevos antibióticos (Expósito *et al.*, 2019).

La resistencia a los antimicrobianos en bacterias Gram negativas de importancia clínica, es un problema creciente, y en los últimos años sobrepasa la barrera nosocomial para afectar también a la comunidad en tanto existe una diseminación mundial de clones de bacterias y de genes que confieren resistencia a los antimicrobianos, entre los que el género *Klebsiella*, ocupa un lugar primordial (Quiñones *et al.*, 2014), y cada vez son más las bacterias resistentes a múltiples antimicrobianos que han sido asociadas con las enfermedades infecciosas en humanos, es así la OMS destaca *Klebsiella pneumoniae* como una de las bacterias multidrogorresistentes de alta prioridad para la investigación debido a su capacidad para acumular y diseminar genes de resistencia a los antimicrobianos, y a su elevada carga plasmídica y amplia variabilidad del contenido de guanina + citosina (G+C), debido a la disminución de antimicrobianos efectivos para las infecciones causadas por microorganismos multirresistentes, se considera a las polimixinas (polimixina B y polimixina E, llamada también colistina) como tratamientos de última línea, especialmente en infecciones graves por *K. pneumoniae*, resistente a los carbapenémicos (Matsuoka *et al.*, 2020).

*Staphylococcus aureus* también ha mostrado un patrón creciente de resistencia, desde comienzos del siglo pasado, cuando Flemming lo describió como sensible al hongo que daría origen a la penicilina, hasta la fecha actual, cuando puede mostrar resistencia a una gamma importante de antimicrobianos. Primero fueron sus betalactamasas las



encargadas de escindir el anillo betalactámico de la Penicilina; por lo que fue necesario desarrollar una penicilina semisintética estable a la acción de las betalactamasas, como sería la oxacilina. Luego sería la modificación de las proteínas de unión a la Penicilina (PBP's, por sus siglas en inglés) la encargada de la resistencia a meticilina u oxacilina. La clindamicina nos daría cierto respiro al mostrar su utilidad en el tratamiento de cepas resistentes a oxacilina adquiridas en la comunidad; sin embargo, poco a poco también mermaría su utilidad al respecto (Valery *et al.*, 2016). Los mecanismos de resistencia a los antibióticos  $\beta$ -lactámicos en *S. aureus* se han descrito tres mecanismos que explican la resistencia como la producción de enzimas inactivadoras (penicilinasas o  $\beta$ -lactamasas), modificación de las Proteínas de unión a penicilinas (PBPs) y la resistencia intrínseca a meticilina, debida a la presencia del gen *mecA*; siendo este último, el mecanismo más importante desde el punto de vista clínico y el más estudiado. Aunque la frecuencia relativa de cada uno de los tipos de resistencia puede variar según el área geográfica y el tipo de paciente, se puede dar la posibilidad de que en una misma cepa coexistan distintos mecanismos (Castellano & Perozo, 2010).

### **2.2.3 Plantas medicinales**

Las plantas medicinales han acompañado la evolución del hombre, y forman parte del curar ancestral y la OMS, estima que más del 80% de todos los habitantes de la Tierra confían en medicinas tradicionales para resolver sus principales necesidades de salud, que algunas plantas eran buenas para comer y alimentarse y otras se caracterizaban por tener propiedades curativas (Chura, 2017), son aquellos vegetales que elaboran productos propios denominados principios activos, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, benéfica o perjudicial, sobre el ser vivo (Salas, 2016), desde ese punto de vista las plantas medicinales son consideradas todas aquellas que contienen uno o más



principios activos, los cuales, administrados en la dosis adecuada, producen un efecto curativo frente a las enfermedades del hombre y de los animales. El hecho de contener más de un principio activo hace que una planta medicinal pueda servir para tratar diferentes afecciones o trastornos (Condori, 2018). El valor medicinal de las plantas curativas, se debe a la presencia de una sustancia química “principio activo” que produce un efecto fisiológico estos son sumamente complejos, desconociéndose aún su naturaleza química; otros han sido purificados, sintetizados o imitados, las cuales pertenecen a una de estas categorías: alcaloides, glúcidos, taninos, saponinas, fenoles, quinonas, terpenos, carotenoides, cumarinas, flavonoides, resinas, los mismos por la presencia de principios activos brindan beneficios a quienes la consumen, a pesar de las investigaciones y estudios de las plantas medicinales, aun no se conocen muchos de los principios activos a los que se deben sus extraordinarias propiedades (Coronado y Cauna, 2018).

## **2.2.4 *Tropaeolum tuberosum* “isaño”**

### **2.2.4.1 Aspectos generales**

“Isaño” *Tropaeolum tuberosum* (Radón & Pavón), es uno de los tubérculos más importantes después de la papa, olluco y oca; se cultiva en los valles húmedos de la zona andina de Perú, Colombia, Argentina, Ecuador y Bolivia (Saavedra & Tavera, 2017). Nombres comunes que presenta este tubérculo son: mashua, maswa, (Perú, Ecuador), isaño, añu (Perú, Bolivia), maswallo, mazuco, mascho (Perú), cubio, navo, navios (Colombia) (Surco, 2004), la planta hereditaria es de la Meseta Peruano-Boliviano, pero ahora puede encontrarse en lugares tan lejanos como Canadá, Europa y Nueva Zelanda, entre los tubérculos andinos, el isaño es de mayor rendimiento, se encuentra entre 9 y 70 TM/ha, crece en alturas de 3000 a 4000 msnm, pero la planta produce sus mejores cosechas y alto rendimiento entre 3500 y 3800 msnm, los rendimientos del isaño supera



a la papa de dos por uno y crece en suelos pobres y sin fertilizantes (Cuya, 2009). La propagación se hace a través de los tubérculos. Su rusticidad y rápido crecimiento hacen que tenga buenos rendimientos y crezca bien en áreas enmalezadas y por lo mismo, las enfermedades son poco frecuentes (D. Flores, 2011).

#### 2.2.4.2 Taxonomía

Según Catálogo de asociación de vida (CoLP) desarrollado por el Sistema de Información Taxonómica Integrado-ITIS (2013), la posición taxonómica de *Tropaeolum tuberosum*, citado en (Pacheco, 2015), isaño tiene la siguiente clasificación taxonómica.

Reino	: Plantae
Subreino	: Viridaeplantae
Infrareino	: Streptophyta
División	: Tracheophyta
Subdivisión	: Spermatophytina
Infradivisión	: Angiospermae
Clase	: Magnoliopsida
Superorden	: Rosanae
Orden	: Brassicales
Familia	: Tropaeolaceae
Género	: <i>Tropaeolum</i>
Especie	: <i>Tropaeolum tuberosum</i>

#### 2.2.4.3 Descripción botánica

Es una planta herbácea perenne, semirastrera que puede crecer hasta los 2 metros de altura. Proporciona tubérculos que miden de 5 a 15 cm, tienen colores púrpura, violeta, anaranjado, amarillo, blanco, rojizo, punteadas con rojo brillante y líneas moradas. Tienen una estructura elipsoidal y pueden estar ramificados (Silva, 2018), de tallos cilíndricos y hábitos rastreros, las hojas son alternadas, de 3-5 lóbulos, con nervaduras pronunciadas.



Esta planta posee un follaje compacto, con hojas de color verde oscuro en el haz y más claras en el envés. Las hojas tienen lámina redondeada y el peciolo inserto en el centro, posee flores son bisexuales solitarias de distintos colores que van desde el anaranjado hasta el rojo oscuro. El número de estambres varía de 8 a 13, y el tiempo que permanece abierta oscila entre 9 y 15 días, el fruto es esquizocarpo, el cual produce abundante semilla botánica. Generalmente al igual que en otros tubérculos andinos ocurre el fenómeno de la fascinación. Los tubérculos que produce isaño, son parecidos a la oca, pero se les diferencia porque tienen forma cónica alargada, de yemas profundas. Debido a la presencia de isotiocianatos, que también se encuentran en la mostaza y los rabanitos, el isaño tiene un sabor acre y picante, pero que desaparece con la cocción volviéndose dulce (N. Flores, 2015).

#### **2.2.4.4 Valor nutritivo**

Isaño es muy nutritiva y contiene cerca de 20% de sólido y proteína, alrededor de 16% en materia seca, podría volverse un alimento valioso y barato debido a su alto rendimiento. Sin embargo, la proteína es altamente variable, dependiendo mucho de la variedad. El isaño contiene una cantidad elevada de aminoácidos esenciales como lisina, aminoácido limitante en muchos cereales y leguminosos (Laura & Torres, 2018). La composición química del isaño depende principalmente de las características genéticas, sin embargo, tubérculos de la misma planta pueden diferir notablemente en la composición química. Además, la composición se ve afectada por varios factores como: variedad, zonas de crecimiento, formas de cultivo, almacenamiento, madurez de cosecha etc. El isaño pueden contener apreciables cantidades de carotenos (vitamina A) y de vitamina C (77 mg en 100 gramos de materia fresca comestible), siendo cuatro veces más que la cantidad de esta vitamina encontrada en la papa (Bustincio, 2014). El valor nutricional de los tubérculos es alto, aproximadamente tiene un porcentaje de humedad



de 87%, proteínas 1,5 g, carbohidratos 9,7 g, grasa 0,1 g, fibra cruda 0,8 g, cenizas 0,5 g y energía 45,7 kcal (por 100 g de porción comestible de peso fresco). Contiene además todos los aminoácidos esenciales: lisina 35-41 mg/g, treonina 22 a 24 mg/g, valina 25-46 mg/g, isoleucina 25-37 mg/g, leucina 35 a 43 mg/g, fenilalanina + tirosina 14 -37 mg/g, triptófano 4,7 a 5,3 mg/g y metionina + cistina 12-15 mg/g (Diaz y Garzon, 2017), azúcares reductores equivalente a 33.635 mg y un contenido de capacidad antioxidante de 474.858  $\mu$ g Eq. Trolox /g (Saavedra y Tavera, 2017).



**Tabla 1.** Composición química del *Tropaeolum tuberosum* “isaño” (Laura y Torres, 2018).

Nutrientes	Base húmeda (BH)			Base seca (BS)	
	Rango	Prom.	Fuentes	Rango	Prom.
Humedad (%)	79.2-93.8	87.4	Barrionuevo 1975. Brito y Espin 1999	78.3-92.4	-
Carbohidratos (g)	-	9.8		78.6	-
Proteínas (g)	1.1-2.7	1.5	Barrionuevo 1975	7.2-13.09	11.4
Grasa (g)	-	0.7	Collazos et al 1996	0.1-1.4	-
Cenizas (g)	0.6-1.1	0.8	Barrionuevo 1975	4.2-6.2	5.7
Fibra (g)	0.5-1.5	0.9	Barrionuevo 1975	4.9-8.6	-
Azúcares totales (g)	-	3.5	Brito y Espin 1999	-	-
Almidón (g)	7.0-10.5	8.9	Barrionuevo 1975	-	-
Energía (Kcal)	35-50	-	Barrionuevo 1975, Brito y Espin 1999	-	-
Potasio (mg)	1.3-1.8	1.5	Barrionuevo 1975	-	-
Fosforo (mg)	0.6-0.8	0.7	Barrionuevo 1975	300	-
Calcio (mg)	-	1.2	Collazos <i>et al.</i> 1996	-	-
Hierro (mg)	-	1.0	Collazos <i>et al.</i> 1996	-	8.6
Vitamina A(mg)	-	0.10	Collazos <i>et al.</i> 1996	214	-
Tiamina (mg)	-	0.10	Collazos <i>et al.</i> 1996	-	0.46
Riboflavina (mg)	-	0.12	Collazos <i>et al.</i> 1996	-	0.57
Niacina (mg)	-	0.67	Collazos <i>et al.</i> 1996	-	4.3
Vitamina C(mg)	-	77.5	Collazos <i>et al.</i> 1996	476	-
Lisina (mg/g de proteína)	35-69	-	Shah et al. 993. Rev. y Grshoff 1987	-	-
Treonina (mg/g de proteína)	22-46	-	King y Gershoff 1987; Shah <i>et al.</i> 993	-	-
Valina (mg/g de proteína)	25-88	-	King y Gershoff 1987; Shah <i>et al.</i> 993	-	-
Isoleucina (mg/g de proteína)	25-44	-	King y Gershoff 1987; Shah <i>et al.</i> 993	-	-
Leucina (mg/g de proteína)	35-56	-	King y Gershoff 1987; Shah <i>et al.</i> 993	-	-
Tirosina (mg/g de proteína)	13-62	-	King y Gershoff 1987; Shah <i>et al.</i> 993	-	-
Triptófano (mg/g de proteína)	5-2	-	King y Gershoff 1987; Shah <i>et al.</i> 993	-	-
Cisteína (mg/g de proteína)	14-29	-	King y Gershoff 1987; Shah <i>et al.</i> 993	-	-

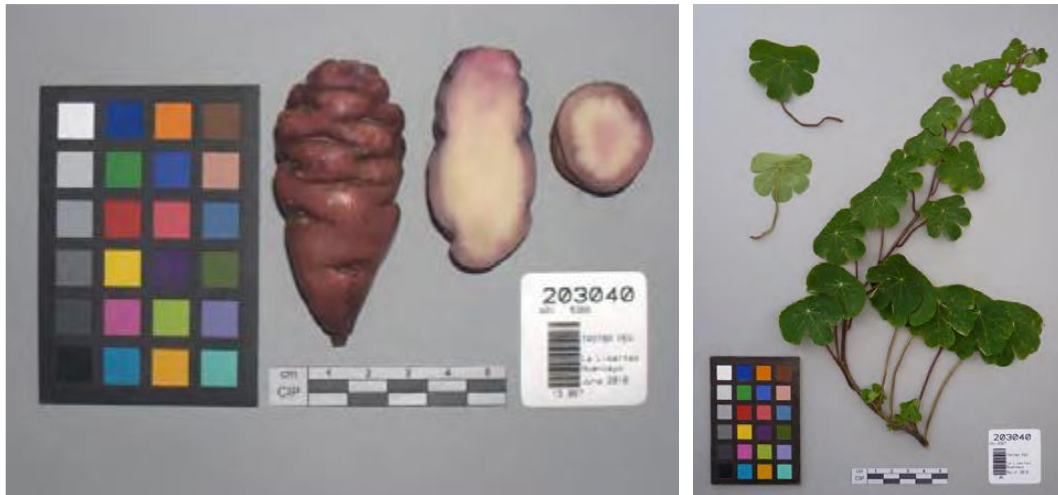
#### 2.2.4.5 Usos

Los tubérculos se comen hervidos, como ingredientes en sopas y mermeladas. Los brotes tiernos y las flores se consumen cocidos como verduras. También tiene propiedades medicinales potenciales para la fármaco-industria, tradicionalmente son utilizados como antibacterianos, insecticidas, nematocidas. Las poblaciones indígenas y de escasos recursos utilizan al isaño para tratamientos antiinflamatorios de la próstata, ya



que tiene la propiedad de reducir los niveles de testosterona, se le atribuye propiedades curativas para el hígado y riñones, ayuda a mejorar los dolores genitourinarias (Aruquipa *et al.*, 2017). Actúa contra bacterias como el *Escherichia coli* y el *Staphylococcus*, y hongos como la *Candida albicans*. Actúa eficazmente contra dolencias genitourinarias y es excelente para combatir la anemia (Valle, 2017).

