



UNIVERSIDAD CATÓLICA LOS ÁNGELES
DE CHIMBOTE
FILIAL TRUJILLO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA

**EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL
EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Thevetia
peruviana (Pers) Schum (Maichil) FRENTE A CEPAS DE
*Enterococcus faecalis.****

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO

AUTOR:

Bach. JUAN JESÚS NEIRA HURTADO

ASESOR:

Mgtr. CÉSAR ALFREDO LEAL VERA

TRUJILLO – PERÚ

2018

JURADO EVALUADOR DE TESIS

Dr. Jorge Luis Díaz Ortega

Presidente

Mgtr. Nilda María Arteaga Revilla

Miembro

Mgtr. Luisa Olivia Amaya Lau

Miembro

Mgtr. César Alfredo Leal Vera

Docente Tutor Investigador

AGRADECIMIENTO

*A Dios, por haberme
brindarme la vida, salud, los
conocimientos y las fuerzas
necesarias para poder
realizar este trabajo con
éxito.*

*A mis padres y familiares
por el amor, cariño,
comprensión y el gran
apoyo que siempre me
han brindado en mi
formación profesional.*

*A la Universidad Católica los
Ángeles de Chimbote y plana
docente por la formación
académica brindada.*

DEDICATORIA

*A mis padres, porque ellos siempre
estuvieron brindándome todo el
apoyo y sus consejos para poder
lograr mis metas para ser cada día
una mejor persona, inculcándome
buenos valores que de una u otra
manera me han servido en la vida.*

*A mi familia, porque siempre me
han apoyado estando conmigo en
los momentos que más necesite de
ellos.*

*A las personas, que siempre me han
brindado su apoyo y orientado en
la realización de este trabajo.*

RESUMEN

El presente trabajo de investigación, de tipo experimental, de enfoque cuantitativo y corte longitudinal se realizó con el objetivo de determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* (Pers) Schum (maichil) sobre cepas de *Enterococcus faecalis*. Se trabajó con 20 placas divididas en 4 grupos las cuales contenían cultivos de *Enterococcus faecalis*, se administró 25µl del extracto etanólico de *Thevetia peruviana* en las concentraciones de 25% y 50%, grupo estándar farmacológico (Levofloxacino 5µg/disco) y grupo control negativo (solución salina fisiológica). La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de Kirby-Bauer. Las medidas de los halos de inhibición para el extracto etanólico al 25% (9,55 mm); al 50% (10,75 mm); para el control estándar (10,2 mm), y para el control negativo (6 mm). Los resultados fueron sometidos a la prueba T-STUDENT y prueba ANOVA. El análisis estadístico de los datos reveló diferencia estadística altamente significativa entre los diferentes grupos (ANOVA: P<0,000), según T-STUDENT el efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* al 25%, 50% y Levofloxacino 5µg son similares al no haber diferencias significativas. Se concluye que el extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* tiene efecto antibacteriano in vitro en cepas de *Enterococcus faecalis*.

Palabras clave: *Thevetia peruviana*, efecto antibacteriano, *Enterococcus faecalis*, extracto etanólico, halo de inhibición.

ABSTRACT

The present investigation, of experimental type, of quantitative approach and longitudinal section, was carried out with the objective of determining the in vitro antibacterial effect of the ethanolic extract of the leaves of *Thevetia peruviana Pers Schum* (maichil) against *Enterococcus faecalis*. We worked with 20 plates divided into 4 groups which contained cultures of *Enterococcus faecalis*, 25µl of the ethanolic extract of *Thevetia peruviana* was administered in contractions of 25% and 50%, standard pharmacological group (Levofloxacin 5µg/disc) and negative control group (physiological saline solution). The antimicrobial activity was evaluated by the Kirby-Bauer method. The measurements of the inhibition zones for the 25% ethanolic extract (9.55 mm); 50% (10.75 mm); for the standard control (10.2 mm), and for the negative control (6 mm). The results were subjected to the T-STUDENT test and the ANOVA test. The statistical analysis of the data revealed highly significant statistical difference between the different groups (ANOVA: P <0.000), according to T-STUDENT the antibacterial effect of the ethanolic extract of the leaves of *Thevetia peruviana* at 25%, 50% and Levofloxacin 5µg are similar there are no significant differences. It is concluded that the ethanolic extract of the leaves of *Thevetia peruviana* has an antibacterial effect in vitro in strains of *Enterococcus faecalis*.

Key words: *Thevetia peruviana*, antibacterial effect, *Enterococcus faecalis*, ethanolic extract, inhibition halo.

CONTENIDO

| | |
|--|-----|
| AGRADECIMIENTO | iii |
| DEDICATORIA | iv |
| RESUMEN | v |
| ABSTRACT | vi |
| I. INTRODUCCIÓN | 01 |
| II.REVISIÓN DE LITERATURA | 07 |
| 2.1. Antecedentes..... | 07 |
| 2.2. Bases teóricas..... | 09 |
| III. HIPÓTESIS | 16 |
| IV. METODOLOGÍA | 17 |
| 4.1. Diseño de investigación..... | 17 |
| 4.2. Población y muestra..... | 18 |
| 4.3. Definición y operacionalización de las variables..... | 20 |
| 4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos..... | 21 |
| 4.5. Plan de análisis..... | 23 |
| 4.6. Matriz de consistencia..... | 24 |
| 4.7. Principios éticos..... | 25 |
| V.RESULTADOS | 26 |
| 5.1. Resultados..... | 26 |
| 5.2. Análisis de resultados..... | 27 |
| VI.CONCLUSIONES | 30 |
| ASPECTOS COMPLEMENTARIOS | 31 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 32 |
| ANEXOS | 41 |

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Evaluación del efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* a concentraciones de 25% y 50% en solución acuosa sobre *Enterococcus faecalis* a las 24 horas, expresados en mm de diámetro de inhibición...
.....26

Tabla 2. Comparación del efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* frente a *Enterococcus faecalis* de los diferentes grupos de experimentación a las 24 horas..... 26

I. INTRODUCCIÓN

La etnobotánica es la disciplina que se encarga de estudiar la relación entre las plantas y el hombre y como las plantas influyen en el desarrollo de las diversas culturas. La etnobotánica es parte fundamental para el conocimiento acerca de cómo utilizar la medicina tradicional, incrementado el conocimiento cultural y la utilización adecuada de las diversas plantas con propiedades terapéuticas, los estudios de las plantas con propiedades terapéuticas avizora un futuro prometedor debido al incremento de la utilización actual de las poblaciones en todo el mundo como tratamiento complementario^(1,2).

Desde los tiempos inmemoriales se utiliza la medicina natural como una alternativa de las medicinas farmacéuticas; ya que las plantas tienen muchas formas de uso, las cuales son de mucha ayuda para aliviar y curar enfermedades que mejoran la salud. Según la Organización Mundial de Salud (OMS) los medicamentos herbarios abarcan: hojas, flores, frutos, semillas, tallos, madera, corteza, raíces, rizomas y otras partes de plantas, enteros, fragmentados o pulverizados, jugos frescos, gomas, aceites esenciales, resinas y polvos secos de hierbas, y productos herbarios acabados, que tienen principios activos u otros materiales vegetales o combinaciones de esos elementos ⁽³⁾.

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS), más del 80% de la población mundial, especialmente en los países en desarrollo, utiliza tratamientos tradicionales a base de plantas medicinales para sus necesidades de atención primaria de salud. No obstante, en los países ha ocurrido una pérdida importante del conocimiento

tradicional ⁽⁴⁾.

El 80% de las personas en todo el mundo, hace uso de las plantas como primordial remedio medicinal para tratar las necesidades primarias de asistencia médica, esto estimula la Organización Mundial de la Salud (OMS) ⁽⁵⁾.

