



Universidad Norbert Wiener

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

**ESCUELA ACADEMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUIMICA**

**“Efecto Antagónico *in vitro* de *Lactobacillus spp.*
aislados de ‘tocosh’- *Solanum sp.*, proveniente de
Huánuco, frente a bacterias enteropatógenas”**

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

Presentado por:

Br. Gutiérrez Rodríguez, Ivette Evelyn

Asesor:

Dr. Félix Veliz, Luis Miguel

Co-Asesor:

Dr. Gavián Chávez, Ronnie Gustavo

Lima - Perú

2019

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi padre Rolando Blanco Valerio, a mi madre Alejandrina Rodríguez Chaupe, a mis hijas Ariana y Samantha que son mi motivación principal y la razón para seguir esforzándome cada día en el logro de mis metas.

Agradecimientos:

Agradezco a mi padre celestial por darme sabiduría y base de mi fe para continuar y no decaer a pesar de cada tropiezo que tuve.

Al Instituto Nacional de Salud por permitirme desarrollar esta investigación dentro del Laboratorio de Enteropatógenos, en su apoyo a la formación de investigadores.

Así mismo a mi Co-Asesor al PhD. Ronnie Gavilán Chávez por su aporte valioso y amplio conocimiento en microbiología y biología molecular además de guiarme durante mi estancia en el laboratorio y enseñarme que la investigación es dedicación, paciencia cuyo objetivo es el bien para la comunidad.

También agradecer a una persona tan especial que contribuyo en el diseño y ejecución del proyecto la Mg. Ana María Chávez, gracias por su paciencia, exigencia constante.

Al Dr. Luis Miguel Félix por su aporte, dedicación y amplio conocimiento en la revisión de la tesis.

INDICE GENERAL

| | Pág. |
|---|------|
| INDICE GENERAL | iv |
| INDICE DE TABLAS | vi |
| INDICE DE FIGURAS | vii |
| INDICE DE ANEXOS | viii |
| RESUMEN | ix |
| ABSTRACT | x |
| I. INTRODUCCION | 1 |
| - Situación problemática | 1 |
| - Marco teórico referencial | 3 |
| - Estudios antecedentes | 15 |
| - Importancia y justificación de la investigación | 22 |
| - Objetivo del estudio | 23 |
| - Hipótesis de investigación | 23 |
| II. MATERIALES Y METODOS | 24 |
| 2.1. Enfoque y Diseño | 24 |
| 2.2. Población, muestra y muestreo | 24 |
| 2.3. Variables de estudio | 25 |
| 2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos | 25 |
| 2.5. Proceso de recolección de datos | 31 |
| 2.5.1. Autorización y coordinaciones previas para la recolección de datos | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 2.5.2. Aplicación de instrumentos de recolección de datos | 31 |
| 2.6. Métodos de análisis estadístico | 32 |
| 2.7. Aspectos bioéticos | 32 |
| III. RESULTADOS | 33 |
| IV. DISCUSIÓN | 52 |
| 4.1. Discusiones | 52 |
| 4.2. Conclusiones | 56 |
| 4.3. Recomendaciones | 57 |
| CITAS Y REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS | 58 |
| ANEXOS | 67 |

INDICE DE TABLAS

| | Pág. |
|---|------|
| Tabla 1. Cepas patógenas referenciales del Instituto Nacional de Salud. | 26 |
| Tabla 2. Resultados correspondientes a la identificación microscópica. | 33 |
| Tabla 3. Resultados del efecto antagónico de cepas de <i>Lactobacillus spp.</i> frente a enteropatógenos por el método de Burkholder. | 36 |
| Tabla 4. Resultados de la comparación del efecto antagónico de <i>Lactobacillus spp.</i> aisladas de 'tocosh'- <i>Solanum sp.</i> in vitro frente a bacterias enteropatógenas, por el método de Burkholder. | 40 |
| Tabla 5. Prueba de T de student del efecto antagónico de <i>Lactobacillus spp.</i> aisladas de 'tocosh'- <i>Solanum sp.</i> | 42 |
| Tabla 6. Resultados del efecto antagónico de cepas de <i>Lactobacillus spp.</i> frente a enteropatógenos por el método modificado de difusión en pozos - evaluación de producción de metabolitos extracelulares. | 43 |
| Tabla 7. Resultados de la comparación del efecto antagónico de <i>Lactobacillus spp.</i> aisladas de 'tocosh'- <i>Solanum sp.</i> in vitro frente a bacterias enteropatógenas, método del sobrenadante. | 46 |
| Tabla 8. Prueba de T de student del efecto antagónico de <i>Lactobacillus spp.</i> aisladas de 'tocosh'- <i>Solanum sp.</i> in vitro frente a bacterias enteropatógenas, por método del sobrenadante. | 49 |
| Tabla 9. Prueba de t de student del efecto antagónico producido por <i>Lactobacillus spp.</i> aisladas de 'tocosh'- <i>Solanum sp.</i> comparación del método modificado de difusión Burkholder y el método del sobrenadante libre de células. | 50 |