Es antiafrodisíaco, por lo que disminuye la cantidad de testosterona y dihidrotestosterona en la sangre. Se dice que reduce el instinto sexual y se cuenta que las tropas de los incas llevaban el isaño como fiambre para olvidarse de sus mujeres (Pacco, 2015), hoy se sabe que los niveles de testosterona se reducen significativamente en ratas machos tratadas con isaño mostrando valores más bajos de la producción diaria de espermatozoides en el epidídimo y el conducto deferente y conteo de espermatozoides y la motilidad del espermatozoide; mientras tanto, el isaño aumenta el porcentaje de morfología de los espermatozoides anormal y la tasa de tránsito de espermatozoides del epidídimo, además se conoce que los principios activos presentes en los tubérculos del isaño actúan como desinflamantes de la próstata, por lo cual han empezado a tener demanda en el mercado internacional (Mendieta, 2017). El isaño además de ser tolerante a las heladas, también tiene capacidad fungicida, nematocida e insecticida, debido a los glucosinolatos y sus derivados los isotiocianatos presentes en toda la planta. El origen de estas cualidades agronómicas, puede deberse a que el “isaño” ha evolucionado en las zonas más inhóspitas para la agricultura ya que los pobladores precolombinos hicieron un uso eficiente de las tierras marginales (Laura y Torres, 2018).



**Figura 1.** Tubérculo de “isaño” negro. Colección de germoplasma de “isaño” del Centro Internacional de la Papa (CIP, 2013).

#### **2.2.4.6 Efecto antibacteriano de *Tropaeolum tuberosum* “isaño”**

Los glucosinolatos son aniones orgánicos solubles en agua, que incluyen aproximadamente 120 compuestos. Cuando la estructura de la planta está intacta, los glucosinolatos permanecen en las vacuolas de forma que no entran en contacto con las mirosinasas. Sin embargo, cuando se produce esta pérdida de estructura, las mirosinasas con actividad glucohidrolasa eliminan la molécula de D-glucosa del glucosinolato formando así una aglicona inestable, cuya descomposición dará lugar a compuestos como tiocianatos, nitrilos e isotiocianatos volátiles originando un sabor amargo característico de la mostaza, así como la liberación de ácido sulfúrico, actuando como mecanismo de defensa contra ataques externos de insectos. (Díaz y Garzón, 2017), *Tropaeolum tuberosum* contienen glucosinolatos (GSL), compuestos de azufre que pueden controlar el crecimiento de microorganismos por tener efecto antibacteriano. La concentración de este compuesto se encuentra entre 0.27 - 50.74  $\mu\text{mol/g}$  según la variedad. El mecanismo por el cual los ITC's inhiben el crecimiento de microorganismos, aún no se conoce bien. Algunas hipótesis proponen que los ITC's actúan por 3 mecanismos: el primero es por inactivación de las enzimas intracelulares por medio de la degradación oxidativa de los puentes disulfuro, el segundo es desacoplando la fosforilación oxidativa y el tercer



mecanismo consiste en la inhibición de las enzimas metabólicas por la acción del radical tiocianato. Al parecer, la alta reactividad de los ITC's se debe principalmente a la fuerte naturaleza electrofílica del grupo funcional isotiocianato (NCS) (Poma y Paz, 2017). Los isotiocianatos se encuentra en gran cantidad en los tubérculos frescos donde pueden unirse covalentemente a las proteínas, inactivando las actividades enzimáticas se observaron en experimentos *in vitro* que el isotiocianato de fenetilo (PEITC) se une covalentemente a las proteínas celulares e induce la apoptosis en las líneas celulares de cáncer, los isotiocianatos (ITC) son liberados por la acción de la enzima mirosinasa que hidroliza a los glucosinolatos dando una sustancia que causa un efecto biocida (Quispe, 2018).



## CAPITULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 ÁREA DE ESTUDIO

El estudio se realizó en la ciudad de Puno ubicada a 3824 m.s.n.m., localizada al sur este de la región andina altiplánica del Perú, en plena meseta del Collao a orillas del lago Titicaca. Las muestras de tubérculos de isaño para la obtención del extracto etanólico fueron adquiridas en el Mercado Unión y Dignidad de la ciudad de Puno. Las muestras de orina fueron proporcionadas por el Centro de Salud “Simón Bolívar”. Las pruebas de actividad *in vitro* de los extractos etanólico frente a los uropatógenos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, para la identificación de las bacterias de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*, mediante el urocultivo; así como las pruebas de determinación de concentración mínima inhibitoria, y la susceptibilidad de las bacterias identificadas frente al extracto etanólico de “isaño”.

#### 3.2 TIPO DE ESTUDIO

Es de tipo experimental, con pruebas y controles, distribuidos en tres grupos: Un grupo control con antibiótico cefalexina y oxacilina frente a las diez bacterias identificadas en estudio, un control negativo (etanol); y el tercer grupo representada por el extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” a concentraciones de 3.13, 6.25, 12.50, 25.00 y 50.00 % para la determinación de concentración mínima inhibitoria y dosis de 10, 20, 30, 40, y 50  $\mu$ l para la susceptibilidad antimicrobiana.



### 3.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

#### **Muestras biológicas:**

La identificación de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus* fueron realizadas a partir de 36 muestras de orina, de gestantes diagnosticadas con infección urinaria, que acuden al consultorio externo del Centro de Salud Simón Bolívar 1-3 de Puno.

#### **Extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño”.**

La población de tubérculos de isaño en la provincia de Puno es amplia, por lo cual se realizó un muestreo no probabilístico por conveniencia, en tal razón las muestras de tubérculos de *Tropaeolum tuberosum* a experimentar fueron 4 kilos, que se compraron frescos en el mercado Unión Dignidad de la ciudad de Puno, las cuales fueron secadas y molidas en molino de tracción, a partir de ellas se obtuvo el extracto etanólico, y del cual se prepararon soluciones diluidas para la determinación de concentración mínima inhibitoria, y se aplicaron además las dosis para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana con sus respectivos controles, haciendo un total de 18 unidades experimentales en cada caso y por cada bacteria identificada, como se observa en las tablas 2 y 3.

#### **Criterios de inclusión:**

Bacterias de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus* identificadas a partir de muestras de orina de gestantes con diagnóstico de infección urinaria del Centro de Salud Simón Bolívar de Puno.

Tubérculos de “isaño” en buen estado de desarrollo, sin signos de enfermedades y daño físico.



### **Criterios de exclusión:**

Urocultivos negativos y positivos a bacterias uropatógenas distintas a *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*.

Tubérculos de “isaño” que se encuentren en mal estado de desarrollo, y que presente signos visibles de daño.

### **3.4 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN**

Para determinar la CMI del extracto etanólico de “isaño” sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*, se trabajaron 18 unidades experimentales, conformado por 6 tratamientos y 3 repeticiones de cada uno. Los tratamientos fueron: un control (medio de cultivo Müller Hinton sin extracto etanólico), y 5 tratamientos con extracto etanólico a concentraciones de 3.13 %, 6.25 %, 12.50 %, 25.00 % y 50.00 %, en caldo Müller Hinton, preparados de la siguiente manera:

1° Concentración: 2 ml de extracto etanólico + 2 ml de caldo MH = 50 %

2° Concentración: 1 ml de extracto etanólico + 3 ml de caldo MH = 25 %

3° Concentración: 0.5 ml de extracto etanólico + 3.5 ml de caldo MH = 12.5 %

4° Concentración: 0.25 ml de extracto etanólico + 3.75 ml de caldo MH = 6.25 %

5° Concentración: 0.125 ml de extracto etanólico + 3.875 ml de caldo MH = 3.125 %

**Tabla 2.** Diseño experimental para determinar la CMI del extracto etanólico de "isaño" sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*.

Repeticiones	Control (Caldo Müller Hinton)	Concentración de extracto etanólico de "isaño" <i>Tropaeolum tuberosum</i> en caldo Müller Hinton (v/v)					Total
		3.13%	6.25%	12.50%	25.00%	50.00%	
1	1	1	1	1	1	1	6
2	1	1	1	1	1	1	6
3	1	1	1	1	1	1	6
Total	3	3	3	3	3	3	18

Para determinar la susceptibilidad antibacteriana de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus* frente a los extractos etanólico de "isaño", se trabajaron con 18 unidades experimentales, conformado por 6 tratamientos y 3 repeticiones por cada uno. Los tratamientos fueron: un control (antibiótico cefalexina y oxacilina), y 5 tratamientos con extracto etanólico aplicados sobre discos de papel filtro en dosis de 10; 20; 30; 40 y 50 µl. Los antibióticos cefalexina y oxacilina sirvieron para comparar el efecto inhibitorio del extracto etanólico, ya que se conoce que *Escherichia coli* y *Klebsiella sp*, son sensibles a la cefalexina, y *Staphylococcus aureus* a la oxacilina.

**Tabla 3.** Diseño experimental para la determinación de susceptibilidad antimicrobiana del extracto etanólico de "isaño" sobre de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*.

Repeticiones	Control cefalexina/oxacilina	Dosis de extracto etanólico de <i>Tropaeolum tuberosum</i> "isaño"					Total
		10 µl	20 µl	30 µl	40 µl	50 µl	
1	1	1	1	1	1	1	6
2	1	1	1	1	1	1	6
3	1	1	1	1	1	1	6
Total	3	3	3	3	3	3	18





## **Descripción de los materiales y equipos**

### **Materiales biológicos**

Se obtuvieron y utilizaron uropatógenos identificados de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*, a partir de muestras de orina de gestantes diagnosticadas con infección urinaria, que acudieron al Centro de Salud Simón Bolívar 1-3 de Puno. Asimismo, se adquirió tubérculos de *Tropaeolum tuberosum* “isaño”, del Mercado Unión y Dignidad de Puno. Finalmente se utilizaron discos de antibióticos de cefalexina y oxacilina para antibiograma.

### **Material de vidrio**

Se utilizaron los siguientes: Matraces, tubos de ensayo, probetas, botellas acarameladas con tapa estéril, pipeta y placas Petri de vidrio pírex.

### **Equipos y materiales**

Se utilizaron los siguientes equipos: Refrigeradora (modelo CA29, marca Coldex, número de serie 0101036696), incubadora (modelo TZ4ST, marca Autonics, número de serie ID-110507), estufa de esterilización (modelo, ED 23, marca BINDER), autoclave (marca: BIONET, número de serie AV-201207), contador de colonias (marca Quimis, número de serie 045, de procedencia Brasil), cámara biológica de Clase I (modelo JSCB-1200SB, marca BIOHAZARD SAFETY CABINET, con número de serie 071025-04, de procedencia Corea), pipetas calibradas, mechero Bunsen, balanza analítica electrónica, gradillas, asas de Kholle, agujas de Kholle, soporte universal, cámara fotográfica, molino de tracción para la trituración y pinza estéril marca Sigma.



### **Medios de cultivos**

Se utilizaron los siguientes medios: Agar Müller Hinton (MH), Agar Eosin Metil Blue (EMB) y Manitol Salado (MS).

### **Otros materiales**

Agua destilada para el lavado, etanol, escobillas, rotulador de cera, tiras de pH, suero fisiológico, bolsas de papel, guante de goma (guantes de látex), algodón, papel Kraft, punteras de plástico, pabilo, hisopos estériles, barbijo, frascos de orina, cooler y vernier calibrado.

### **Obtención de tubérculos de “isaño”**

Se adquirieron 4 kg de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” de la variedad “isaño negro” del mercado Unión Dignidad de Puno, posteriormente fueron trasladados al Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano-Puno. Se procedió al pre tratamiento de la materia prima, donde se desinfectó con hipoclorito de sodio al 10% v/v en agua destilada, se seleccionó y separó las impurezas (tubérculos dañados, tierra, otros tubérculos, entre otros), inmediatamente fue almacenado en bolsas zip lock previamente etiquetadas, con la finalidad de evitar el deterioro del tubérculo.

Seguidamente se procedió con el secado en un ambiente protegido de la luz solar, ventilada por un lapso de 15 días con la finalidad de eliminar la mayor cantidad de agua de las células y tejidos del tubérculo, con el fin de no alterar sus componentes.



### 3.5 METODOLOGÍA

#### **Obtención de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* (isaño).**

La obtención del extracto etanólico fue realizada por el responsable de la investigación, en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, siguiendo el protocolo de extracción por maceración (Quispe, 2018).

#### **Método: Extracción por maceración.**

**Fundamento:** El extracto es obtenido a partir de materia prima desecada de origen vegetal por maceración en contacto con etanol, seguida de la eliminación de dicho solvente por un procedimiento físico, estos procesos pueden ser sometidos a determinadas operaciones para eliminar algunos de sus componentes y así mejorar notablemente la calidad del producto deseado. El extracto tiene un olor característico.

**Procedimiento:** A partir de 250 g de muestra seca de tubérculos de “isaño”, se procedió al molido utilizando un molino de tracción, la muestra molida fue macerada con 750 ml de mezcla de etanol al 70% en agua, en un frasco de vidrio acaramelado de boca ancha, en un ambiente oscuro durante 15 días a temperatura ambiente (15 - 18 °C), luego se procedió a filtrar la solución orgánica, dejando evaporar finalmente el alcohol a temperatura ambiente hasta que el volumen del extracto se mantuvo constante (10 días). El extracto sirvió para preparar las diferentes concentraciones (3.13%, 6.25%, 12.50%, 25.00% y 50.00%) y la aplicación de las dosis experimentales (10 µl, 20 µl, 30 µl, 40 µl y 50 µl).



**a. Identificación de bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus* a partir de muestras de pacientes gestantes con infección urinaria.**

**Frecuencia de muestreo**

El muestreo para la identificación de uropatógenos *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus* se realizó en el Laboratorio del Centro de Salud Simón Bolívar de Puno, mediante la obtención de orina de las gestantes con infección urinaria, que acudían a este establecimiento de salud; el registro de datos se procedió con una frecuencia de dos a tres veces a la semana en la medida que iban presentándose gestantes con infección urinaria, esto por la mínima cantidad de pacientes; durante los meses setiembre, octubre y noviembre del 2019.

**Obtención de las muestras de orina**

Se obtuvo las muestras de orina para urocultivo de gestantes provenientes del Centro de Salud Simón Bolívar 1-3 de Puno. El transporte y bioseguridad se tomó muy en cuenta ya que estas son sustancias infecciosas, por tanto, se aplicó el sistema de embalaje triple. Este sistema de embalaje consta de tres componentes: el recipiente primario, el embalaje secundario y el embalaje externo. El recipiente primario que contiene la muestra debe ser estanco, a prueba de fugas y estar debidamente etiquetado en relación con el contenido, estas fueron envueltas en material absorbente suficiente para absorber todo el líquido en caso de rotura o fuga, posterior a ello se transportó en una caja de tecnopor bien hermetizada, hasta llegar al laboratorio.