El Perú está considerado como el tercer país más mega diverso del planeta, ha brindado importantes aportes de muchas especies y variedades para el mundo gracias a los diferentes pisos ecológicos y microclimas que presenta, cuenta con 84 zonas de vida de las 103 que se conoce donde habría 50 mil especies vegetales (20% de la existentes en la tierra) de las que 2000 han sido utilizadas con fines terapéuticos ⁽⁶⁾.

A nivel mundial los países industrializados prefieren usar la medicina moderna con un fin lucrativo, sin embargo grandes sectores de la población recurren a las plantas medicinales y medicamentos herbarios por su bajo costo y su fácil acceso para su atención primaria de salud ⁽⁷⁾.

Según la clasificación de Lance Field las bacterias del género *Enterococcus* hasta el año 1984 pertenecía a los *Streptococcus* ubicados en el grupo D. A partir de dicho año mediante estudios serológicos determinaron que existían diferencias genéticas entre ambas especies. Los *Enterococcus* fueron clasificados en 23 especies, de estas solo algunas como *enterococcus faecalis* y *enterococcus faecium* son consideradas patógenas y de importancia clínica para el hombre debido a su frecuencia en las infecciones intrahospitalarias y a la resistencia que presenta hacia algunos grupos de antibióticos ⁽⁸⁾.

Estas bacterias producen enfermedades muy graves tales como: endocarditis, infecciones postoperatorias, bacteriemias y septicemias en aquellos pacientes inmunodeprimidos, pacientes de la tercera edad y neonatos ⁽⁸⁾.

Enterococcus faecalis son bacterias que se encuentran normalmente colonizando el tracto gastrointestinal, estas bacterias son las responsables de enfermedades muy graves para el ser humano llegando a producir la muerte debido a la capacidad de supervivencia y resistencia que presenta hacia algunos grupos de antibióticos en los lugares donde se encuentran. Son bacterias que pueden sobrevivir a temperaturas muy altas a falta de nutrientes en presencia o no de oxígeno y ante fármacos de amplio espectro. La mortalidad está relacionada a *Enterococcus faecalis* y *enterococcus faecium* debido a la resistencia bacteriana y patogenicidad que presentan ⁽⁸⁾.

La patogenicidad de *Enterococcus faecalis* asume varias patologías intrahospitalarias tales como: infecciones del tracto urinario, infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones de heridas quirúrgicas, infecciones del sistema nervioso central, infección del prepucio, septicemias, vaginitis, peritonitis entre otras ⁽⁸⁾.

A *Enterococcus faecalis* le es muy fácil desarrollarse y colonizar en el agente hospedero gracias a varios factores de virulencia que este presenta. Debido a la resistencia bacteriana que presenta *enterococcus faecalis* hacia diversos grupos de antibióticos es una gran amenaza para los tratamientos terapéuticos ⁽⁹⁾.

Entre los grupos de antibióticos a los cuales presenta resistencia bacteriana *Enterococcus faecalis* están los betalactámicos, aminoglucósidos, macrólidos, quinolonas, tetraciclinas

y vancomicina. La resistencia que presentan se le atribuye a varios factores de virulencia tales como: sustancias de agregación, gelatinasa, plásmidos, citolisina, adhesinas y hialuronidasa ⁽⁹⁾.

Thevetia peruviana es una planta que pertenece a la familia Apocynaceae, la cual es originaria del centro y sur de América. Está distribuida desde México a Perú es por eso que se considera una planta nativa de dichos países. El nombre *Thevetia* se debe al botánico misionero francés André Thevet (1502-1590) y el termino peruviana “peruana” de Perú ^(10,11).

Es un árbol de tamaño pequeño de 2 a 6 metros de altura, presenta un látex de color blanco en todas las partes de la planta. Las hojas son de color verde, un poco más oscuro en la cara superior, lineares lanceoladas, las inflorescencias presentan pocas cantidades de flores que son de color amarillo a anaranjado en forma de campana. Los frutos son transversalmente oblongos, generalmente más o menos obtriangulares, verdosos, amarillentos o purpúreos. En su interior se encuentra una nuez o almendra conocida localmente en algunas regiones como codo de fraile, triangular o con forma de almeja, y que contiene en su interior de dos a cuatro semillas ⁽¹¹⁾.

Contiene en sus tejidos altas concentraciones de cardenólidos entre los que se incluyen *Thevetia A, B* y *neriifolina*, capaces de producir efectos inotrópicos positivos en el hombre y los animales. Toda la planta es tóxica para el hombre, los animales y ciertos insectos ⁽¹²⁾.

Puede llegar a producirse muchas reacciones adversas al inhalar, ingerir o llegar a tener contacto con la sabia o extractos de la planta. En este sentido varios autores han referido

irritación de mucosas, eritema bucal, náuseas, vómitos, salivación profusa, dolor abdominal, diarrea, dolor de cabeza, alteraciones mentales, disturbios visuales, midriasis, neuritis periférica y síntomas cardiovasculares (bloqueo sinusal y aurículo-ventricular) como respuesta al ingerir *Thevetia peruviana* ⁽¹²⁾.

Entre otro de sus efectos es que es diurético, puede llegar a producir graves alteraciones hidroelectrolíticas, la hipocalemia es una de estas alteraciones si se llegara a utilizar de forma excesiva ⁽¹³⁾.

Se utiliza con fines terapéuticos para procesos febrífugos, catártico, emético, antiartrítico, para conciliar el sueño, pérdida de peso; el látex se utiliza para el tratamiento de la sordera, la sarna, las úlceras, dolores de muela, tumores y hemorroides ⁽¹⁴⁾.

Existen múltiples medicamentos antibacterianos de los cuales cabe resaltar sus efectos adversos, falta de efecto terapéutico por la resistencia al medicamento, alto costo para ser adquiridas, sobre todo de aquellas personas de bajos recursos económicos. Razón por la que se realizó esta investigación, con el fin de utilizar *Thevetia peruviana* como fuente natural para tratar afecciones producidas por *Enterococcus faecalis*, es por ello que planteamos la siguiente interrogante:

¿El extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* (Pers) Schum (maichil) presentará efecto antibacteriano in vitro frente a cepas de *Enterococcus faecalis*?

Objetivo general:

- Determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana (Pers) Schum* (maichil) frente a cepas de *Enterococcus faecalis*.

Objetivos específicos:

- Determinar efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana (Pers) Schum* (maichil) por medio de la prueba de susceptibilidad Kirby-Bauer frente a *Enterococcus faecalis* a las concentraciones de 25% y 50%.
- Comparar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana (Pers) Schum* (maichil) a las concentraciones de 20% y 50% y Levofloxacino 5µg frente a *Enterococcus faecalis*.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Antecedentes

Has et al, en el año 2011 en Bangladesh, publicaron un estudio sobre las actividades antidiarreicas, antimicrobianas y citotóxicas del extracto etanólico de las hojas de adelfa amarilla (*Thevetia peruviana*). Se utilizó la técnica de difusión de disco para probar las actividades antibacterianas *in vitro* del extracto. El extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* mostraron una estrecha zona de inhibición en los céspedes bacterianos de *Shigella flexineri*, *Salmonella typhi*, *Klebsiella sp*, *Staphylococcus aureus* y *Shigella sonnei*.⁽¹⁵⁾

Kareru et al, en el año 2010, en Kenia, realizaron un estudio con *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum en el cual utilizaron el aceite de semilla para hacer un revestimiento superficial con propiedades antifúngicas, antibacterianas y antitérmicas. La pintura exhibió actividad inhibidora contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Candida albicans* de una manera dependiente de la concentración. Las actividades antibacterianas fueron estadísticamente significativas ($p = 0.05$). La acción repelente de la pintura contra las termitas subterráneas (*Microtermes spp*) Fue significativa ($p = 0.03$)⁽¹⁶⁾.