### **Identificación de *Escherichia coli* y *Klebsiella sp***

**Método:** Cultivo *in vitro* en agar Eosin Metil Blue (EMB) (Mamani, 2017).

**Fundamento:** El agar EMB, es un medio utilizado para obtener un mejor rendimiento en la identificación selectiva de enterobacterias y otras especies de bacilos Gram negativos. La diferenciación entre organismos capaces de utilizar la lactosa y/o sacarosa, y aquellos que son incapaces de hacerlo, está dada por los indicadores eosina y azul de metileno, éstos ejercen un efecto inhibitorio sobre muchas bacterias Gram positivas. En ella *Escherichia coli* presenta un característico brillo metálico. Las cepas que utilizan la lactosa poseen centro oscuro con periferia azulada o rosada, mientras que las que no lo hacen son incoloras.

**Procedimiento:** Las muestras de orina positivas a infección urinaria, fueron cultivadas en medio de cultivo agar EMB, mediante estrías en cuatro cuadrantes.

Para la identificación preliminar mediante las características de las colonias en el medio de cultivo, se identificaron como *Escherichia coli* aquellas que presentan colonias verdosas con brillo metálico y centro negro azulado, y *Klebsiella sp* aquellas con características mucosas y rosa púrpura.

Asimismo, se realizó la tinción de Gram y pruebas bioquímicas en TSI, LIA, CS, SIM para la identificación de las bacterias.

### **Identificación de *Staphylococcus aureus***

**Método:** Cultivo *in vitro* en agar Manitol Salado (MS) (Mamani, 2017).

**Fundamento:** El agar MS, se trata de un medio altamente selectivo debido a su alta concentración salina. Los estafilococos coagulasa positiva hidrolizan el manitol acidificando el medio; las colonias aparecen rodeadas de una zona amarilla brillante. Los



estafilococos coagulasa negativos, presentan colonias rodeadas de una zona roja o púrpura. Las colonias sospechosas, se repicaron en un medio sin exceso de cloruro de sodio para efectuarles posteriormente la prueba de la coagulasa. En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripeptona, constituye la fuente de carbono fermentable, el cloruro de sodio (que se encuentra en alta concentración) es el agente selectivo que inhibe el desarrollo de la flora acompañante, y el rojo fenol es el indicador de pH.

**Procedimiento:** Las muestras de orina positivas a la infección urinaria, fueron cultivadas en el medio de cultivo agar MS, mediante estrías en cuatro cuadrantes.

Para la identificación preliminar mediante las características de las colonias en el medio de cultivo, se identificaron como *Staphylococcus aureus* aquellas que presentan colonias amarillas de crecimiento excelente.

Asimismo, se realizaron la tinción Gram y pruebas de coagulasa y catalasa para su identificación.

### **Variables a analizar**

#### **Variable independiente.**

Muestras de orina de gestantes diagnosticadas con infección urinaria que acuden al Centro de Salud Simón Bolívar 1-3 de Puno.

#### **Variable dependiente.**

Uropatógenos identificados de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*.

### **Prueba bioestadística de resultados**

A partir de la cantidad de uropatógenos identificados de muestras de orina, se realizó el análisis de datos mediante el chi cuadrado, con un nivel de confiabilidad del



5%. Para este análisis se utilizó el software estadístico Infostat (2019) versión estudiantil. Por otro lado, la frecuencia de identificación de las bacterias a partir de las muestras de orinas, fueron representados en porcentajes de uropatógenos.

**b. Determinación de la concentración mínima inhibitoria *in vitro* de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*.**

**Frecuencia de muestreo**

La determinación de la concentración mínima inhibitoria *in vitro* de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus* se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, donde el registro de datos se obtuvo después de 24 horas de cultivo en diferentes concentraciones de extracto etanólico de “isaño” en los tubos de ensayo, mediante la observación de la turbidez de los tubos, durante los meses octubre a diciembre.

**Preparación del inóculo**

Los aislamientos de *Escherichia coli* y *Klebsiella sp* previamente identificadas fueron repicadas en agar EMB (agar Eosin Metil Blue) e incubadas durante 24 a 48 horas, para la preparación del inóculo en la determinación del efecto antibacteriano del extracto etanólico de “isaño”, así como también los de *Staphylococcus aureus* en MS (agar Manitol Salado). Se seleccionaron y se recogieron con asa de Kolle, 4 a 5 colonias, con similar morfología, teniendo el cuidado de no recoger medio de cultivo. Con estas colonias se preparó una suspensión en 2 ml en caldo Müller Hinton. Luego la suspensión bacteriana fue incubada a 35°C hasta alcanzar o exceder la turbidez del estándar de Mc Farland 0.5 (2 horas). Finalmente se realizó el ajuste a la turbidez del inóculo por



comparación visual, agregando caldo Müller Hinton, hasta una turbidez equivalente al tubo 0.5 de Mc Farland, para ello, se observó los tubos contra un fondo blanco con una línea negra como contraste.

### **Proceso de evaluación del efecto antibacteriano.**

#### **Métodos de dilución en caldo en el tubo (SEIMC, 2000).**

**Fundamento:** La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante alguna de las variantes de los métodos de dilución. En los métodos de dilución en caldo se colocan concentraciones decrecientes del agente antimicrobiano en tubos con un caldo nutritivo que sostendrá el desarrollo del microorganismo. Aquellos tubos en los que la concentración de antimicrobiano no es efectiva aparece turbios dado por el crecimiento bacteriano. El caldo más comúnmente usado para estas pruebas es el de Müller Hinton por las mismas razones que el agar. Los agentes antimicrobianos en distintas concentraciones se preparan en soluciones concentradas en un diluyente apropiado y luego se diluyen hasta obtener las concentraciones apropiadas (generalmente diluciones al medio). El inóculo estándar del microorganismo es, con mayor frecuencia de  $1 \times 10^8$  UFC igual al tubo 0.5 de Mc Farland.

**Procedimiento:** Para determinar la concentración mínima inhibitoria se inocularon 2 ml con la suspensión de  $1 \times 10^8$  UFC de la cepa de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus* de acuerdo al estándar de Mc Farland, en los tubos contenidos con 2 ml de caldo Müller Hinton más extracto etanólico en concentraciones 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 % (3 tubos por concentración), para obtener las concentraciones de 50, 25, 12.5, 6.25 y 3.13 % de extracto etanólico de isaño, teniendo en cuenta que la concentración del extracto etanólico se diluye a la mitad, además se inocularon 3 tubos control por cada cepa solo con caldo Müller Hinton sin extracto etanólico que sirvió como control de





crecimiento. Posterior a ello se procedió a la incubación por 24 horas a una temperatura de 35 a 37°C, después de la incubación los tubos se examinaron en busca del desarrollo para demostrar a que concentración mínima inhibitoria (CMI) la bacteria muestra crecimiento, observando la turbidez de los tubos por comparación con el control.

### **Variables a analizar**

#### **Variable independiente.**

Concentraciones extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” en caldo Müller Hinton: 3.13%, 6.25%, 12.50%, 25.00% y 50.00%.

Uropatógenos de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus* identificados.

#### **Variable dependiente.**

Concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” (efecto antibacteriano) sobre cada uropatógeno identificado.

### **Pruebas bioestadísticas de datos**

Para la comparación del efecto antibacteriano de la concentración mínima inhibitoria *in vitro* de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*, se evaluaron las diferencias estadísticas entre las concentraciones de extracto etanólico de “isaño” y el control de los bioensayos, para lo cual se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de un diseño completamente al azar (DCA). Para determinar la existencia de diferencias entre las concentraciones respecto a la inhibición producida en *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*, por el efecto de extracto, asimismo se realizó la prueba de rango múltiple de Tukey para realizar la prueba de comparación de medias entre los tratamientos.



## Prueba de rango múltiple de Tukey

Tukey propuso un procedimiento para evaluar la hipótesis nula con  $\alpha$  siendo exactamente el nivel global de significancia, cuando las muestras tienen tamaños iguales, y en el máximo  $\alpha$ , cuando las muestras tienen tamaños diferentes.

### c. Susceptibilidad antibacteriana *in vitro* de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*, al extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño”.

#### Frecuencia de muestreo

Para la determinación de la susceptibilidad antibacteriana *in vitro*, de los uropatógenos identificadas sobre el extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, donde el registro de datos se obtuvo después de 24 horas posterior a la instalación de las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos en placas Petri, mediante la medición de los halos de inhibición producidos por *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus* frente a las dosis de extracto etanólico de “isaño” durante los meses octubre a diciembre del 2019.



### **Preparación de discos con extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño”**

(Quispe, 2018).

Utilizando el extracto etanólico de “isaño”, se ensayaron las siguientes dosis, todas ellas por triplicado en cantidad 1 ml.

Tratamiento 1(T1): 20% de extracto + 80% de etanol = dosis 10  $\mu$ l

Tratamiento 2(T1): 40% de extracto + 60 % de etanol = dosis 20  $\mu$ l

Tratamiento 3(T1): 60% de extracto + 40 % de etanol = dosis 30  $\mu$ l

Tratamiento 4(T1): 80% de extracto + 20 % de etanol = dosis 40  $\mu$ l

Tratamiento 5(T1): 100 % de extracto = dosis 50  $\mu$ l

Tratamiento control sin extracto etanólico: etanol.

Tratamiento control con antibiótico (TC): discos de Cefalexina (30  $\mu$ g) y Oxacilina (1  $\mu$ g).

Con la ayuda de micropipetas se empaparon los discos de papel filtro Whatman N° 4 exento de cenizas a manera de discos de antibiograma (6 mm de diámetro), cada uno con 50  $\mu$ l (1 gota). Las mismas posteriormente se secaron a temperatura ambiente hasta evaporación completa del solvente. Las dosis correspondientes y con tres repeticiones, posteriormente fueron utilizadas como inhibidores de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*.

### **Preparación del medio de cultivo agar Müller Hinton (Calsin, 2017).**

**Fundamento:** El agar Müller Hinton se considera el mejor medio para las pruebas de sensibilidad de rutina dado que muestran buena reproducibilidad lote a lote en las pruebas de sensibilidad, contiene bajo nivel de inhibidores de sulfonamidas, trimetoprima y



tetraciclina, es adecuado para el desarrollo de la mayoría de las bacterias patógenas y existen suficientes datos recopilados que avalan la experiencia de las pruebas de sensibilidad realizadas en este medio.

**Procedimiento:** Según su especificación para su respectiva hidratación, se preparó la cantidad de 20.4 g de agar con 600 ml de agua destilada para 30 placas. Luego se llevó el medio a esterilización en autoclave a 120 °C por 30 minutos. Antes que el medio de cultivo se enfríe, se realizó el plaqueo, vertiendo aproximadamente 20 ml de medio Müller Hinton en cada placa estéril vacía, luego se esperó su solidificación. No obstante, se verificaron el pH del agua destilada (7.2-7.4), empleando tiras reactivas.

**Preparación del estándar Mc Farland** (Calsin, 2017).

**Fundamento:** El inóculo bacteriano debe contener una cantidad normatizada de unidades formadoras de colonias (UFC), para minimizar la variación de la población bacteriana, esta cantidad es de  $1 \times 10^8$  UFC/ml la que se determinó mediante el estándar de Mc Farland.

**Procedimiento:** Para estandarizar la densidad óptica del inóculo se utilizó una suspensión de sulfato de bario como estándar de turbidez (0.5 de la escala de Mc Farland). Para prepararlo se procedió de la siguiente manera: Se agregó 0,5 ml de BaCl<sub>2</sub> (1,175% peso/volumen) a 99,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,36 N (1%). Luego se verificó la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro; la absorbancia a 625 nm debe ser 0,03 - 0,10 para el estándar 0,5 de Mc Farland. Se distribuyó 2 - 4 ml de la solución en tubos similares a los que se usan para preparar los inóculos y se mantuvieron guardados a temperatura ambiente al abrigo de la luz. Antes de su uso y para lograr una turbidez homogénea, se agitó vigorosamente cada estándar.



**Método: difusión con discos** (Zuni, 2017).

**Fundamento:** El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición.

**Procedimiento:** Se aplicaron los discos de papel filtro impregnados con las diferentes dosis de extracto etanólico, luego se sumergió un hisopo estéril en la suspensión bacteriana de  $1 \times 10^8$  UFC/ml (turbidez estándar de 0.5 de Mc Farland), se inoculó la superficie en cada placa de Agar Müller Hinton, dispensándolo en la superficie del medio con el hisopo en diferentes direcciones para asegurar una distribución uniforme del inoculo, luego con la ayuda de una pinza estéril se colocaron los discos de papel filtro sobre la superficie del Agar con cada una de las dosis de extracto etanólico de “isaño” en estudio, como control positivo se utilizó discos de cefalexina y oxacilina, así como control negativo se utilizó discos que previamente han sido impregnados con etanol, el mismo que previo a la colocación en las placas se evaporaron completamente. Posteriormente se procedió a la incubación de las placas en posición invertida a 37 °C durante 24 a 48 horas, para su posterior lectura e interpretación de resultados. Después del tiempo de incubación se examinó cada placa y se procedió a medir con un vernier calibrado los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco.



## **Variables a analizar**

### **Variable independiente.**

Dosis de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” en discos de susceptibilidad: 10  $\mu$ l, 20  $\mu$ l, 30  $\mu$ l, 40  $\mu$ l y 50  $\mu$ l.

Uropatógenos de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus* identificados.

### **Variable dependiente.**

Respuestas de susceptibilidad antibacteriana frente a extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” de los uropatógenos *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus* identificados (sensible, intermedio y resistente).

## **Pruebas bioestadísticas de datos**

Para la comparación de la susceptibilidad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño”, el antibiótico cefalexina frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*; y *Staphylococcus aureus* frente a oxacilina, se evaluó las diferencias estadísticas entre las dosis de extracto etanólico de “isaño” y el control de los bioensayos (control positivo), para lo cual se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de un diseño completamente al azar (DCA). Para determinar la existencia de diferencias entre las dosis respecto a la inhibición producida en *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*, por el efecto del extracto, asimismo se realizó la prueba de rango múltiple de Tukey para realizar la prueba de comparación de medias entre los tratamientos.

## CAPITULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS UROPATÓGENAS DE *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*.

Los urocultivos positivos que se presentaron a partir de 36 muestras de mujeres gestantes de la población de estudio fueron 21 (58.4%), de las cuales se identificaron 7 aislamientos de *Escherichia coli* (33.3%); 1 de *Klebsiella sp* (4.7%); 2 de *Staphylococcus aureus*, (9.5%); y 11 de otras bacterias, (52.3%) y 15 urocultivos negativos (41.7%). La frecuencia de bacterias uropatógenas presentó diferencias estadísticas significativas ( $\chi^2 c= 19.56$ ; GL = 4; P = 0.0006), **Tabla 4**.

**Tabla 4.** Bacterias uropatógenas en gestantes con infección de tracto urinario del Centro de Salud Simón Bolívar de Puno.

UROCULTIVOS/uropatógenos	N°	%
<b>POSITIVOS</b>	21	<b>58.3%</b>
<i>Escherichia coli</i>	7	33.3% *
<i>Klebsiella sp</i>	1	4.7% *
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	9.5% *
Otras bacterias	11	52.3% *
<b>NEGATIVOS</b>	15	<b>41.7%</b>
<b>Total</b>	36	<b>100.0%</b>

$\chi^2 c= 19.56$ ; GL = 4; P = 0.0006

\* Los porcentajes de los uropatógenos corresponden en proporción a los casos positivos.

Los resultados demuestran que la mayor cantidad de bacterias uropatógenas identificadas en pacientes con infección del tracto urinario en gestantes que acuden al Centro de Salud Simón Bolívar de Puno son de *Escherichia coli*, seguidas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella sp*. Los resultados obtenidos sobre la predominancia de bacterias identificadas son parecidos a los encontrados por Quirós y Apolaya (2018),



quienes aislaron 63.6% de *Escherichia coli* de las 1455 pacientes que finalizaron el embarazo en la Clínica Jesús del Norte del distrito Independencia de Lima, entre enero de 2016 y diciembre del 2017, así mismo Cuba (2013), reportó a partir 141 pacientes que acuden a consultorio externo del Hospital III ESSALUD Juliaca, entre mayo - julio del 2012, 109 casos de *E. coli*, 6 de *S. epidermidis*, 5 de *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella ascorbata* respectivamente; solo 2 casos de *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus xylosus*, otros uropatógenos 7. Campo *et al.*, (2017) reportó en 10,6 % de bacteriuria asintomática, en donde el uropatógeno más frecuentemente identificado fue *Escherichia coli* en un 25 % de los casos el mismo que concuerda con nuestros resultados respecto a la predominancia de bacterias de *E. coli*.

Un estudio sobre frecuencia de bacteriuria asintomática realizada por Campos *et al.*, (2013) menciona que fue tres veces mayor en gestantes que retuvieron la orina, y las gestantes que tenían relaciones sexuales diarias tuvieron 70% mayor posibilidad de hacer bacteriuria asintomática. Estas enfermedades de salud pública se reportan a menudo siendo los principales causantes según Baca, (2017) *Escherichia coli* con 90 %, seguido de *Klebsiella sp.* 6 %, *Proteus sp.* 5 %, *Enterobacter sp.* 2 %, *Pseudomonas aeruginosa* 2 %, que es corroborado por Mamani, (2017) donde menciona que en las muestras de orinas de gestantes, las bacterias que presentaron mayor frecuencia fueron *Escherichia coli*, seguido de *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*. Esto muestra la similitud de predominancia de *E. coli* que obtuvimos respecto a las otras bacterias uropatógenas en estudio.

Las infecciones del tracto urinario en las gestantes de la población de estudio es causada en mayor proporción por las bacteria uropatógena *Escherichia coli*, seguido de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella sp*, esto se debe a la contigüidad de los orificios anal



y genital, además que durante la gestación se producen modificaciones anatómicas y fisiológicas que aumentan el riesgo de la infección urinaria, aparentemente debido a las estasis urinaria, la hipoperistalsis uretral hormonal, y compresión del útero contra los uréteres y cambios físico-químico de la orina.

#### 4.2. CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA *In Vitro* DE EXTRACTO ETANÓLICO DE *Tropaeolum tuberosum* “ISAÑO” SOBRE *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*

Según los resultados del crecimiento de bacterias uropatógenas en caldo Müller Hinton con diferentes concentraciones de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum*, se estableció que la concentración mínima inhibitoria (CMI) en todos los bioensayos frente a *Escherichia coli* fue del 12.50%, en *Klebsiella sp* 25.00% y para *Staphylococcus aureus* 6.25%, esto, evidenciado por la ausencia de crecimiento bacteriano en los tubos de prueba con la mayor concentración de extracto etanólico (Tabla 5).

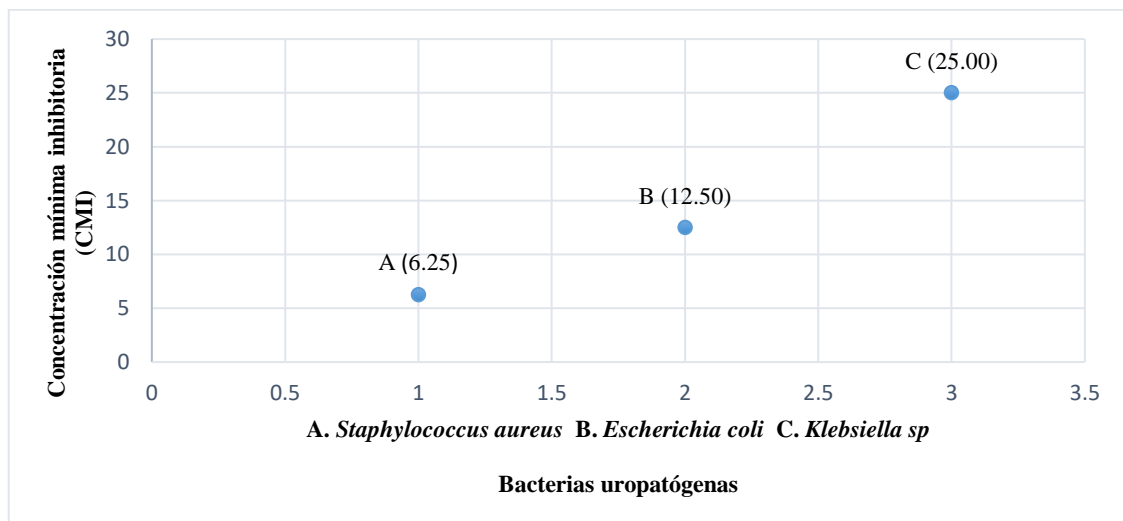
**Tabla 5.** Concentración mínima inhibitoria (CMI) de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño”, sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*.

Bacterias uropatógenas	Caldo Müller Hinton (control)	Concentración de extracto etanólico en caldo Müller Hinton					CMI
		3.13%	6.25%	12.50%	25.00%	50.00%	
<i>Escherichia coli</i> (a <sub>1</sub> )	+	+	+	-	-	-	12.50%
<i>Escherichia coli</i> (a <sub>2</sub> )	+	+	+	-	-	-	12.50%
<i>Escherichia coli</i> (a <sub>3</sub> )	+	+	+	-	-	-	12.50%
<i>Escherichia coli</i> (a <sub>4</sub> )	+	+	+	-	-	-	12.50%
<i>Escherichia coli</i> (a <sub>5</sub> )	+	+	+	-	-	-	12.50%
<i>Escherichia coli</i> (a <sub>6</sub> )	+	+	+	-	-	-	12.50%
<i>Escherichia coli</i> (a <sub>7</sub> )	+	+	+	-	-	-	12.50%
<i>Klebsiella sp</i> (a <sub>1</sub> )	+	+	+	+	-	-	25.00%
<i>Staphylococcus aureus</i> (a <sub>1</sub> )	+	+	-	-	-	-	6.25%
<i>Staphylococcus aureus</i> (a <sub>2</sub> )	+	+	-	-	-	-	6.25%

Dónde: (+) con crecimiento y (-) sin crecimiento.

a<sub>n</sub>: uropatógenos identificados

Las diferencias observadas de CMI sobre las tres bacterias uropatógenas, según análisis de varianza (ANOVA), resultaron estadísticamente con diferencia significativa ( $F_c=288.12$ ;  $gl=2$ ;  $p<0.0001$ ), demostrando que al menos uno de los valores de CMI de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* frente a las bacterias en estudio fue diferente y posee efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*. Teniendo en cuenta la significancia de la prueba de análisis de varianza, según la prueba de Tukey, resultó que la mayor concentración encontrada fue 25.00% frente a *Klebsiella sp*. (Figura 2).



**Figura 2.** Diferencias estadísticas significativas ( $p<0.0001$ ) del efecto antibacteriano de extracto etanólico de “isaño” sobre bacterias uropatógenas representadas en letras diferentes (A, B y C)

El extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” es una sustancia inhibitoria sobre los uropatógenos en estudio, estableciéndose una CMI de 6.25 % para *Staphylococcus aureus*, 12.50 % para *Escherichia coli* y 25.00 % para *Klebsiella sp*, siendo esta sustancia más efectiva frente a *S. aureus* respecto a las otras bacterias, en tanto que es necesario una mayor concentración frente a *Klebsiella sp*. Las concentraciones menores respecto a las CMI establecidas para cada bacteria, fueron insuficientes para



obtener efecto antibacteriano, debido a que prácticamente no mostraron ningún efecto inhibitorio del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum*.

Según (CIP, 2013), los isotiocianatos presentes en el “isaño”, son conocidos por sus propiedades antibióticas, insecticidas, nematocidas, anticancerígenas y diuréticas, lo que contribuye a sustentar el uso tradicional del “isaño” en la medicina folclórica de los Andes, así como también el efecto antibacteriano encontrado sobre los aislamientos de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, y *Staphylococcus aureus* en nuestras unidades de análisis, posiblemente se deba a los metabolitos secundarios que posee este tubérculo, como alcaloides, triterpenos, esteroides, quinonas, cumarinas, taninos, saponinas, y antocianidinas, azúcares, variando según la intensidad de coloración o precipitado. Ello sustenta la aplicación etnofarmacológica para tratar distintas enfermedades mediante su ingesta, tanto del tubérculo completo o en productos farmacéuticos, utilizando sus metabolitos secundarios mediante tamizaje fitoquímico y de Cromatografía de los extractos metanólico y acuoso del *Tropaeolum tuberosum* “isaño”, variedad rosada (Villacis y Viñan, 2018). Así mismo, este estudio nos menciona que el tubérculo de *Tropaeolum tuberosum*. *Ssp tuberosum* variedad amarilla, presenta metabolitos secundarios más abundantes como alcaloides, triterpenos, esteroides, fenoles, taninos pirocatecólicos, flavonoides del tipo catequinas, cumarinas y aminoácidos, de los cuales el contenido de fenoles y flavonoides se van degradando a medida que aumenta la temperatura, por lo que pierde potencial farmacológico al cocinarla, y compuestos como la betaína y el beta sitosterol, posiblemente con mayor interés farmacéutico (Durazno y Herrera, 2018).



La actividad inhibitoria de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” sobre cepas ATCC de *Escherichia coli* fue demostrada por Candia (2016), quien reportó una CMI de 18.75 mg/ml (equivalente a 1.87% en solución porcentual) a partir de extracto acuoso, siendo esta menor a la que encontramos en nuestro estudio con extracto etanólico (12.50% para *E. coli* y 25.00% *Klebsiella sp*). La diferencia podría deberse al método de obtención de los extractos sometidos a prueba. Otro factor de variabilidad podría ser la variedad de “isaño”, que en nuestro estudio es la denominada “negra” y no es precisada en la que utilizamos como comparación. Por otra parte, un estudio publicado por Aguirre (2017), en la que utilizó extracto etanólico de flores y hojas de otra especie taxonómicamente muy cercana, *Tropaeolum majus* "mastuerzo" sobre *Escherichia coli* uropatógena, reportó efecto antibacteriano con una CMI de 75%. Esta actividad antibacteriana notoriamente menor a la ejercida por *Tropaeolum tuberosum* “isaño”, podría significar que además de la especie, los tallos y flores en comparación a los tubérculos poseen menor cantidad de compuestos inhibitorios.

Respecto a *Staphylococcus aureus* se pudo hallar que el extracto etanólico de “isaño” presenta una menor CMI, comparado con las otras especies bacterianas en estudio. Estos resultados confirman el efecto antibacteriano del tubérculo *Tropaeolum tuberosum* “isaño”, y en el trabajos citados por Doylet y Rodríguez, (2018) mencionan que tiene un sin número de aplicaciones en la medicina tradicional, como antibacteriano contra *Staphylococcus sp*, siendo efectivos contra las dolencias genitourinarias. El “isaño” también se emplea en el tratamiento de enfermedades como cálculos del aparato renal, como un antibiótico natural, sobre cepas de *Staphylococcus sp* (Córdova y Inga, 2019). Otro estudio realizado sobre el extracto hidro alcohólico de hojas y flores *Tropaeolum majus* “mastuerzo” presentó efecto antibacteriano *in vitro* sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, a una CMI de 8,75% (v/v) (Chirinos y Chota, 2018),



todo ello es posiblemente debido a que, así como el tubérculo *Tropaeolum tuberosum* presenta glucosinolatos, también *Tropaeolum majus* L. contiene un solo glucosinolato, que es la glucotropaeolina. El principio activo tóxico principal es un aceite esencial glucósido, que ingerido en dosis terapéuticas se le atribuyen propiedades bacteriostáticas y antimicóticas (Gamarra y Ramos, 2017).

Según Patiño (2003), las bacterias grampositivas, presentan una pared celular, que usualmente no es una barrera que impida la penetración de los antibióticos; sin embargo, en las gramnegativas, representa una barrera difícil de vencer que varía según las diferentes especies. Estas diferencias de concentraciones mínimas inhibitorias del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* frente a las tres bacterias en estudio, posiblemente es debido a las diferencias de la pared celular de grampositivas y gramnegativas, siendo las grampositivas menos resistentes que las gramnegativas. A más de que la capacidad antimicrobiana que posee este tubérculo se debería a la presencia de glucosinolatos aromáticos que al ser hidrolizados se transforman en isotiocianatos, compuestos químicos responsables de otorgar el típico sabor picante a los tubérculos.

De los resultados obtenidos sobre concentración mínima inhibitoria se ha encontrado, por lo tanto, efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, y *Staphylococcus aureus*, siendo menor sin embargo sobre las 2 enterobacterias en estudio.

#### **4.3. SUSCEPTIBILIDAD ANTIBACTERIANA DE *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus* In Vitro, FRENTE A LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Tropaeolum tuberosum* “ISAÑO”.**

##### **a) Susceptibilidad antibacteriana de *Escherichia coli*.**

Las lecturas del ensayo difusión de Kirby Bäuier a diferentes dosis de extracto etanólico del tubérculo “isaño” en los discos de papel filtro frente a los 7 aislamientos de *Escherichia coli* identificados ( $a_1$ ,  $a_2$ ,  $a_3$ ,  $a_4$ ,  $a_5$ ,  $a_6$  y  $a_7$ ), resultaron de la siguiente manera: El control positivo cefalexina (30  $\mu\text{g}$ ), mostró promedios de halos de inhibición de 20, 20; 23; 23; 22; 21 y 21 mm por cada uno, mientras que para los discos con extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* a dosis de 10; 20; 30; 40 y 50  $\mu\text{l}$  frente a los 7 aislamientos de *Escherichia coli* identificados, la mayor dosis (50  $\mu\text{l}$ ) presentó promedios de halos de inhibición de 9; 10; 12; 12; 11; 10 y 10 mm respectivamente, mientras que para la menor dosis (10  $\mu\text{l}$ ) no se evidenció ningún halo de inhibición, del mismo modo el control negativo (disco con etanol al 70% evaporado) tampoco mostró halo de inhibición (Tabla 6).