Kumar et al, en el año 2016, en la India, realizaron un estudio, cuyo objetivo fue evaluar componentes fitoquímicos y actividad antibacteriana de *Ricinus communis* y *Thevetia peruviana*. El análisis fitoquímico de los extractos de *Thevetia peruviana* indica que todos los extractos contenían terpenoides, fenoles, flavonoides, antraquinonas y

aminoácidos libres. Para determinar la acción antimicrobiana utilizaron el método de difusión de discos. Los extractos de las hojas de *Thevetia peruviana* mostraron los mejores espectros de actividad contra todos los microorganismos probados ⁽¹⁷⁾.

Virender et al, en el año 2017, en la india en un estudio publicaron la actividad antibacteriana de plantas medicinales contra el extendido espectro de betalactamasa que producen algunas bacterias causando infección del tracto urinario, donde utilizaron el extracto acuoso de hoja de *Euphorbia hirta*, *Erythrophleum suaveolens* y extracto metanólico de hojas de *Thevetia peruviana*. Para determinar la acción antimicrobiana utilizaron el método de difusión de discos. Dichos extractos mostraron actividad antibacteriana contra la beta-lactamasa de espectro extendido en bacterias *E. coli*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, MRSA (*Staphylococcus resistente a meticilina aureus*), *Salmonella* y *Proteus*. El extracto foliar metanólico de *Thevetia peruviana* presentó mayor actividad antibacteriana contra *Klebsiella*, *E. coli* (15mm, 14mm) respectivamente y significativa frente a otras ⁽¹⁸⁾.

Wen et al, en el año 2011, en Perú (Lima) en un estudio evaluaron la actividad antifúngica y antimicrobiana de los extractos etanólicos de *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum. (Apocynaceae), *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae), *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum. (Rubiaceae) y *Psidium acutangulum* DC (Myrtaceae), cuatro plantas utilizadas en la medicina tradicional peruana contra las infecciones micóticas de la piel. Para determinar la acción antifúngico y antibacteriana utilizaron el método de difusión de discos. El extracto etanólico de *Thevetia peruviana* fue menor al de *Psidium acutangulum* ⁽¹⁹⁾.

2.2. Bases teóricas:

Fitoterapia:

La fitoterapia es una ciencia la cual estudia la utilidad de los productos de origen vegetal con una finalidad terapéutica para la humanidad, ya sea para tratar, atenuar o prevenir estados patológicos ^(20, 21).

Planta medicinal:

Las plantas medicinales, son aquellas que, en una o diferentes partes de la misma, están presentes los compuestos llamados “principios activos”, estos componentes cumplen diferentes actividades terapéuticas, por sí solos o sinérgicamente, además pueden ser precursores para dar origen a productos semisintéticos ⁽²²⁾.

Principios activos:

El principio activo, es aquel componente o sustancia química, ya sea de origen natural o sintético, responsable de ejercer una actividad farmacológica ⁽²³⁾.

Droga vegetal:

Según la OMS considera como droga vegetal a cualquier parte de una planta medicinal utilizada en el tratamiento de alguna enfermedad. La real farmacopea Española establece son drogas vegetales las plantas, partes de una planta, algas, hongos o líquenes, que pueden ser fragmentados, sin ningún proceso, básicamente desecados o también puede ser en estado fresco. También se considera droga vegetal ciertos exudados que no han sido sometidos a tratamientos específicos ⁽²⁴⁾.

Extracto vegetal:

Un extracto vegetal, es un concentrado de principios activos, puede adoptar diferentes consistencias, ya sea sólida, líquida, semisólida, adquiridos por tratamiento apropiados de una planta, con el fin de asegurar la estabilidad de sus componentes de interés, cabe resaltar el uso adecuado de solventes y el tipo de extracción que se va a emplear ⁽²⁵⁾.

Thevetia peruviana:**Descripción botánica:**

Thevetia peruviana es una planta de la familia de las Apocynaceae, cultivada en las zonas tropicales y subtropicales como un árbol ornamental. Contiene en sus tejidos altas concentraciones de cardenólidos entre los que se incluyen Thevetia A, B capaces de producir efectos inotrópicos positivos en el hombre y los animales. Toda la planta es tóxica para el hombre, animales y ciertos insectos ⁽²⁶⁾.

Puede llegar a producirse muchas reacciones adversas al inhalar, ingerir o llegar a tener contacto con la sabia o extractos de la planta. En este sentido varios autores han referido irritación de mucosas, eritema bucal, náuseas, vómitos, salivación profusa, dolor abdominal, diarrea, dolor de cabeza, alteraciones mentales, disturbios visuales, midriasis, neuritis periférica y síntomas cardiovasculares ⁽²⁶⁾.

Taxonomía ⁽¹⁴⁾:

- Reino: Plantae
- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida

- Orden: Gentianales
- Familia: Apocynaceae
- Género: *Thevetia*
- Especie: *T. peruviana* (Pers). Schum.
- Nombres comunes: Chilca, Chilindrón, Covadonga, Covalonga, Codo de fraile, Chira, Naranja amarillo, Yoyote, Caballón, Campanilla muerta, Pepa de cruz, Lengua de gato, maichil.

Componentes activos:

Desde 1960, ha habido extensos estudios llevado a cabo en las raíces, cortezas, hojas, flores y semillas de la planta. *Thevetia peruviana* es ampliamente conocido por sus dos más importantes compuestos activos, Thevetin y peruvosid. Peruvosid, un glucósido cardiaco se ha introducido en mercado Alemán como "Endocardin". Thevetin da lugar a la digital como la acción en el corazón, por lo que es constituyente importante. Aparte de estos 2 compuestos, los investigadores tienen aislado un total de 77 componentes de la planta de especie *Thevetia*, de las cuales 34 son constituyentes del genero *peruviana* ⁽²⁷⁾.

Los investigadores tienen categorizado estos componentes en las siguientes categorías: 5 moléculas Enolides; 1 molécula flavona; 1 molécula de Thevetoside; 6 moléculas de Theveside; 1 molécula de pentanodiol; 1 molécula de pentanol; 2 moléculas pentanotriol; 3 moléculas de Kaempferol- de 3-glucósido; 1 molécula de Lupen-3-ol; 1 molécula Lupen dien-3-ol; 2 moléculas flavanona; 4 moléculas

de quercetina-3-glucósido; 4 moléculas Ursadien-3-ol; y 1 molécula de pentanetetrol ⁽²⁷⁾.

Usos terapéuticos:

Actividad antioxidante:

Los flavonoides son potentes antioxidantes, los radicales libres carroñeros, y quelantes de metales y de lípidos por inhibidor de la oxidación. La quercetina es un poderoso antioxidante, anti-histamina natural, y antiinflamatorio el cual está presente en *Thevetia peruviana*. Los estudios muestran que la quercetina puede ayudar a prevenir el cáncer, especialmente el cáncer de la próstata ⁽²⁷⁾.

Actividad antiinflamatoria:

El Investigador Thila Gavathi, R. mostró que los extractos de las flores contienen quercetina, kaempferol y quercetina-7-O-galactósido. Los caracteres antiinflamatorios de estos compuestos aislados se ensayaron por estos investigadores por método vitro, lo que indica propiedades bifásicas para estos componentes ⁽²⁷⁾.

Actividad Antimicótica y antibacteriana:

Beta-Sitosterol presente en *Thevetia peruviana* previene la oxidación del colesterol LDL reduciendo de ese modo el riesgo de la aterosclerosis. Tiene actividades antifúngico, antibacteriano y antiinflamatorio se utiliza también para tratar el asma, la artritis, alergias y el cáncer ⁽²⁷⁾.