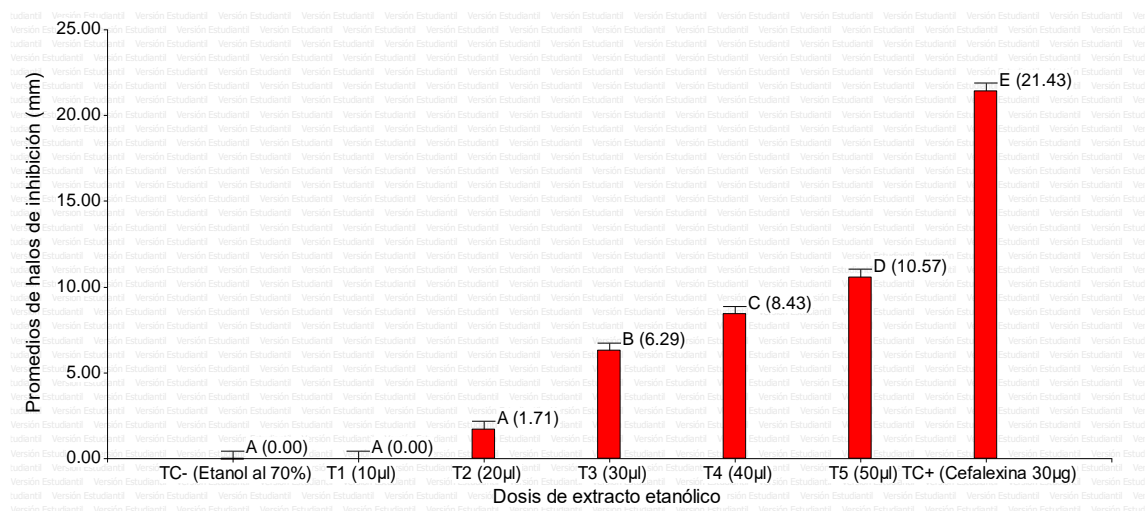
**Tabla 6.** Promedios de halos de inhibición (mm) sobre *Escherichia coli* a diferentes dosis de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum*, comparado con el control positivo (Cefalexina).

<i>Escherichia coli</i>	Promedios de halos de inhibición (mm) a diferentes dosis de extracto etanólico y controles						
	Control negativo etanol al 70%	10 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$	30 $\mu\text{l}$	40 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	Control positivo Cefalexina 30 $\mu\text{g}$
$a_1$	0	0	0	6	7	9	20
$a_2$	0	0	0	6	8	10	20
$a_3$	0	0	6	7	9	12	23
$a_4$	0	0	4	7	10	12	23
$a_5$	0	0	2	6	9	11	22
$a_6$	0	0	0	6	7	10	21
$a_7$	0	0	0	6	9	10	21

Diámetros críticos (mm) de halos de inhibición del antibiótico Cefalexina 30  $\mu\text{g}$  frente a enterobacterias:  $\leq 14$  resistente, 15 – 17 intermedio,  $\geq 18$ , sensible Según INS, 2002. Los promedios se obtuvieron a partir de 3 repeticiones por aislamiento.

Para analizar estadísticamente las diferencias de halos de inhibición observadas se procedió con el análisis de varianza (ANOVA) respectivo, donde los siete tratamientos probados en la investigación, resultaron con diferencia estadística significativa

( $F_c=276.12$ ;  $g_l=6$ ;  $p<0.0001$ ), demostrando que al menos uno de los tratamientos controles y con extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* fue diferente. Sin embargo, *Escherichia coli* no es susceptible frente a las dosis de extracto etanólico aplicados en nuestro estudio, según los diámetros críticos de halos de inhibición para antibiótico Cefalexina presentados. Teniendo en cuenta la significancia de la prueba de análisis de varianza, la prueba de Tukey resultó que *E. coli* es susceptible solo al tratamiento control positivo (cefalexina 30  $\mu$ g), (Figura 3).



**Figura 3.** Diferencia estadística significativa del efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* a diferentes dosis frente a *Escherichia coli*, comparado con el antibiótico cefalexina.

Para establecer la categorización de la susceptibilidad antimicrobiana del extracto etanólico del tubérculo “isaño” y el fármaco Cefalexina frente a los 7 aislamientos de *Escherichia coli* identificados, los promedios de halos de inhibición encontrados frente al control positivo Cefalexina (30 $\mu$ g), se categorizan como sensibles. Según el Manual de Procedimiento para la Prueba de Susceptibilidad del INS. Por otra parte, los tratamientos con 10; 20; 30; 40 y 50  $\mu$ l del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum*, presentaron promedios de halos de inhibición por debajo de 14 mm, categorizados en estos casos como resistentes, según los diámetros críticos de los halos de inhibición de la cefalexina (Tabla 7).

**Tabla 7.** Susceptibilidad antimicrobiana de *Escherichia coli* a diferentes dosis de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum*, según diámetro del halo de inhibición.

<i>Escherichia coli</i>	Susceptibilidad a partir de promedios de halos de inhibición de diferentes dosis de extracto etanólico y controles frente a bacterias de <i>Escherichia coli</i>						
	Control negativo etanol al 70%	10µl	20µl	30µl	40µl	50µl	Control positivo Cefalexina 30µg
<b>a<sub>1</sub></b>	R	R	R	R	R	R	S
<b>a<sub>2</sub></b>	R	R	R	R	R	R	S
<b>a<sub>3</sub></b>	R	R	R	R	R	R	S
<b>a<sub>4</sub></b>	R	R	R	R	R	R	S
<b>a<sub>5</sub></b>	R	R	R	R	R	R	S
<b>a<sub>6</sub></b>	R	R	R	R	R	R	S
<b>a<sub>7</sub></b>	R	R	R	R	R	R	S

Diámetros críticos de halos de inhibición del antibiótico Cefalexina 30µg frente a Enterobacterias: ≤ 14 resistente, 15 – 17 intermedio, ≥ 18, sensible Según INS, 2002.

Los uropatógenos de *Escherichia coli* identificados de urocultivos en gestantes con infección urinaria del Centro de Salud Simón Bolívar de Puno, son resistentes frente a la máxima dosis aplicada de 50 µl de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum*. Resultado similar fue reportado por Aguas (2019) quien no encontró actividad antimicrobiana de los extractos acuoso en solución salina obtenidos de los tubérculos de “isaño” amarillo y rojo sobre *Escherichia coli* que no fue inhibida, estos resultados de susceptibilidad antibacteriana coinciden con el estudio de Quispe (2018), que mediante el extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” amarillo, obtuvo diámetros de halos de inhibición resistentes a concentraciones de 30%, 50% y 100% frente a *Escherichia coli*, y de la variedad “isaño negro”, resistentes al 30% y 50%, a excepción de la concentración 100% donde obtuvo respuesta sensible. Esta diferencia se puede atribuir a que dosis mayores a 50% si pueden presentar respuestas de susceptibilidad sensible.





En este estudio las bacterias de *Escherichia coli* identificadas resultaron resistentes ante las dosis de 50 µl del extracto etanólico *Tropaeolum tuberosum* que es insuficiente para demostrar la actividad del extracto etanólico de “isaño” mediante la prueba de susceptibilidad a antimicrobianos de Kirby Baüer, sin embargo, esto no significa que el extracto no tenga efecto antibacteriano puesto que la prueba de CMI (12.5%) si ha mostrado actividad sobre *Escherichia coli*, el cual también es corroborada por Candia, (2016); que menciona que las cepas ATCC de *Escherichia coli* mostraron susceptibilidad frente al extracto acuoso del “isaño” *Tropaeolum tuberosum* a concentraciones de 50 y 75 mg/ml (50 y 75 µg/µl), con halos de inhibición promedio de 22 y 23 mm, además Rodríguez *et al.*, (2017), nos indican que los metabolitos, en su mayoría secundarios, tales como alcaloides, flavonoides, terpenos, saponinas, fenoles y quinonas, presentan actividad antimicrobiana; así mismo respecto al extracto etanólico de las hojas de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” a concentraciones de 30%, 40% y 50% produjeron halos de inhibición promedio de 20.11; 23.57 y 26.55 mm en cepas de *Escherichia coli* de ITU, demostrando que el extracto etanólico tiene efecto inhibitorio *in vitro* sobre la bacteria (Tenorio y Estrada, 2016), sin embargo, el efecto fue mayor que el obtenido en nuestra investigación; es posible que la diferencia se deba a que utilizaron hojas de la planta y extractos acuosos. Como es sabido, los diversos solventes extraen diferentes principios activos y en cantidades diferentes que repercute en el efecto del producto, lo mismo ocurre con las diferentes partes de la planta; a esto debe adicionársele la etapa vital de la planta ya que la síntesis de principios activos se incrementa durante el proceso de floración y de formación de la semilla, decreciendo en la marchites.

**b) Susceptibilidad antibacteriana de *Klebsiella sp* frente a diferentes dosis de los extractos etanólicos de *Tropaeolum tuberosum* “isaño”.**

En las lecturas del ensayo de disco difusión a diferentes dosis del extracto etanólico del tubérculo de isaño frente a *Klebsiella sp*, se obtuvieron los siguientes resultados: El control positivo cefalexina (30µg), con un promedio de halo de inhibición de 15.7 mm, mientras para los discos con extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum*, a dosis en disco de 10; 20 y 30 µl no presentaron halos de inhibición, sin embargo a 40 y 50 µl presentaron halos de inhibición promedios de 2 y 6 mm respectivamente, en tanto para el control negativo (etanol al 70% evaporado) no se observó ningún halo de inhibición. (Tabla 8).

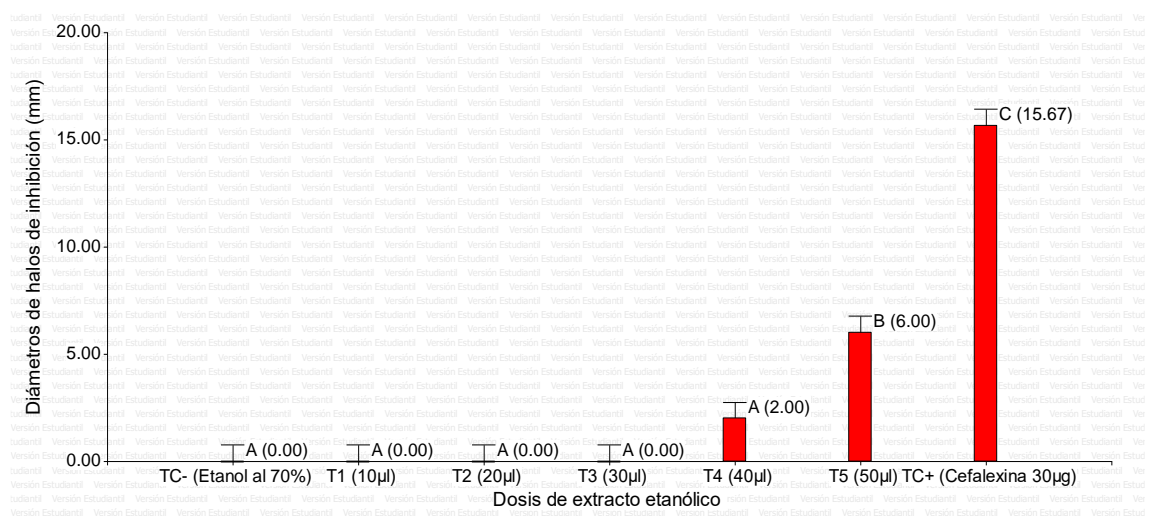
**Tabla 8.** Halos de inhibición (mm) de *Klebsiella sp* a diferentes dosis de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum*, comparado con el control positivo (Cefalexina).

Repeticiones y promedio de halos de inhibición	Halos de inhibición (mm) de los tratamientos y controles frente a <i>Klebsiella sp</i> en las repeticiones						
	Control negativo etanol al 70%	10µl	20µl	30µl	40µl	50µl	Control positivo cefalexina (30µg)
R1	0	0	0	0	0	6	15
R2	0	0	0	0	6	6	16
R3	0	0	0	0	0	6	16
Promedio de halo (mm)	0	0	0	0	2	6	15.7

Diámetros críticos de halos de inhibición del antibiótico Cefalexina (30µg) frente a Enterobacterias: ≤ 14 resistente, 15 – 17 intermedio, ≥ 18, sensible Según INS, 2002.

El análisis de varianza de los halos de inhibición en los tratamientos determinó la existencia de diferencia estadística significativa ( $F_c = 58.30$ ;  $gl = 6$ ;  $p < 0.0001$ ), demostrando que al menos una de las dosis de extracto de *Tropaeolum tuberosum* y controles presentó actividad antibacteriana diferente sobre *Klebsiella sp*. La prueba de

rango múltiple de Tukey señala que el mayor efecto de actividad antibacteriana se presentó en el tratamiento control positivo Cefalexina (30µg), (Figura 4).



**Figura 4.** Diferencia estadística significativa del efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* a diferentes dosis frente a *Klebsiella sp.*

Las respuestas de susceptibilidad antimicrobiana del extracto etanólico del tubérculo “isaño” y el fármaco Cefalexina frente a *Klebsiella sp.*, según el manual de procedimiento para la prueba de sensibilidad del INS se categorizó con comportamiento intermedio frente al control positivo Cefalexina (30µg), con un halo de inhibición de 15.7 mm, sin embargo en los tratamientos con las diferentes dosis del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum*, resultaron resistentes, obteniéndose halos de inhibición menores a 14 mm, (Tabla 9).

**Tabla 9.** Susceptibilidad antimicrobiana de *Klebsiella sp* a diferentes dosis de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum*, según diámetro del halo de inhibición.

Repeticiones	Susceptibilidad a partir de halos de inhibición de los tratamientos y controles frente a <i>Klebsiella sp</i>						Control positivo Cefalexina (30µg)
	Control negativo etanol al 70%	10µl	20µl	30µl	40µl	50µl	
R1	R	R	R	R	R	R	I
R2	R	R	R	R	R	R	I
R3	R	R	R	R	R	R	I

Diámetros críticos de halos de inhibición del antibiótico Cefalexina (30µg) frente a Enterobacterias: ≤ 14 resistente, 15 – 17 intermedio, ≥ 18, sensible Según INS, 2002. R=resistente, I= intermedio, S=sensible.