Efecto antibacteriano de *Thevetia peruviana*

Según estudios fitoquímicos realizados por Kumar et al, toda la planta contiene en todas sus partes metabolitos como: terpenoides, fenoles, flavonoides, antraquinonas y aminoácidos libres, los cuales algunos de estos metabolitos podrían ser los que ejercen el efecto antibacteriano como es el caso de los terpenoides que según estudios si presentan dicho efecto, aparte del β -Sitosterol que refiere Torres en un estudio ^(18,27).

Enterococcus faecalis

E. faecalis es un coco Gram positivo que puede desarrollarse en presencia o ausencia de oxígeno, inmóvil y no esporulado. Presentan un diámetro de 0.5 a 0.8 micrómetros y es normal que lo encontremos habitando el tracto gastrointestinal del humano. Una característica notable de *Enterococcus faecalis* la constituye su capacidad para sobrevivir y crecer en microambientes que pudieran ser tóxicos para muchas bacterias, en particular zonas con altas concentraciones de sales (6.5% de cloruro de sodio), temperaturas extremas (15-60° C) ⁽²⁸⁾.

- **Patogenicidad y virulencia:**

Entre los diversos factores de virulencia que presenta *Enterococcus faecalis* se encuentra la producción de peróxido extracelular, polisacáridos capsulares, sustancias de agregación, feromonas, gelatinasa, proteínas de superficie y plásmidos. Tienen la capacidad de adherirse a las células del agente hospedador y alterar la respuesta del hospedador. Además tienen la capacidad de compartir

su información entre especies aumentando de esta manera su capacidad para producir enfermedad ⁽²⁹⁾.

- **Enfermedades por Enterococcus:**

Enterococcus faecalis son las especies más comunes, responsables de una gran variedad de infecciones. Son capaces de producir enfermedades muy graves tales como bacteriemias y endocarditis. También causan infecciones de heridas quirúrgicas, septicemias, infecciones urinarias, infecciones del sistema nervioso central, infecciones en la piel y tejidos blandos, etc. ⁽³⁰⁾.

Entre una de las infecciones más frecuentes que producen los Enterococcus son las infecciones urinarias. La naturaleza de su interacción con el tejido uroepitelial es muy compleja, la involucra adhesinas de naturaleza proteica y polisacárido. El porcentaje de incidencia de este tipo de infecciones aumenta drásticamente, que puede llegar a ser responsable del 16% de estas, y también son la fuente más común de bacteriemias ⁽³⁰⁾.

- **Resistencia bacteriana:**

Enterococcus es un patógeno relevante relacionado a infecciones asociadas a la asistencia sanitaria a nivel mundial, favorecido por su resistencia a la mayoría de los antimicrobianos. Presentan moderada sensibilidad al grupo de las penicilinas y presentan resistencia intrínsecamente a todas las cefalosporinas, sulfametoxazol/trimetoprim y a concentraciones terapéuticas de aminoglucósidos y clindamicina. Asimismo, en el transcurso de los años estos

microorganismos han adquirido resistencia a múltiples antibióticos, bien por la adquisición de genes de resistencia en plásmidos o en transposones, o por mutaciones espontáneas que aumentan el nivel de resistencia a algunos antibióticos ⁽³⁰⁾.

III. HIPÓTESIS

3.1. Hipótesis alternativa (H1):

- El extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* (Pers) Schum (maichil) si tiene efecto antibacteriano in vitro frente a *Enterococcus faecalis*.

3.2. Hipótesis Nula (H0):

- El extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* (Pers) Schum (maichil) no tiene efecto antibacteriano in vitro frente a *Enterococcus faecalis*.

IV. METODOLOGÍA

4.1. Diseño de investigación:

El presente trabajo de investigación fue de tipo experimental, de enfoque cuantitativo y corte longitudinal. La técnica utilizada fue la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana aplicando el método de Disco difusión o Kirby-Bauer.

Grupo control:

Conformado por 5 placas con cultivo de *Enterococcus faecalis* y discos con solución salina fisiológica, se incubo por un tiempo de 24 horas a temperatura de 37°C, transcurrido dicho tiempo se tomó la lectura de los halos de inhibición.

Grupo estándar:

Conformado por 5 placas con cultivo de *Enterococcus faecalis* y discos de Levofloxacino 5µg. Se incubo por un tiempo de 24 horas a temperatura de 37°C, transcurrido dicho tiempo se tomó la lectura de los halos de inhibición.

Grupo experimental 01:

Conformado por 5 placas con cultivo de *Enterococcus faecalis* y discos con 25µl del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* al 25%. Se incubo por un tiempo de 24 horas a temperatura de 37°C, transcurrido dicho tiempo se e tomó la lectura de los halos de inhibición.

Grupo experimental 02:

Conformado por 5 placas con cultivo de *Enterococcus faecalis* y discos con 25µl del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* al 50%, se incubo por un tiempo de

24 horas a temperatura de 37°C, transcurrido dicho tiempo se e tomó la lectura de los halos de inhibición

4.2. Población y muestra

Población vegetal:

La planta *Thevetia peruviana*, crece en el Centro Poblado de Chuquibamba, Provincia de Cajabamba, Departamento Cajamarca, ubicado a 2654 msnm.

Muestra vegetal:

Se recolectaron 352g de las hojas de *Thevetia peruviana* en el centro poblado de Chuquibamba, Provincia de Cajabamba, en el Departamento de Cajamarca, fueron seleccionados bajo criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de inclusión:

- Hojas de *Thevetia peruviana* frescas.
- Hojas de *Thevetia peruviana* sanas.
- Hojas de *Thevetia peruviana* limpias, sin contaminantes.

Criterios de exclusión:

- Hojas de *Thevetia peruviana* marchitadas.
- Hojas de *Thevetia peruviana* sucias, contaminadas.

Población microbiológica:

La cepa *Enterococcus faecalis*, ATCC 29212, fue obtenida de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Trujillo. Ubicada en la ciudad de Trujillo, departamento de La Libertad.

Criterios de inclusión:

- Cepa de una sola especie.
- Cepa de *Enterococcus faecalis* libre de contaminación.

Criterios de exclusión:

- Cepa de diferentes especies.
- Cepa de *Enterococcus faecalis* contaminada.

4.3. Definición y operacionalización de las variables.

| Variables | | Definición conceptual | Definición operacional | Indicadores | Escala de medición |
|-------------------------------|--|---|---|--|---------------------------------|
| Variable Independiente | Extracto etanólico de las hojas de <i>Thevetia peruviana</i> . | Cantidad en mg de diversos metabolitos secundarios de <i>Thevetia peruviana</i> , contenidos en un volumen de agua. | Se utilizó 2 concentraciones del extracto. | Extracto etanólico <i>T. peruviana</i> al 25% Extracto etanólico <i>T. peruviana</i> al 50% | Variable cualitativa Nominal. |
| Variable Dependiente | Efecto antibacteriano in vitro frente a <i>E. faecalis</i> | Es la capacidad de una sustancia para inhibir un cultivo de bacterias. | Se determinó mediante la medición de los halos de inhibición. | mm (milímetros) | Variable cuantitativa de razón. |

4.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Técnica: Preparación del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana*

Para la preparación del extracto etanólico se realizó el recolectado de 352g de las hojas de *Thevetia peruviana* (Pers) Schum se lavó cuidadosamente todas las hojas, posteriormente se procedió a desecación a temperatura ambiente bajo sombra durante 7 días, luego se pulverizó y tamizó, el peso total del pulverizado fue 110g, se dejó macerar por 72 horas en etanol 60° en una proporción de 1- 6 p/p.