La bacteria uropatógena *Klebsiella sp*, aislada a partir de urocultivos positivos en gestantes que acuden al Centro de Salud Simón Bolívar de Puno, es resistente hasta dosis de 50 µl del extracto de *Tropaeolum tuberosum*, el cual se sustenta en otras investigaciones, como el de Diaz y Garzon (2017) quienes no encontraron actividad antimicrobiana de los extractos etanólico y acuoso de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” a concentración de 10 y 20 %, de tallos, hojas y mezcla de ambos sobre *Escherichia coli*, así mismo, Mejía *et al.*, (2018) en su estudio con extracto etanólico de tubérculo de isaño al 50%, también no encontraron efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli*, pero reportaron efecto bacteriostático sobre *Candida utilis*. Sin embargo, la actividad antibacteriana de *Tropaeolum majus L.* a 70% a partir de extracto de hojas y flores sobre *Klebsiella pneumoniae* ha sido reportada por Zanetti *et al.*, (2003). Esto contribuye al sustento de que *Tropaeolum tuberosum* posee efecto antibacteriano sobre el aislamiento de *Klebsiella sp*, de nuestro estudio por la cercanía taxonómica de estas especies vegetales.



Según el estudio realizado de Huanquis y León (2015), la actividad del extracto etanólico sobre *Escherichia coli* se debería a la presencia de glucosinolatos volátiles tales como los isotiocianatos que están presentes en varias especies de la familia tropaeolaceae como el *Tropaeolum majus* L. “mastuerzo” y *Tropaeolum tuberosum* “isaño”, que han mostrado un amplio rango de efectos antibacterianos y antifúngicos, que al ser amenazadas por los insectos dentro de la planta producen glucosinolatos. Asimismo, Espinoza *et al.*, (2017), mencionan que *Tropaeolum majus* L. “mastuerzo” entre sus componentes poseen la glucotropaeolina, que al ser hidrolizado forma el bencil isotiocianato (BIT) que fomenta la apoptosis celular, y por ello fue usada desde tiempos muy antiguos por nuestros antepasados para combatir distintas enfermedades. La presencia de p-methoxybenzylglucosinolato como principal metabolito secundario de *T. tuberosum sub sp. tuberosum* con actividad antibacteriana, además de glucosinolatos e isotiocianatos, serían las responsables del efecto antibacteriano sobre *Escherichia coli*, tal como es reportado por (Moreno, 2017).

Las respuestas de susceptibilidad nos indican que *Klebsiella sp* es resistente frente al extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño”, y que los mecanismos de resistencia podrían ser similares a los de *Escherichia coli* por ser ambas enterobacterias, aun cuando presentan diferencias en cuanto a las respuestas de CMI encontradas en nuestro estudio.

**c) Susceptibilidad antibacteriana de *Staphylococcus aureus* frente a diferentes dosis de los extractos etanólicos de *Tropaeolum tuberosum* “isaño”.**

Las respuestas de halos de inhibición del ensayo de disco difusión a diferentes dosis de extracto etanólico del tubérculo de “isaño” frente a 2 aislamientos ( $a_1$  y  $a_2$ ) de *Staphylococcus aureus* identificados, resultaron promedios de halos de inhibición de 31.7 y 32.7 mm frente al control positivo Oxacilina (1 $\mu$ g), mientras que para los discos con

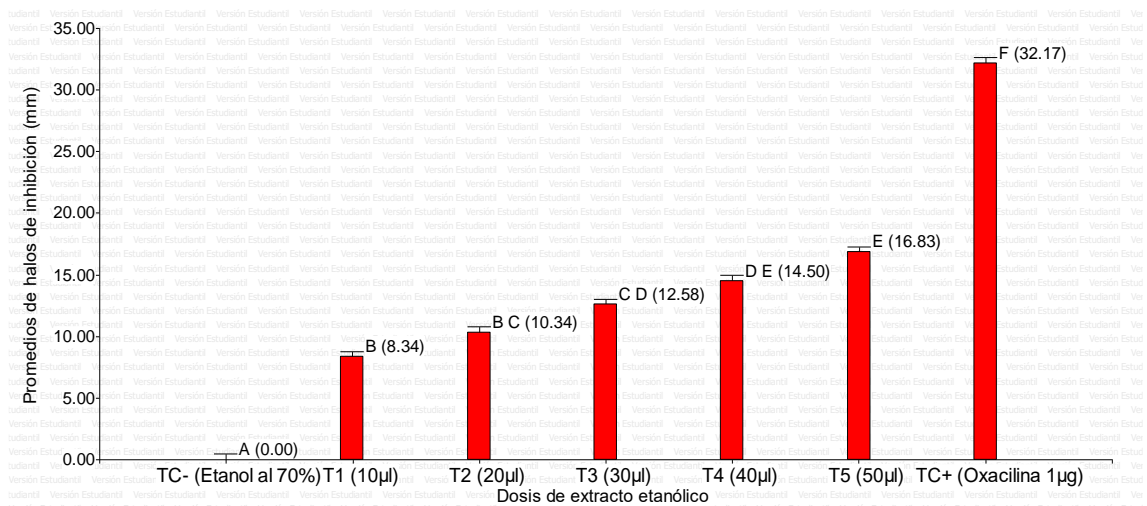
extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum*, a dosis de 10; 20; 30; 40 y 50  $\mu$ l, presentaron promedios de halos de inhibición de 8.1; 10.0; 12.3; 13.7 y 16.3 mm ante el aislamiento  $a_1$ , y 8.7; 10.7; 12.8; 15.3; 17.3 mm frente al aislamiento  $a_2$  respectivamente, en tanto para el control negativo (etanol al 70% evaporado) no se observaron halos de inhibición (Tabla 10).

**Tabla 10.** Promedios de halos de inhibición (mm) de *Staphylococcus aureus* a diferentes dosis de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum*, comparado con el control positivo (Cefalexina).

<i>Staphylococcus aureus</i>	Promedios de halos de inhibición (mm) de los tratamientos y controles a diferentes dosis						
	Control negativo etanol al 70%	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	40 $\mu$ l	50 $\mu$ l	Control positivo Oxacilina (1 $\mu$ g)
$a_1$	0.0	8.0	10.0	12.3	13.7	16.3	31.7
$a_2$	0.0	8.7	10.7	12.8	15.3	17.3	32.7

Diámetros críticos de halos de inhibición del antibiótico Oxacilina 1 $\mu$ g frente a *Staphylococcus aureus*:  $\leq 10$  resistente, 11 – 12 intermedio,  $\geq 13$  sensible, Según INS, 2002.

El análisis de varianza de los halos de inhibición determinó la existencia de diferencia estadística significativa ( $F_c = 458.84$ ;  $gl=6$ ;  $p < 0.0001$ ), demostrando que al menos una de las dosis de extracto de *Tropaeolum tuberosum* y los controles fue diferente y posee efecto antibacteriano sobre los aislamientos de *Staphylococcus aureus*. Teniendo en cuenta la significancia de la prueba de análisis de varianza, la prueba de rango múltiple de Tukey señala que el mayor efecto antibacteriano presentó el tratamiento control positivo Oxacilina (1 $\mu$ g), (Figura 5).



**Figura 5.** Diferencia estadística significativa del efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* a diferentes dosis frente a *Staphylococcus aureus*, comparado con el antibiótico Oxacilina.

Para establecer la susceptibilidad antimicrobiana del extracto etanólico del tubérculo “isaño” y el fármaco Oxacilina frente a los 2 aislamientos de *Staphylococcus aureus* identificados, se procedió de la misma manera que con las otras bacterias, donde el control positivo Oxacilina (1µg) presentó un diámetro de inhibición de 31.67 y 32.67 mm, lo cual se categoriza como sensible, según el Manual de Procedimiento para la Prueba de Susceptibilidad del INS, en tanto los tratamientos con las diferentes dosis del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum*, también resultaron sensibles, con halos de inhibición mayores a 13 mm, sin embargo, se mostraron resistentes a las dosis de 10 y 20 µl, las cuales formaron halos por debajo de 10 mm. (Tabla 11).

**Tabla 11.** Susceptibilidad antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* a diferentes dosis de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum*, según diámetro del halo de inhibición.

<b>Susceptibilidad a partir de promedios de halos de inhibición (mm) de extracto etanólico y controles a diferentes dosis</b>							
<i>Staphylococcus aureus</i>	Control negativo etanol al 70%	10µl	20µl	30µl	40µl	50µl	Control positivo Oxacilina (1µg)
a <sub>1</sub>	R	R	R	S	S	S	S
a <sub>2</sub>	R	R	R	S	S	S	S

Diámetros críticos de halos de inhibición del antibiótico Oxacilina (1µg) frente a *Staphylococcus aureus*: ≤ 10 resistente, 11 – 12 intermedio, ≥ 13 sensible, Según INS, 2002. R=resistente; S=sensible.

Los resultados obtenidos en esta investigación evidenciaron actividad antibacteriana del extracto etanólico del tubérculo “isaño” a dosis de 30; 40 y 50 µl, debido a que *Staphylococcus aureus* se mostró sensible. Estos resultados concuerdan con los de Chica y Guayaquil, (2019), quienes a partir de extractos etanólicos de tubérculos de *Tropaeolum tuberosum* de tres variedades: rosada, amarilla y negra frente a cepas de, *Staphylococcus aureus*, reportaron sensibilidad con 20 y 40 µl de extracto etanólico de la variedad negra, obteniendo a su vez respuesta intermedia con 10 µl. Así mismo, Silva (2018), demostró que el extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* posee efecto antibacteriano *in vitro* contra *S. aureus*, así como; Zanetti *et al.*, (2003) refiere que el extracto de hojas y tallos del *Tropaeolum majus L.* al 70% tienen actividad antibacteriana para *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, Huanquis y Leon (2015), reportaron actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de “mastuerzo” *Tropaeolum majus L.* frente a *Staphylococcus aureus* mediante el ensayo disco difusión, mostraron halos de inhibición para los discos con extractos de 5µl hasta





la concentración de 60% a partir de las hojas 8.70 mm, y de las flores 9.40 mm. Estos halos de inhibición menores a nuestro estudio podrían deberse a la menor dosis aplicada.

Aspauza (2015), demostró efecto antibacteriano del extracto etanólico de las flores y hojas de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente ATCC 25923 (SARM), evidenciado a través de halos de inhibición, de la misma forma Chirinos y Chota (2018), reportaron a partir de extracto hidro alcohólico de hojas y flores *Tropaeolum majus* “mastuerzo” efecto antibacteriano *in vitro* sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175, evidenciando un halo de inhibición de 16 mm al 40% del extracto, de modo similar Aruquipa *et al.* (2017), señaló que en la comunidad Huatacana, municipio de Mocomoco, del departamento de la Paz, según los conocimientos locales de los agricultores en esta zona entre los usos medicinales tradicionales del “isaño” reportan su utilidad para reducir las inflamaciones del riñón y de la próstata, al igual que Ramón (2017), refiere el uso que las propiedades terapéuticas del “isaño” en la medicina popular andina, para tratar los malestares urinarios y de próstata en forma de infusión debido a la presencia de un alto contenido de isotiocianatos en los tubérculos de “isaño”, los cuales son conocidos por sus propiedades antibióticas, insecticidas, nematicidas, diuréticas y anticancerígenas.

La mayor susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* uropatógena a partir de urocultivo de gestantes, sería posiblemente por la mayor facilidad de penetración del extracto etanólico de “isaño” en la pared celular de las bacterias grampositivas a diferencia de las bacterias gramnegativas, así como también la capacidad antimicrobiana que posee el tubérculo debido a la presencia de compuestos activos y metabolitos.



De los resultados obtenidos sobre las pruebas de susceptibilidad antibacteriana se ha encontrado, respuesta sensible de *Staphylococcus aureus* frente al extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” tomando como referencia la oxacilina. La respuesta fue resistente en *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, frente a la dosis de 50  $\mu$ l en comparación a la cefalexina, sin embargo, considerando la CMI de 12.5% y 25% encontrada en este estudio para estas dos especies, es probable que sean sensibles ante dosis mayores a 50 $\mu$ l.



## V. CONCLUSIONES

Las bacterias uropatógenas identificadas a partir de muestras de orina de pacientes gestantes con infección urinaria del Centro de Salud Simón Bolívar de Puno, fueron 07 aislamientos de *Escherichia coli*, 02 de *Staphylococcus aureus* y 01 de *Klebsiella sp* ( $\chi^2 c=19.56$ ;  $GL=4$ ;  $p=0.0006$ ).

El extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” posee efecto antibacteriano sobre uropatógenos de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus* identificadas de pacientes gestantes del Centro de Salud Simón Bolívar de Puno, con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 12.50%, 25.00% y 6.25% frente a *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus* respectivamente.

Las respuestas de susceptibilidad antibacteriana de *Staphylococcus aureus* fue sensible frente a la dosis de 30  $\mu$ l; y en *Escherichia coli* y *Klebsiella sp* resistentes a la máxima dosis aplicada de 50  $\mu$ l de extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* “isaño”, comparando con los diámetros críticos de los fármacos Oxacilina y Cefalexina respectivamente.



## VI. RECOMENDACIONES

Realizar estudios acerca de la composición fitoquímica cualitativa y cuantitativa de los extractos etanólicos del tubérculo de “isaño”, y determinar los complejos activos con actividad frente a *Staphylococcus aureus* con potencial efecto antimicrobiano.

Realizar comparaciones del efecto antibacteriano de tubérculos de “isaño” de diferentes variedades y procedencia altitudinal que se presentan en el Altiplano Peruano, por lo que los factores genéticos, ambientales y edafológicos podrían variar la producción de metabolitos activos.

Realizar ensayos *in vitro* a mayores dosis de 50 µl de extracto etanólico *Tropaeolum tuberosum* para conocer la susceptibilidad antimicrobiana en las bacterias de *Escherichia coli* y *Klebsiella sp.*

Realizar investigaciones de uso combinado de antibióticos convencionales con extractos etanólicos de isaño, frente a, *E. coli*, *Klebsiella sp* y *S. aureus in vitro* para potenciar el efecto antimicrobiano.