Transcurrido el tiempo de maceración se filtró el líquido al vacío, con papel de filtro Whatman N° 1. Al líquido filtrado se le domino extracto etanólico.

A continuación, el extracto etanólico se concentró en un rotavapor (Heidolph WB 2000) a presión reducida y temperatura controlada, no mayor a 45° C. finalmente el extracto se colocó en capsulas de porcelana y se llevó a secar a la estufa a 40° C. A partir de este extracto seco se prepararon las concentraciones de 25% y 50% peso/volumen pesando 2.5 y 5g por cada 10 ml de agua estéril. Finalmente, las concentraciones preparadas, del extracto etanólico, se colocaron en frascos color ámbar de 10 ml y fueron almacenadas a 6°C hasta su posterior utilización.

Preparación de Nefelómetro: Preparación de la suspensión estándar de turbidez 0,5 de McFarland.

El patrón de McFarland, se preparó añadiendo 99,5 ml de ácido sulfúrico al 0.18 Molar (1% V/V), a una solución acuosa de 0.5 ml de cloruro de bario al 0.048 Molar (1.175% W/V), la cual se forma un precipitado suspendido de sulfato de bario ⁽³¹⁾.

Luego fue comparado visualmente con la suspensión de bacterias en solución salina con la finalidad de igualar la turbidez, este patrón McFarland 0.5% equivale aproximadamente a una suspensión homogénea de 1.5×10^8 células bacterianas por ml ⁽³¹⁾.

Preparación del medio de cultivo:

Para la siembra y prueba de sensibilidad de *Enterococcus faecalis*, el medio adecuado es el agar Müller-Hinton. Para la preparación se suspendió 37g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, luego se dejó embeber de 10 a 15 minutos, se comenzó a calentar con agitación fuerte y constante y se llevó a hervir durante 1 minuto. A continuación, se procedió a esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos, se dejó enfriar hasta que llegó a una temperatura entre 45°-50°C y se procedió a distribuir de 25 a 30 ml en las placas Petri ⁽³²⁾.

Preparación del inóculo: Método directo de inoculación a partir de colonias aisladas

De una placa de cultivo incubada por 18-24 horas, con ayuda de un hisopo estéril, se seleccionan colonias y se prepara una suspensión directa en solución salina. La suspensión debe ser inmediatamente ajustada a la escala 0.5 de Mc. Farland.

Inoculación de las Placas

Luego de 15 minutos del ajuste de la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, se rotó el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo. Se procedió a inocular la superficie seca de la placa con agar Müller-Hinton, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo. Previo a

colocar los discos, se dejó secar la placa a temperatura ambiente durante 3 a 5 minutos para que cualquier exceso de humedad superficial sea absorbido.

Aplicación de los discos:

Con cuidado se colocaron los discos con 25µl del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* al 25% y 50% uniformemente sobre la superficie del agar con ayuda de una pinza estéril, procurando asegurar el contacto completo del disco con el agar ⁽³²⁾.

Incubación:

Se incubaron las placas en posición invertida a 35°C, durante 24 horas. Luego se prosiguió con la medición de los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco ⁽³²⁾.

Recolección de datos

Se realizó mediante observación directa de los resultados de la experimentación: Medición de los halos de inhibición formados por la aplicación de los discos embebidos con el extracto a diferentes concentraciones.

4.5. Plan de análisis

Los datos fueron tabulados en un Software Microsoft Excel versión 2013, para su procesamiento se utilizó un paquete estadístico IBM SPSS V.22.0. Para el análisis, se sometieron los datos a la prueba SHAPIRO – WILKS para determinar la normalidad de los grupos de estudio, seguidamente elegir las pruebas paramétricas de ANOVA y T-STUDENT para el análisis de los resultados.

4.6. Matriz de consistencia

| Título de la investigación | Formulación del problema | Objetivos | Hipótesis | Tipo de investigación Diseño | Variables | Definición operacional | Indicadores y escala de medición | Plan de análisis |
|---|---|---|--|---|--|---|--|-------------------------------|
| Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Thevetia peruviana</i> (Pers) schum (maichil) frente a cepas de <i>enterococcus faecalis</i> . | ¿El extracto etanólico de las hojas de <i>Thevetia peruviana</i> (Pers) Schum (maichil) presentará efecto antibacteriano frente a cepas de <i>Enterococcus faecalis</i> ? | <p>Objetivo general:</p> <p>Determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Thevetia peruviana</i> (Pers) Schum (maichil) frente a cepas de <i>Enterococcus faecalis</i>.</p> <p>Objetivos específicos:</p> <p>Determinar efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Thevetia peruviana</i> por medio de la prueba de susceptibilidad Kirby-Bauer sobre <i>Enterococcus faecalis</i> a las concentraciones de 25% y 50%.</p> <p>Comparar el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de <i>Thevetia peruviana</i> (Pers) Schum a las concentraciones de 20% y 50% y Levofloxacino 5µg frente a <i>Enterococcus faecalis</i>.</p> | <p>Hipótesis alternativa:</p> <p>El extracto etanólico de las hojas de <i>Thevetia peruviana</i> (Pers) Schum (maichil) SI tiene efecto antibacteriano frente a <i>Enterococcus faecalis</i>.</p> <p>Hipótesis nula:</p> <p>El extracto etanólico de las hojas de <i>Thevetia peruviana</i> (Pers) Schum (maichil) NO tiene efecto antibacteriano frente a <i>Enterococcus faecalis</i>.</p> | Experimental, de enfoque cuantitativo y corte longitudinal. | <p>Independiente</p> <p>Extracto etanólico de las hojas de <i>Thevetia peruviana</i></p> <p>Dependiente.</p> <p>Efecto antibacteriano in vitro frente a <i>E. Faecalis</i></p> | <p>Concentración del E. E. T. <i>peruviana</i> al 25% y 50%</p> <p>Se determinó mediante la medición de los halos de inhibición</p> | <p>E. E.T <i>peruviana</i> al 25%</p> <p>E. E.T <i>peruviana</i> al 50%</p> <p>Variable Cualitativa nominal</p> <p>mm (milímetros)</p> <p>Variable Cuantitativa de razón</p> | <p>ANOVA</p> <p>T-Student</p> |

4.7. Principios éticos

Para la ejecución de este trabajo de investigación, se consideró los principios éticos que rigen la actividad investigadora de la Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote, los cuales consisten en ⁽³³⁾:

Protección a las personas.- La persona en toda investigación es el fin y no el medio, por ello necesitan cierto grado de protección, el cual se determinará de acuerdo al riesgo en que incurran y la probabilidad de que obtengan un beneficio ⁽³³⁾.

Justicia.- El investigador debe ejercer un juicio razonable, ponderable y tomar las precauciones necesarias para asegurarse de que sus sesgos, y las limitaciones de sus capacidades y conocimiento, no den lugar o toleren prácticas injustas. El investigador está también obligado a tratar equitativamente a quienes participan en los procesos, procedimientos y servicios asociados a la investigación ⁽³³⁾.

Integridad científica.- Alude al correcto procedimiento de la práctica de la ciencia, y connota honestidad, transparencia, justicia y responsabilidad. Por tanto transmite las ideas de totalidad y consistencia morales ⁽³³⁾.

Consentimiento informado y expreso.- En toda investigación se debe contar con la manifestación de voluntad, informada, libre, inequívoca y específica; mediante la cual las personas como sujetos investigadores o titular de los datos consienten el uso de la información para los fines específicos establecidos en el proyecto ⁽³³⁾.

V. RESULTADOS

5.1. Resultados

Tabla 1. Evaluación del efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* a concentraciones de 25% y 50% en solución acuosa sobre *Enterococcus faecalis* a las 24 horas, expresados en mm de diámetro de inhibición.

| GRUPOS | Solución salina fisiológica | PROMEDIO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR (mm) | | | Sig. (P)** |
|----------|-----------------------------|---|--|--|------------|
| | | Levofloxacino 5ug | E.E.T. <i>peruviana</i> (25%) en solución acuosa | E.E.T. <i>peruviana</i> (50%) en solución acuosa | |
| 24 horas | 06.00 ± 0.00 | 10.2 ± 0.59 | 9.55 ± 0.37 | 10.75 ± 0.43 | 0.000 |

**P (<0.05); PRUEBA ANOVA.

E.E.: Extracto Etanólico

Tabla 2. Comparación del efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* frente a *Enterococcus faecalis* de los diferentes grupos de experimentación a las 24 horas

| GRUPOS | Significancia (p) * |
|--|---------------------|
| E.E. <i>T. peruviana</i> al 25% Vs Levofloxacino | 0.072 |
| 24 horas E.E. <i>T. peruviana</i> al 50% Vs Levofloxacino | 0.134 |
| E.E. <i>T. peruviana</i> al 25% Vs E.E <i>T peruviana</i> al 50% | 0.002 |

*P (<0.05); PRUEBA T-STUDENT.

E.E.: Extracto Etanólico

5.2. Análisis de resultados

El presente trabajo de investigación de tipo experimental “in vitro”, tuvo como propósito evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* sobre *Enterococcus faecalis*, dicho efecto se midió a través de los halos de inhibición obtenidos por el método de Kirby- Bauer.

Los halos de inhibición presentaron los siguientes promedios: 9.55 mm y 10.75 mm correspondientes a las concentraciones 25%, 50% del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* sobre *Enterococcus faecalis*

En la tabla 01, se realizó la prueba estadística de ANOVA, al comparar todos los grupos de estudio, el valor de significancia es 0.000, lo que significa que existe una diferencia estadísticamente significativa, por lo tanto, el extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* si tiene efecto antibacteriano sobre *Enterococcus faecalis*.

En la tabla 02, mediante la prueba T – STUDENT, se comparó el extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* a concentraciones de 25% y 50% frente a Levofloxacino, donde se aprecia que no existen diferencias estadísticamente significativas, por lo tanto el Levofloxacino y el extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* a las concentraciones 25% y 50% tienen similar efecto antibacteriano sobre *Enterococcus faecalis*, pero entre la concentración de 25% y 50% si existe una diferencia significativa, lo que indica que el extracto de *Thevetia peruviana* a la concentración de 50% tuvo mayor efecto antibacteriano.

Los resultados de este estudio, se asemejan a lo encontrado por Kumar et al, quien refiere que los extractos de las hojas de *Thevetia peruviana* tienen actividad antimicrobiana sobre varias cepas de bacterias. Kumar utilizó el extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* al 100% logrando obtener halos de inhibición de 23 y 24 mm en *Bacillus subtilis* y *E. coli*, en cambio en el presente estudio se utilizó las concentraciones 25% y 50% siendo el mayor promedio de halo de inhibición 10.75 mm correspondiente a la concentración del 50%.

En el estudio de Virender et al, refiere que el extracto metanólico de hojas de *Thevetia peruviana* tienen actividad antibacteriana sobre bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus*), quedando demostrado en el presente estudio que el *Enterococcus faecalis*, siendo una bacteria Gram positiva es susceptible al extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana*.

El mecanismo de acción para la actividad antibacteriana que presenta los metabolitos de *Thevetia peruviana* aún no ha sido claramente caracterizado. Torres en un estudio indica que dicha función antibacteriana se debe al β -Sitosterol. Sen et al confirma esta opinión al referir en un estudio que β -Sitosterol si presenta efecto antibacteriano ^(27,34).

Por otra parte dicha acción también podría deberse a la presencia de terpenoides los cuales están presentes en toda la planta tal como lo indica Kumar et al en un análisis fitoquímico que realizo a los extractos de las diferentes partes de *Thevetia peruviana* ⁽¹⁸⁾.

Algunos de los mecanismos por los cuales los componentes activos de los extractos pueden inhibir el crecimiento bacteriano seria: inhibición de la síntesis de la pared celular

y la activación de enzimas que destruyen esa pared, interferencia con la síntesis de proteínas y alteración del metabolismo de los ácidos nucleicos entre otros ⁽³⁵⁾

Un aspecto importante del presente estudio, es que en la revisión bibliográfica no se han encontrado estudios previos relacionados al efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* sobre *Enterococcus faecalis*, contribuyéndose de esta manera a dar como aporte que el extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* tiene efecto antibacteriano “in vitro” sobre dicho microorganismo.

VI. CONCLUSIONES

- Según el método de Kirby-Bauer las concentraciones de 25% y 50% del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* (Pers) Schum (maichil) presentan efecto antibacteriano in vitro frente a *Enterococcus faecalis*.
- No existe diferencia significativa entre el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* (Pers) Schum (maichil) a concentraciones de 25% y 50% y Levofloxacino 5ug frente a *Enterococcus faecalis*.

RECOMENDACIONES:

- Se recomienda realizar una investigación de los metabolitos involucrados en la actividad antibacteriana, determinando su mecanismo de acción.
- Es recomendable incentivar el uso de plantas medicinales como, *Thevetia peruviana*, debido a sus propiedades terapéuticas, de tal manera que se utilice bajo estándares establecidos de seguridad y calidad de las plantas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carreño P. La etnobotánica y su importancia como herramienta para la articulación entre conocimientos ancestrales y científicos. Monografía. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Facultad de Ciencias y Educación. Bogotá, 2016. [Citado 15 de noviembre, 2018]. Disponible en: <http://repository.udistrital.edu.co/bitstream/11349/3523/1/Carre%C3%B1oHidalgoPabloCesar2016.pdf>
2. Rodríguez Y. Etnobotánica, diversidad fitoquímica y conservación de especies de interés medicinal en el Parque Nacional Viñales. Habana, CUBA: Editorial Universitaria, 2014. [Citado 15 de noviembre del 2018]. Disponible en: <https://ebookcentral.proquest.com/lib/bibliocauladechsp/detail.action?docID=418369>
3. Olivares C. Efecto Antibacteriano in Vitro Del Aceite Esencial De Las Hojas De *Ocimum Basilicum* L. “albahaca” Frente a *Staphylococcus Aureus*. Universidad Católica los Ángeles de Chimbote, 2018. [Citado 15 de noviembre del 2018]. Disponible en: http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/123456789/5241/EFFECTO_ANTIBACTERIANO_ACEITE_ESENCIAL_OLIVARES_PACHECO_FELICITA_CLARISA.pdf?sequence=1&isAllowed=y
4. Obando M. Efecto Antibacteriano in vitro del Aceite Esencial De La Inflorescencia De *Matricaria Chamomilla* (manzanilla) Sobre Cepa De *Streptococcus Mutans* Sp. ULADECH, 2018. [Citado 15 de noviembre, 2018]. Disponible en: http://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/ULAD_95a133002ff94e722fdb4e472eeff4f8