Realizar investigaciones similares considerando mayor tiempo de muestreo y evaluar el efecto sobre un mayor número de aislamientos uropatógenos de *Klebsiella sp* y *S. aureus* en gestantes con infección urinaria.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acosta, L. (2014). Determinar la resistencia antimicrobiana de las enterobacterias y el uso de antibióticos en pacientes de UCI de la Clínica D.A.M.E. 2014. Previa la obtención del título de Químico farmacéutico. Escuela superior politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador. 100 p.
- Aguas, A. (2019). Acción hemoaglutinante, anticoagulante y antimicrobiana obtenidas de los tubérculos andinos. Proyecto de Investigación previo a la obtención del título de Médico General. Universidad Nacional de Chimborazo. Riobamba-Ecuador. 50p.
- Aguirre, R. (2017). «Efecto “In vitro” del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” sobre *Escherichia coli* uropatógena». Informe de Tesis para optar el grado de bachiller en medicina. Universidad Nacional de Trujillo. 62 p.
- Alzamora, E. (2015). “Infección del tracto urinario en gestantes hospital san José de chincha- MINSA”. Enero a diciembre del año 2015. Trabajo de Investigación para optar título de Segunda Especialidad. Universidad Privada de Ica. 37 p.
- Aquino, E. (2017). Actividad antimicrobiana de aceites esenciales de *Chenopodium ambrosioides*, *Artemisia absinthium*, *Caiophora cirsiifolia* sobre bacterias Gram negativas *Staphylococcus aureus* y su toxicidad en *Artemia salina*. Tesis para optar el título profesional de Licenci. Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú. 96 p.
- Arratea, B., & Mamani, Y. (2017). “Actividad antibacteriana del extracto acuoso *solanum tuberosum* (papa fermentada) y aceite esencial *Thymus vulgaris* (tomillo), frente a cepa *Staphylococcus aureus*, estudio in vitro”. Tesis para optar al Título Profesional



- de Químico Farmacéutico y Bioquím. Universidad Inca Garcilaso de la Vega.135 p.
- Aruquipa, R., Trigo, R., Bosque, H., Mercado, G., & Condori, J. (2017). El Isaño ( *Tropaeolum tuberosum* ) un cultivo de consumo y medicina tradicional en Huatacana para el beneficio de la población boliviana . Revista Boliviana IIAREN, 3(2), 146-151.
- Aspauza, T. (2015). Efecto “in vitro” del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” sobre *Staphylococcus aureus* meticilino resistente atcc 25923. Tesis para optar el grado de Bachiller en Medicina. Universidad Nacional de Trujillo. 74 p.
- Baca, C. (2017). Efecto inhibitorio del aceite esencial “muña” *Minthostachys mollis* sobre el género *Proteus*, causantes de infecciones del tracto urinario. Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología. Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 76 p.
- Bailón, H., & Sacsquispe, R. (2013). Caracterización molecular de cepas de *Klebsiella pneumoniae* productoras de BLEE causantes de infección intrahospitalaria en el servicio de neonatología de un hospital de Lima , Perú. Rev Med Hered., 24(1), 101-108.
- Bustincio, J. (2014). Evaluar el rendimiento de almidón, la capacidad de antioxidante en el proceso de tuberización en 10 accesiones de isaño (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz y Pavon). Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Nacional Del Altiplano. Puno – Perú. 96 p.
- Calderon, G., & Aguilar. (2016). Resistencia antimicrobiana microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. Rev. Medica de Costa Rica, 621(1),



757-763.

- Calsin, Y. (2017). Actividad antimicrobiana “In vitro” del aceite esencial y extracto etanólico de *Equisetum arvense* “cola de caballo” frente a *Escherichia coli* y *Candida albicans* uropatógenas. Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología. Universidad Nacional del Altiplano. Puno – Perú. 65 p.
- Campo, M., Ortega, N., Parody, A., & Gómez, L. del C. (2017). Caracterización y perfil de susceptibilidad de uropatógenos asociados a la presencia de bacteriuria asintomática en gestantes del departamento del 2014-2015. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 68(1), 62-70.
- Campos, T., Canchucaja, L., & Gutarra, R. (2013). Factores de riesgo conductuales para bacteriuria asintomática en gestantes. *Rev peru ginecol obstet.*, 59(1), 267-274.
- Candia, C. (2016). Evaluación del efecto antibacteriano In vitro del extracto acuoso del Isaño “*T. tuberosum*” en cepas de *E. coli* y *P. aeruginosa* ATCC y clínicas causantes de ITU en la Universidad Alas Peruanas – Arequipa, 2016. Tesis para optar el título profesional de Quí. Universidad Alas Peruanas. Arequipa – Perú. 89p.
- Castellano, M., & Perozo, A. (2010). Mecanismos de resistencia a antibióticos  $\beta$ -lactámicos en *Staphylococcus aureus*. *Rev. Kasmera*, 38(1), 18-35.
- Castro, A. (2014). *Bacteriología Médica basada en problemas. Manual Moderno* (2a Edición). 334 p.
- Chica, A., & Guayaquil, S. (2019). “Estudio de la actividad antimicrobiana del extracto alcohólico del tubérculo mashua (*Tropaeolum tuberosum*) en sus diferentes especies”. Trabajo de titulación presentado como requisito previo para optar por el



- grado de Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Guayaquil - Ecuador. 82 p.
- Chirinos, J., & Chota, L. (2018). Efecto antibacteriano in vitro del extracto de *Tropaeolum majus* en cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Tesis para optar título en Farmacia y Bioquímica. Universidad Nacional de Trujillo. 45 p.
- Chura, H. (2017). Efecto antibacteriano y antifúngico de decocciones de tarwi (*Lupinus mutabilis* sweet) en *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología. Universidad Nacional Del Altiplano. Puno – Perú. 61 p.
- CIP, C. de germoplasma de mashua conservada en el C. I. de la P. (2013). *Tropaeolum tuberosum* Ruíz & Pav. Colección de germoplasma de mashua conservada en el Centro Internacional de la Papa (CIP). Centro Internacional de la Papa. (Primera ed). Lima, Perú. 123 p.
- Condori, P. (2018). Evaluacion del control antibacteriano de *Erwinia* spp en papa con dos aceites esenciales: muña (*Mintostachys mollis*) y paico (*Chenopodium ambrosioides*) Puno 2017. Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología. Universidad Nacional Del Altiplano. Puno – Perú. 58 p.
- Córdova, K., & Inga, J. (2019). Actividad diurética del extracto hidroalcohólico del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* R&P. (Mashua negra) en ratas albinas. Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico. Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Lima – Perú. 65p.
- Coronado, G., & Cauna, P. (2018). Actividad antibacteriana in vitro de extractos hidroalcohólicos de *P. major* (llanten) y *R. crispus* (lengua de vaca) sobre cepas ATCC de *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* y *P. aeruginosa* – Puno 2017. Tesis para





- optar el título profesional de Licenciado en Bi. Universidad Nacional del Altiplano.  
71 p.
- Cuba, J. (2013). “Perfil microbiológico y resistencia bacteriana de infecciones urinarias en pacientes que acuden por consultorio externo del hospital III ESSALUD Juliaca mayo – julio 2012”. Tesis para optar el título profesional de Médico Cirujano. Universidad Nacional del Altiplano Puno. 83 p.
- Cuya, R. (2009). “Efecto de secado en bandeja y atomización sobre la actividad antioxidante de la mashua (*Tropaeolum tuberosum* R & P)”.
- Diaz, L., & Garzon, D. (2017). Capacidad antimicrobiana del extracto de la parte aérea de *Tropaeolum tuberosum* (mashua) frente a *Staphylococcus aureus* y *Bacillus cereus*. Trabajo de titulación para optar el grado de Ingeniero en Alimentos. Universidad de La Salle. Bogotá D.C. 80 p.
- Doylet, R., & Rodríguez, L. (2018). “Estudio comparativo de la composición química y carácter reductor de dos variedades de *Tropaeolum tuberosum* (Ruíz y Pavón, kuntze) mashua”. Trabajo de Titulación para optar por el grado de Químico y Farmacéutico. Universidad de Guayaquil. Guayaquil – Ecuador.78p.
- Durazno, S., & Herrera, W. (2018). Estudio farmacognóstico y fitoquímico preliminar del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum spp tuberosum* (ruíz & pavón, kuntze), mashua variedad amarilla. Trabajo de titulación presentado como requisito previo para optar por el grado de Químico(a) y Farmacéut. Universidad de Guayaquil. Guayaquil – Ecuador. 113 p.
- Echeverri, L., & Cataño, juan. (2010). *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario : epidemiología y resistencia. Revista Medica, 23(3), 240-249.



- Espinoza, C., Gamarra, F., Ramos, M., Quispe, M., & Flores, O. (2017). Efecto de presión y temperatura en la extracción de isotiocianato de bencilo por fluidos supercríticos a partir de hojas de *Tropaeolum majus* L. *Rev. Investig. Altoandin.*, 19(4), 389-396.
- Expósito, L., Bermellon, S., Lescaille, L., Delgado, N., & Aliaga, I. (2019). Resistencia antimicrobiana de la *Escherichia coli* en pacientes con infección del tracto urinario. *Revista Informacion Cientifica*, 98(6), 755-764.
- Flores, D. (2011). Recopilación de saberes ancestrales sobre las especies andinas alimenticias: mashua (*T.tuberosum*), Melloco (*U. tuberosus*), Oca (*O. tuberosa*) y quinua (*C. quinoa*) En La comunidad de pesillo, Cayambe – Ecuador – 2010. Producto previo a la obtención del Título. Universidad Politécnica Salesiana SEDE Quito. 108 p.
- Flores, N. (2015). Evolución de la aceptabilidad organoléptica y capacidad antioxidante de una bebida alcohólica no fermentada, formulado con extracto fenólico de mashua (*Tropaeolum tuberosum*) púrpura. Universidad Nacional del Centro del Perú.
- Gamarra, F., & Ramos, M. (2017). Extracción por diclorometano y co2 supercrítico de isotiocianato de bencilo a partir de hojas de mastuerzo (*Tropaeolum majus* l.). Para optar el título profesional de ingeniera en industrias alimentarias. Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo – Perú. 90p.
- Gavino, H. (2017). Infección del tracto urinario en gestantes asociada a parto pretermino y bajo peso al nacer en el Hospital Manuel Núñez Butrón de puno julio 2016 a junio del 2017. Tesis para optar el título profesional de Médico Cirujano. Universidad Nacional del Altiplano-Puno. 73 p.



- Huaman, Y., & Oroche, Y. (2016). “Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos y clorofórmicos de *O. rosea* “yawar chonq’a” y *G. sessiliflorum* “ojotillo” frente a *S. aureus* cepa atcc y *E. coli* cepa ATCC y determinación de la toxicidad aguda por via ora. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.227 p.
- Huanquis, L., & Leon, M. (2015). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos metanólicos de las hojas y flores de la especie vegetal mastuerzo (*T. majus* l.) frente al crecimiento de microorganismos (*E. coli* y *S. aureus*). Tesis para optar el título profesional de ingeniero . Universidad Nacional del Centro del Perú. 115 p.
- INS, (Instituto Nacional de Salud). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión, Pub. L. No. Serie de Normas Técnicas, 67 pag. (2002). Lima - Perú.
- Laura, Y., & Torres, W. (2018). “Efecto hipoglucemiante de dos variedades de mashua (*Tropaeolum tuberosum* Ruiz y Pavón): negra y amarilla en ratas wistar diabéticas inducidas por aloxano, puno 2016”. Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Nutrición Humana. Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú. 156 p.
- Mamani, L. (2017). Actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos de *Senecio spp* (chachacoma) en el crecimiento de *Escherichia coli*, *klebsiella sp*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus sp*. Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología. Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú. 48 p.
- Matsuoka, A., Vargas, M., Ymaña, B., Soza, G., & Pons, M. (2020). Resistencia a la colistina en cepas de *Klebsiella pneumoniae* multidrogorresistente del período



- 2015-2018 en un instituto materno perinatal de lima, Perú. Rev. Perú Med Exp Salud Publica, 37(4), 716-720.
- Mejía, F., Salcedo, J., Vargas, S., Serna, J., & Torres, L. (2018). Capacidad antioxidante y antimicrobiana de tubérculos andinos (*Tropaeolum tuberosum* y *Ullucus tuberosus*). Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient, 21(2), 449-456.
- Mendieta, E. (2017). Efecto Inhibitorio sobre la libido en ratas albinas macho del extracto hidroalcohólico del tubérculo de *Tropaeolum tuberosum* “mashua”. Ayacucho, 2017. Tesis para obtener el Título Profesional de Químico Farmacéutico.
- Merino, I. (2018). Resistencia, virulencia y estructura poblacional de *Escherichia coli* uropatógeno. Memoria para optar al grado de Doctor. Universidad complutense de Madrid. 192 p.
- Meriño, M., Morales, I., Badilla, J., & Vallejos, C. (2021). Resistencia antimicrobiana en infección del tracto urinario con bacteriuria en el servicio de urgencia de un hospital comunitario de la región de Ñuble, Chile. Rev. virtual Soc. Parag. Med. Int., 8(1), 117-125.
- Morán, M. (2018). Portadores Nasales de *Staphylococcus Aureus* Resistente a la Meticilina En Internos del MINSA - Lima 2015. Para optar el Título de Licenciado en Tecnología Médica. Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima - Perú. 52 p.
- Moreno, D. (2017). Evaluación del efecto de la presión y temperaturas en la extracción con CO<sub>2</sub> – supercrítico, de glucosinolatos de mashua chispeada (*Tropaeolum tuberosum*). Para optar el título profesional de ingeniera en industrias alimentarias. Universidad Nacional del Centro del Perú. Huancayo – Perú. 118p.



- Orjuela, L. (2016). Caracterización de la infección por *Staphylococcus aureus* en población pediátrica en infantes. Trabajo de grado para optar al título de Especialista en Pediatría. Colegio Mayor Universidad Del Rosario. Bogotá D.C.- Colombia. 74 p.
- Ortega, A. (2018). “Determinación del efecto antimicrobiano de los aceites esenciales de tomillo (*T. vulgaris*) y orégano (*O. vulgare*) frente a la bacteria *S. aureus* ATCC: 12600”. Trabajo de titulación previo a la obtención del Título de Ingeniera en Biotecnología de los Rec. Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca – Ecuador. 96 p.
- Pacco, W. (2015). “Evaluación del efecto del soleado y la cocción en la capacidad antioxidante del puré deshidratado de mashua (*Tropaeolum tuberosum* R. et P.)”. Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agroindustrial. Universidad Nacional Del Altiplano. Puno – Perú. 85 p.
- Pacheco, E. (2015). “Caracterización morfológica y molecular de mashua (*T. tuberosum* Ruiz & Pavón) de los departamentos de Cusco y Cajamarca”. Tesis para optar el grado de Magister Scientiae en Mejoramiento Genético de Plantas. Universidad Nacional Agraria La Molina. 151 p.
- Patiño, D. (2003). Por qué las bacterias se hacen resistentes a la acción de los antibióticos. *Rev. Umbral Científico*, 3(1), 48-56.
- Poma, L., & Paz, C. (2017). Efecto antimicrobiano del extracto de cubio (*Tropaeolum tuberosum*) frente a *Listeria monocytogenes* en carne de hamburguesa. Tesis para optar el título profesional de Ingeniero en alimentos. Universidad de la Salle. Bogotá. 51 p.