5. Bernal N, Urbano R. “Uso tradicional de plantas medicinales como antiasmáticas y anticatarrales en el municipio Santa Clara”. TESIS. Universidad Central “Martha Abreu” de Las Villas. Facultad de Química-Farmacología. 2014. [Citado 15 de noviembre,2018]. Disponible en:<http://dspace.uclv.edu.cu/bitstream/handle/123456789/101/Edi%20Bouchrane.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
6. Mendoza G, Minaya S. Estudio fitoquímico e histoquímico de la raíz, tallo y hoja de *krameria lappacea* “ratania” procedente de la provincia de Huaraz-Ancash; 2014.[Citado 15 de noviembre del 2018]. Disponible en:<http://dspace.unitru.edu.pe/bitstream/handle/UNITRU/3727/Mendoza%20Villanueva%2C%20Jeraldine.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
7. Sanchez M. Berrospi R. Actividad laxante del Extracto Hidroalcohólico del fruto *Hylocereus undatus* (Haw) Britton & Rose “pitahaya roja” en ratones albinos de la especie *Mus musculus*. Universidad Norbert Wiener, Lima. 2018. [Citado 15 de noviembre,2018]. Disponible en:<http://repositorio.uwiener.edu.pe/bitstream/handle/123456789/1669/TITULO%20%20Sanchez%20Barrera%2C%20Mirtha%20Nancy.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
8. Álvarez P. Efecto Antibacteriano In Vitro Del Extracto Etanólico De Propolis De *Apis Mellífera* (propóleo) Frente a *Enterococcus Faecalis* Atcc 29212. UPAO, 2014.[Citado 15 de noviembre, 2018]. Disponible en:http://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UPAO_6a4f0d88cd0bd69eb8db981c1b109b2f

9. Zamora L. Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano del aceite esencial de jengibre con el hipoclorito de sodio sobre el *Enterococcus faecalis*". TESIS. Universidad Nacional de Trujillo. 2017. [Citado 15 de noviembre de 2018]. Disponible en: <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/7535>

10. Herrera E, Alejo J, Reyes E, Barahona L. Producción y manejo de Ah kits (*Thevetia peruviana*) especie potencial para la producción de biodiesel. MÉXICO, 2013. [Citado 15 de noviembre del 2018]. Disponible en:http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/4035/CIRSE_01020895800048643ok.pdf?sequence=1

11. Castillo E, Cordova M. Identificación de esteroides en *Asclepias curassavica* (señorita viborana), *Calotropis procera* (matacoyote), *Thevetia ahouai* (huevos de gato) y *Thevetia peruviana* (chilca). Universidad del Salvador Facultad de Química y Farmacia. Tesis. El Salvador, 2015. [Citado 15 de noviembre de 2018]. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/id/eprint/8632/1/16103636.pdf>

12. Manrique L. Extracción y purificación de glicósidos presentes en *Nerium oleander* y *Thevetia peruviana* por uplc acoplado a espectrometría de masas a partir del material vegetal. Universidad ICESI, 2015. [Citado 15 de noviembre de 2018]. Disponible en: https://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/78823/1/tg01082.pdf

13. Aguilar C, Luna Z. Intoxicación por *Thevetia peruviana* (hueso o codo de fraile). Rev. Asoc Mexicana. 2013; 27(4):245-248. [Citado 15 de noviembre de 2018]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/medcri/ti-2013/ti134i.pdf>
14. Campos J. Determinación de la actividad anticancerígena in vitro de los glicósidos cardiotónicos de los frutos de *Thevetia ahouia* (cojón de costa de hojas largas) y *Thevetia peruviana* (chilca) familia apocynaceae. El Salvador. Noviembre de 2009. [Citado 26 de Noviembre del 2018]. Disponible en: <http://ri.ues.edu.sv/2552/1/16101448.pdf>
15. Hassan M, Saha A, Khan S, Islam A, Mahabub-Uz-Zaman M, Ahmed SSU. Estudios sobre las actividades antidiarreicas, antimicrobianas y citotóxicas de las hojas de adelfa amarilla (*Thevetia peruviana*) extraídas con etanol. 2011. [Citado 06 de diciembre del 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4655751/>
16. Kareru P, Keriko J, Kenji G, Gachanja A. "Propiedades anti-termitas y antimicrobianas de la pintura a base de extracto de aceite de *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. Kenia. 2010. [Citado 11 de diciembre del 2018]. Disponible en: <http://www.academicjournals.org/journal/AJPP/article-abstract/51FF21632884>
17. Kumar P, Joshi S, Sati S, Rai D. A Comparative Evaluation of Phytochemical and Antibacterial Properties of *Ricinus communis* linn and *Thevetia peruviana* Schum. Of Kumaun Himalaya. Mintage Journal of Pharmaceutical and Medical Sciences.

- 2016.[Citado 20 de noviembre del 2018]. Disponible en:<http://mjpms.in/index.php/mjpms/article/view/82>
18. Virender S, Munish J, Jyoti G, Pawan K. Antibacterial Activity of Medicinal Plants Against Extended Spectrum beta lactamase producing bacteria causing urinary tract infection.2017. [Citado 11 de diciembre del 2018]; 2 (3), 263-267. Disponible en: <http://www.ijdr.com/drug-research-and-technology/article/view/antibacterial-activity-of-medicinal-plants-against-extended-spectrum-beta-lactamase-producing-bacteria-causing-urinary-tract-infection>
19. Wen L, Haddad M, Fernández I, Espinoza G, Ruiz C, Neyra E, et al. Actividad antifúngica de cuatro plantas usadas en la medicina tradicional peruana. Aislamiento de 3'- formil – 2',4',6' – trihidroxidihidrochalcona, principio activo de Psidium acutangulum. 2011; Perú. [Citado 25 de noviembre, 2018]. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810634X201100030005
20. Poaquiza P. “Uso de plantas medicinales en la labor de parto en la parroquia de Salasaca”. Universidad Técnica de Ambato. Tesis. Ecuador 2018. [citado 26 de noviembre,2018].Disponible`en:<http://repo.uta.edu.ec/bitstream/123456789/27693/1/POAQUIZA%20PAGUNA%20JESSICA%20%20SILVANA%281%29.pdf>
21. Torres V, Castro A. Fitoterapia. Rev. Act. Clin. Med [revista en la Internet]. [Citado 28 de noviembre del 2018].Disponible en:http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2304-37682014000300001&lng=es.

22. Torres J. “Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de *Luma chequen* (molina) a. gray “arrayán” frente a patógenos aislados de hemocultivos del Hospital Nacional Guillermo Almenara Irigoyen, Lima - Perú.” [Tesis]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos 2014. [Citado 28 noviembre del 2018]. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3605/1/Torres_cj.pdf
23. Kuete V, Medicinal Spices and Vegetables from Africa Therapeutic Potential Against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases 2017, Pages 645-673. [Citado 28 noviembre del 2018]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/ajoene>
24. Consejo general de colegios oficiales de farmacéuticos. Portalframa.com. [página en internet]. Perú. 2016. [citado 25 de noviembre del 2018]. Disponible en: <http://www.portalframa.com/Profesionales/campanaspf/categorias/Paginas/introduccionlafitoterapia.aspx#00>
25. Jiménez A. Estudio comparativo in vitro del efecto antibacteriano del extracto de *Allium sativum* (Ajo) blanco, purpura y clorhexidina al 0.12 % sobre cepas de *Streptococcus mutans*. [Tesis]. Universidad Central del Ecuador, 2015. [Citado 27 de noviembre del 2018]. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/5335/1/T-UCE-0015-187.pdf>
26. Siyanbola T, Sasidhar K, Anjaneyulu B. Recubrimientos híbridos de ZnO modificados con poli (éster amida uretano) antimicrobianos y anticorrosivos a partir de aceite de semilla de *Thevetia peruviana*. 2013 48: 8215. [Citado 27 de noviembre

del 2018]. disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10853-013-7633-x#citeas>

27. Torres N. Actualización sobre intoxicación con *Thevetia peruviana*. Retel Editorial. 2003.[Citado 27 de noviembre de 2018].Disponible en:http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19001.pdf
28. Ortiz F. Efecto antibacteriano de la musa *Acuminata* (plátano) frente al *enterococcus faecalis* ATCC 29212 - in vitro. Universidad Privada Antenor Orrego. 2018. [Citado 27 de noviembre,2018].Disponible en: <http://repositorio.upao.edu.pe/handle/upaorep/4037>
29. Sánchez M. “Efecto antibacteriano “in vitro” del extracto etanólico de la semilla de persea americana (palta) sobre enterococcus faecalis atcc29212”. Universidad Nacional de Trujillo.2016.[Citado 28 de noviembre del 2018].Disponible en:http://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNIT_2ce7ea8d558c609824f7d8bf8212c428
30. Quiñones D, Meiji S, Joao M, Noriko U, Kobayashi N. Enterococcus resistente a la vancomicina en Cuba: impacto clínico terapéutico y epidemiología molecular. Convención Internacional de Salud, Cuba Salud.2018. [Citado 29 de noviembre de 2018]. Disponible en:<http://www.convencionsalud2018.sld.cu/index.php/convencionsalud/2018/paper/viewFile/1863/681>

31. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos: Método de difusión con discos. Version 2.1. [Internet]. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2012. [Citado 30 noviembre 2018]. Disponible en: <http://coesantseimc.org/documents/Descripci%C3%B3n%20del%20m%C3%A9todo%20de%20disco.pdf>
32. Ríos M, Flores J. Actividad antibacteriana de *Chamaesyce thymifolia* frente a *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*; por el método de macrodilución y difusión en agar. [Tesis]. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; 2016. [Citado 20 junio 2018]. Disponible en: http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/3854/Marcos_Tesis_Titulo_2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y
33. Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote. Código de Ética para La Investigación. Versión 001. Aprobado por acuerdo del Consejo Universitario con Resolución N° 0108-2016-CU-Uladech Católica, de fecha 25 de enero de 2016. [Citado 29 de noviembre del 2018]. Disponible en: <https://www.uladech.edu.pe/images/stories/universidad/documentos/2016/codigodeeticaparalainvestigacionv001.pdf>
34. Sen A, Dhavan P, Shukla KK, Singh S, Tejavathi G. Analysis of IR, NMR and Antimicrobial Activity of β - Sitosterol Isolated from *Momordica charantia*. *Sci Secure J Biotech*. 2012. [Citado 29 de noviembre del 2018]. Disponible en: <file:///C:/Users/Administrador/Downloads/SSJBt-12-10420Sen.pdf>

35. Hernández J, Zaragoza A, López G, Peláez A, Olmedo A, Rivero N. Actividad antibacteriana y sobre nematodos gastrointestinales de metabolitos secundarios vegetales: enfoque en Medicina Veterinaria. *Abanico vet.* [revista en la Internet]. [Citado 26 de noviembre del 2018];8(1):1427. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S244861322018000100014&lng=s.

ANEXOS:

Anexo 01: Prueba de CHAPIRO – WILKS para determinar la normalidad de los grupos de estudio.

Pruebas de normalidad a Corrección de la significación de Lilliefors

| | Kolmogorov-Smirnov(a) | | | Shapiro-Wilk | | |
|-----|-----------------------|----|------|--------------|----|------|
| | Estadístico | gl | Sig. | Estadístico | Gl | Sig. |
| H24 | .257 | 20 | .001 | .872 | 20 | .130 |

Fuente: paquete estadístico spss 20.0 sobre los datos obtenidos en la investigación

Interpretación: Al realizar el análisis de los datos obtenidos en este trabajo de investigación, Según el anexo 01, se determinó los grupos de estudio mediante la prueba de CHAPIRO – WILKS, teniendo en cuenta el número de muestra utilizadas en la investigación, menores de 30 datos. En la tabla se observa la significancia el valor $P > 0.05$, por lo que los datos provienen de una distribución normal, en la cual se hace uso de pruebas paramétricas como ANOVA y T-STUDENTS dentro de la investigación.

Anexo 02: Datos válidos según criterio de normalidad del efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* frente a *Enterococcus faecalis*.

Resumen del procesamiento de los casos

| | Casos | | | | | |
|-----|---------|------------|----------|------------|-------|------------|
| | Válidos | | Perdidos | | Total | |
| | N | Porcentaje | N | Porcentaje | N | Porcentaje |
| H24 | 20 | 100.0% | 0 | .0% | 20 | 100.0% |

Fuente: paquete estadístico spss 20.0 sobre los datos obtenidos en la investigación

Interpretación: Según el anexo 02, se observa que el 100% de los datos que se obtuvieron en la investigación, si cumple el supuesto de la normalidad, donde todos los datos son válidos y no se observan datos perdidos.

Anexo 03: Halos de inhibición en mm. Control estándar (Levofloxacino) frente a *enterococcus faecalis* a 24 horas

| | Estándar farmacológico (Levofloxacino) | | | | Valor promedio | Desviación estándar |
|----------|--|----|----|----|-------------------|------------------------|
| PLACA 01 | 10 | 11 | 10 | 9 | 10 | 0.816496581 |
| PLACA 02 | 9 | 10 | 11 | 10 | 10 | 0.816496581 |
| PLACA 03 | 11 | 10 | 10 | 14 | 11.25 | 1.892969449 |
| PLACA 04 | 10 | 10 | 9 | 11 | 10 | 0.816496581 |
| PLACA 05 | 9 | 10 | 10 | 10 | 9.75 | 0.5 |
| | | | | | 10.2 | 0.596866819 |

Fuente: Ficha de recolección de datos de la investigación

Anexo 04: Halos de inhibición en mm. Grupo experimental 01 frente a *enterococcus faecalis* a 24 horas

| | Exp.1 (extracto etanólico de Thevetia peruviana (Pers) Schum) 20% | | | | Valor promedio | Desviación estándar |
|----------|---|----|----|----|-------------------|------------------------|
| PLACA 01 | 11 | 11 | 9 | 9 | 10 | 1.154700538 |
| PLACA 02 | 11 | 10 | 9 | 9 | 9.75 | 0.957427108 |
| PLACA 03 | 8 | 10 | 9 | 9 | 9 | 0.816496581 |
| PLACA 04 | 9 | 9 | 10 | 10 | 9.5 | 0.577350269 |
| PLACA 05 | 9 | 10 | 9 | 10 | 9.5 | 0.577350269 |
| | | | | | 9.55 | 0.370809924 |

Fuente: Ficha de recolección de datos de la investigación

Anexo 05: Halos de inhibición en mm. Grupo experimental 02 frente a *enterococcus faecalis* a 24 horas

| | Exp.2 (extracto etanólico de Thevetia peruviana (Pers) Schum) al 50% | | | | valor promedio | Desviación. estándar |
|----------|---|----|----|----|----------------|----------------------|
| PLACA 01 | 11 | 11 | 10 | 10 | 10.5 | 0.57735027 |
| PLACA 02 | 11 | 11 | 12 | 12 | 11.5 | 0.57735027 |
| PLACA 03 | 10 | 11 | 11 | 11 | 10.75 | 0.5 |
| PLACA 04 | 10 | 11 | 11 | 10 | 10.5 | 0.57735027 |
| PLACA 05 | 11 | 10 | 11 | 10 | 10.5 | 0.57735027 |
| | | | | | 10.75 | 0.4330127 |

Fuente: ficha de recolección de datos de la investigación

Figura 01. Certificación taxonómica de la planta *Thevetia peruviana* (Pers) Schum (maichil)



Figura 02. Investigador realizando la selección de hojas de *Thevetia peruviana* (Pers) Schum (maichil) utilizado para la elaboración del extracto.



Figura 03. Investigador realizando molienda y tamización de hojas de *Thevetia peruviana* (Pers) Schum (maichil) para la elaboración del extracto.



Figura 04. Extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* en proceso de Maceración.



Figura 05. Investigador realizando aplicación del extracto etanólico de las hojas de *Thevetia peruviana* en las placas que contienen cultivos de *Enterococcus faecalis*.



Figura 05. Medición de los halos de inhibición