- Ponce, S., Arredondo, R., & López, Y. (2015). La resistencia a los antibióticos : Un grave problema global. *Rev. Gac Med Mex.*, 151(1), 681-689.
- Quiñones, D., Carmona, Y., Zayas, A., Abreu, M., Salazar, D., García, S., ... Moreno, R. del C. (2014). Resistencia antimicrobiana en aislamientos clínicos de *Klebsiella spp.* y producción de B-lactamasas de espectro extendido en hospitales de Cuba. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 66(3), 386-399.
- Quirós, A., & Apolaya, M. (2018). Prevalencia de infección de la vía urinaria y perfil microbiológico en mujeres que finalizaron el embarazo en una clínica privada de Lima , Perú. *Ginecol Obstet Mex.*, 86(10), 634-639.
- Quispe, J. (2018). Prevalencia de *Escherichia coli* y *Pseudomonas sp* en pacientes con infecciones prostáticas y su sensibilidad a los extractos de tubérculos de *Tropaeolum tuberosum* (isaño), Juliaca - 2017. Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología. Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú. 62 p.
- Ramón, F. (2017). “Efecto del estrés abiótico post-cosecha en las características físico-químicas y de algunos metabolitos primarios de mashua morada (*Tropaeolum tuberosum* ruíz & pavón)”. Tesis para optar el título de ingeniero en industrias alimentarias. Universidad Nacional Agraria la Molina. Lima - Perú 2017. 165p.
- Rodríguez, C., Zarate, A., & Sánchez, L. (2017). Actividad antimicrobiana de cuatro variedades de plantas frente a patógenos de importancia clínica en Colombia. *NOVA*, 15(27), 119-129.
- Saavedra, J., & Tavera, C. (2017). Microencapsulación y su efecto en la retención de la capacidad antioxidante de la mashua (*Tropaeolum tuberosum*) secada por atomización- Lambayeque 2014. Universidad Señor de Sipan. 99 p.



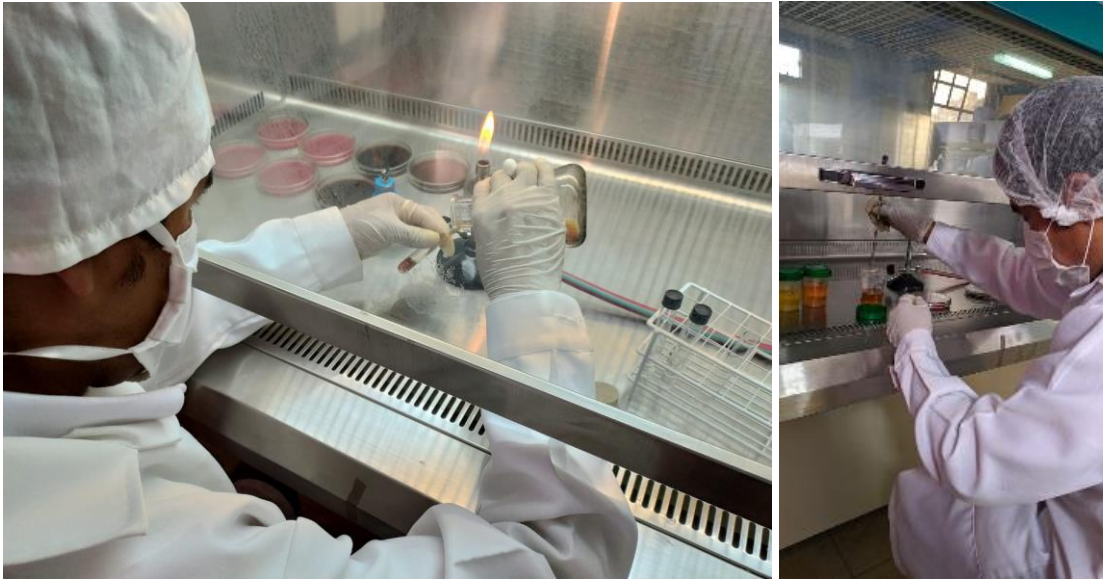
- Salas, A. (2016). Efecto antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Cándida albicans*. Puno – 2015. Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología. Universidad Nacional Del Altiplano. Puno – Perú. 62 p.
- SEIMC, R. de la S. E. de enfermedades I. y M. C. (2000). Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. En J. Picazo (Ed.), *Procedimientos en Microbiología Clínica* (p. 54).
- Silva, J. (2018). “Evaluación de la actividad antibacteriana y hemoaglutinante de los extractos de solanum phureja, *Tropaeolum tuberosum*, *Oxalis tuberosa* y *Ullucus tuberosus*”. Trabajo de titulación presentado para optar Bioquímica Farmacéutica. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba-Ecuador. 89 p.
- Surco, F. (2004). Caracterización de almidones aislados de tubérculos andinos: Mashua (*Tropaeolum tuberosum*), Oca (*Oxalis tuberosa*), Olluco (*Ollucus tueberosus*) para su aplicación tecnológica. Tesis para optar el Grado Académico de Magíster en Ciencias de los Alientos. Universidad Nacional Mayor de san Marcos.Lima - Perú. 55 p.
- Tenorio, A., & Estrada, J. (2016). Efecto inhibitorio in vitro del extracto etanólico de *Tropaeolum majus* “mastuerzo” sobre *Escherichia coli* aislada de pacientes con Infecciones del Tracto Urinario. Tesis para optar el título de Licenciado en Biología Microbiología - Parasitología. Universidad Nacional «Pedro Ruiz Gallo». Lambayeque – Perú. 44 p.
- Ugalde, D., Hernández, M., Ruiz, M., & Villarreal, E. (2012). Trabajos Originales Infecciones del tracto genital y urinario como factores de riesgo para parto pretérmino en adolescentes. *Rev Chil Obstet Ginecol*, 77(5), 338-341.



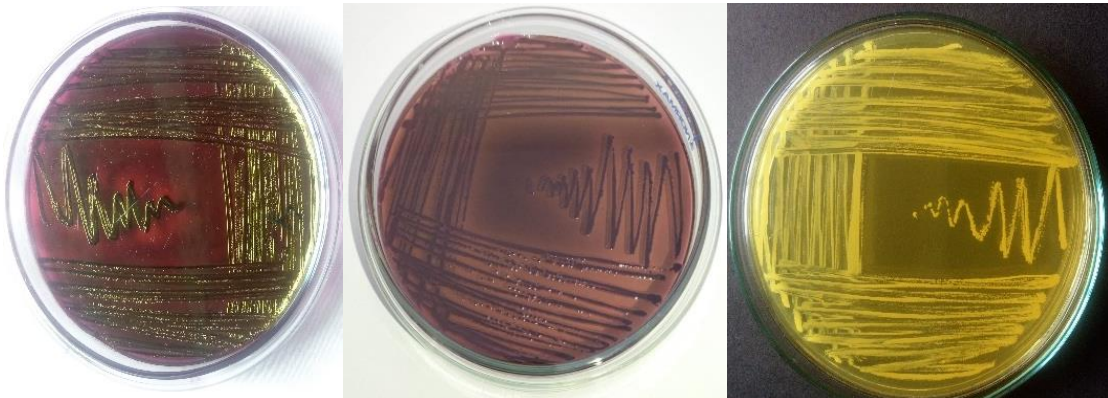
- Valery, F., Salgado, J., Rosal, E., Reyes, M., & Moreno, C. (2016). Evaluación de la resistencia bacteriana en el Hospital Pediátrico “Dr. Elías Toro”. Años 2012 al 2016 Recomendaciones prácticas. *Rev. Bol Venez Infectol*, 27(1), 41-60.
- Valle, M. (2017). “caracterización morfológica y fenología en variedades de *Tropaeolum tuberosum* (mashua) de interés medicinal”. Proyecto de Investigación para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo. Universidad Técnica De Ambato. Cevallos – Ecuador. 57 p.
- Villacis, B., & Viñan, J. (2018). “Estudio farmacognóstico y fitoquímico preliminar del *Tropaeolum tuberosum* (ruiz y pavón, kuntze) mashua, variedad rosada (color entre rosa y lila)”. Trabajo de titulación para optar al grado de químico farmacéutico. Universidad de Guayaquil. Guayaquil – Ecuador. 73 p.
- Zanetti, G., Manfron, M., Hoelzel, S., Pagliarin, V., & Morel, A. (2003). Toxicidad aguda y actividad antibacteriana de los extratos de *Tropaeolum majus* L . *Acta Farm. Bonaerense*, 22(2), 159-162.
- Zapata, E. (2017). “Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica «In vitro» del extracto hidro-alcoholico de *C. hedioidinum* Dun. «hierba santa» en bacterias patógenas Gram negativas, Gram positivas y hongos”. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo. Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa–Perú. 139 p.
- Zuni, J. (2017). Actividad antibacteriana “in vitro” del aceite esencial de menta (*Mentha piperita* L.) frente a *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). Tesis para optar el título profesional de Licenciado en Biología. Universidad Nacional del Altiplano. Puno - Perú.72 p.



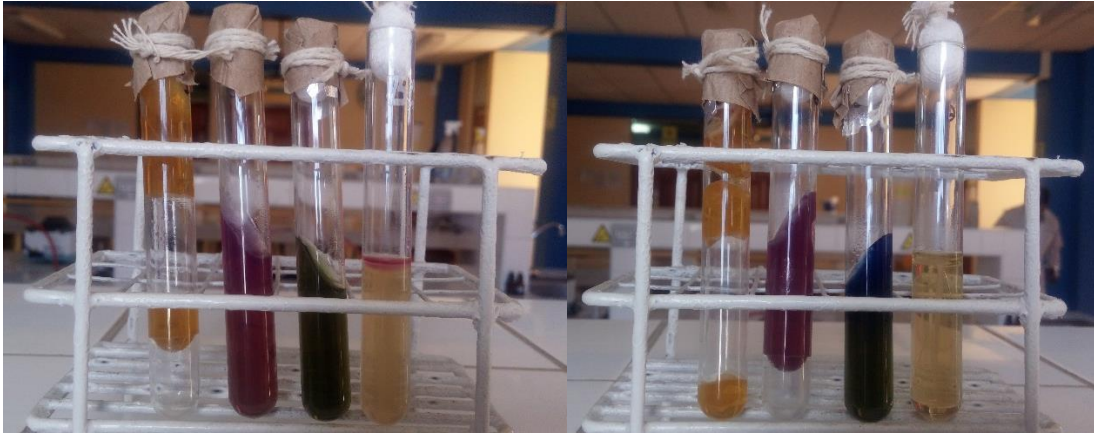
## ANEXOS



**Figura 6.** Proceso de identificación de las bacterias uropatógenas, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA- PUNO.



**Figura 7.** Bacterias uropatógenas de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*, identificadas, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA- PUNO.



**Figura 8.** Identificación de bacteria uropatógenas de *Escherichia coli* y *Klebsiella sp.*, a partir de urocultivos positivos, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA- PUNO.

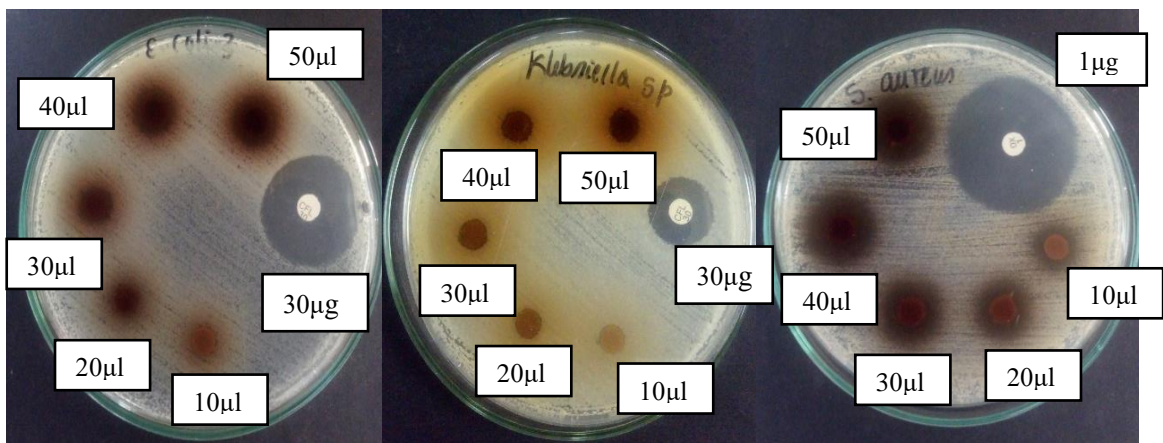


**Figura 9.** Filtrado y preparación de los discos de sensibilidad con el extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum*, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA- PUNO.





**Figura 10.** Extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* a diferentes concentraciones sobre *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*, en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA- PUNO.



**Figura 11.** Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Tropaeolum tuberosum* a dosis de 10, 20, 30, 40, y 50µl, y controles cefalexina (30µg) y oxacilina (1µg), en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA- PUNO.



PERÚ

Ministerio  
de salud

Red de Salud  
Puno

Microred  
Simon Bolívar

# Constancia

Por medio de la presente dejamos constancia que el señor **YON MAMANI CCARITA** con DNI N° 45878551, egresado de la **FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA** con mención en **MICROBIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO** de la **UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO-PUNO**, realizó procedimientos de la ejecución de su proyecto de investigación titulado “Efecto antibacteriano de *Tropaeolum tuberosum* “isaño” sobre *Escherichia coli*, *klebsiella sp* y *staphylococcus aureus*, obteniendo muestras de orina de gestantes para urocultivo, del área de **LABORATORIO CLÍNICO** del **CENTRO DE SALUD SIMÓN BOLÍVAR-MICORED DE SALUD PUNO**, con la finalidad de obtener sus resultados, durante los meses de setiembre a noviembre del 2019.

El presente se expide a petición del interesado.



Nivia M. Carreon Carreon  
BIOLOGO  
C.B.P. 3807

Blga. Nivia Magaly CARREON CARREON  
JEFA DEL LABORATORIO DEL EE. SS 1-3  
SIMON BOLIBAR



YURI CANO ZIRENA  
MEDICO - CIRUJANO  
CMP/ 54801

M.C. JOSELIX YURI CANO ZIRENA  
JEFE DEL EE SS 1-3  
SIMON BOLIBAR

Puno, 19 de Diciembre del 2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO  
Facultad de Ciencias Biológicas  
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA



“Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia”

## CONSTANCIA

**LA QUE SUSCRIBE COORDINADORA DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE LA ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO DE PUNO**

### **HACE CONSTAR:**

Que el Sr. Bachiller **Yon Mamani Ccarita**, egresado de la Facultad de Ciencias Biológicas, mención en Microbiología y Laboratorio Clínico ha realizado su trabajo de investigación motivo de tesis, titulado **EFEECTO ANTIBACTERIANO “In Vitro” DE EXTRACTO ETANÓLICO DE *Tropaeolum tuberosum* “ISAÑO” SOBRE *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus***, ejecutado el trabajo experimental en el laboratorio de Microbiología, durante los meses de setiembre a diciembre del 2019, desempeñándose con responsabilidad, dedicación y puntualidad.

Se expide el presente a solicitud del interesado y para los fines convenientes.

Puno, 19 de enero del 2021.



Firmado digitalmente por:  
DEL CARPIO CONDORI Youri  
Teresa FAU 20146496170 soft  
Motivo: Soy el autor del  
documento  
Fecha: 18/01/2021 10:59:19-0500

Dra. Youri Teresa del Carpio Condori