INDICE DE FIGURAS

| | Pág. |
|---|------|
| Figura 1. Mecanismo de fermentación de carbohidratos. | 5 |
| Figura 2. Árbol filogenético de los miembros del grupo de <i>Lactobacillus</i> , análisis de secuenciación del gen 16S RNA. | 6 |
| Figura 3. Estructura de pared celular de lactobacilos. | 8 |
| Figura 4. Resultado según porcentaje de la identificación microscópica. | 34 |
| Figura 5. Medias de halos de inhibición expresadas en mm, efecto antagónico por método de Burkholder de <i>Lactobacillus spp.</i> frente a <i>Vibrio cholerae</i> 1.457.10 INABA. | 38 |
| Figura 6. Medias de halos de inhibición expresados en mm, efecto antagónico por método de Burkholder de <i>Lactobacillus spp.</i> frente a <i>Salmonella typhi</i> 2.240-16. | 39 |
| Figura 7. Efecto antagónico que presentan las bacterias del género <i>Lactobacillus spp.</i> aisladas de 'tocosh'- <i>Solanum sp.</i> frente a bacterias enteropatógenas; por el método de Burkholder, estadística por grupos. | 41 |
| Figura 8. Medias de halos de inhibición expresados en mm, efecto antagónico por método modificado de difusión en pozos - evaluación de producción de metabolitos extracelulares de <i>Lactobacillus spp.</i> frente a <i>Vibrio cholerae</i> 1.457.10 Inaba. | 45 |
| Figura 9. Medias de halos de inhibición expresados en mm, efecto antagónico por el método de Burkholder de <i>Lactobacillus spp.</i> frente a <i>Salmonella typhi</i> 2.240-16. | 46 |
| Figura 10. Comparación del efecto antagónico de bacterias del género <i>Lactobacillus spp.</i> aisladas de 'tocosh'- <i>Solanum sp. in vitro</i> , frente a bacterias enteropatógenas, método del sobrenadante. | 48 |
| Figura 11. Comparación de medias entre grupos de los métodos modificados de difusión Burkholder y sobrenadante libre de células. | 51 |

INDICE DE ANEXOS

| | Pág. |
|--|------|
| Anexo A. Matriz de consistencia | 68 |
| Anexo B. Operacionalización de variables | 70 |
| Anexo C. Instrumentos de recolección de datos | 71 |
| Anexo D. Instrumento de validación | 75 |
| Anexo E. Dictamen de informe de comité de ética | 76 |
| Anexo F. Evidencias de trabajo de campo | 78 |

RESUMEN

Según la OMS las enfermedades diarreicas (EDAS) son la segunda causa de muerte en niños menores de cinco años a nivel mundial. Desde la época incaica el 'tocosh' es caracterizado por poseer propiedades nutraceuticas. La presente investigación tuvo como **Objetivo:** Evaluar el efecto antagónico de *Lactobacillus spp.* aislados de 'tocosh' - *Solanum sp.* proveniente de Huánuco, frente a bacterias enteropatógenas: *Escherichia coli enteropatógena* (EPEC), *Salmonella typhi*, *Shiguella flexneri* y *Vibrio cholerae* Inaba. **Métodos:** La población fue extraída del tocosh producido en pozos de fermentación ubicados en la provincia de Yarowilca distrito de Obas, las bacterias fueron aisladas en caldo Man Rogosa Sharpe, en anaerobiosis e incubadas por 48 horas; para purificar las cepas de *Lactobacillus spp.* se realizaron las pruebas según el manual de Bergey; en la evaluación del efecto antagónico se emplearon los métodos de Burkholder y el método sobrenadante libre de células (CFS), el ensayo se realizó por triplicado a una concentración 2 de la escala de Mac Farland de bacterias lácticas incubándose en aerobiosis a 37°C por 18 horas. **Resultados:** De un total de 223 muestras 44 cepas presentaron características microscópicas y bioquímicas compatibles con *Lactobacillus spp.*, las medias de halos de inhibición formados por el método de Burkholder frente a *Vibrio cholerae* Inaba 1.457.10 (11,36 mm), *Salmonella typhi* 2.240-16 (9,86 mm), *Shiguella flexneri* WHO SH-15.3 (6 mm), *Escherichia coli enteropatógena* (EPEC) 2.734-18 (6mm) y por el método sobrenadante libre de células se obtuvo medias de *Vibrio cholerae* Inaba 1.457.10 (13,62 mm), *Salmonella typhi* 2.240-16 (10,52 mm), *Shiguella flexneri* WHO SH-15.3 (6,33 mm), *Escherichia coli enteropatógena* (EPEC) 2.734-18 (6,19 mm). En la comparación de grupos se determinó que el mayor efecto se obtuvo frente a *Vibrio cholerae* Inaba por ambos métodos. **Conclusiones:** Se determinó que *Lactobacillus spp.* aislados de 'tocosh' presentó efecto antagónico frente a bacterias enteropatógenas referenciales causantes de EDAS.

Palabras clave: 'tocosh' - *Solanum sp.*, *Lactobacillus spp.*, Enteropatógenos, sobrenadante libre de células, Método Burkholder

ABSTRACT

According to the WHO, diarrheal diseases (EDAS) are the second leading cause of death in children under five years of age worldwide. From the Inca period the 'tocosh' is characterized by having nutraceutical properties. The present investigation had as **Objective:** To evaluate the antagonistic effect of *Lactobacillus spp.* isolated from 'tocosh' - *Solanum sp.* from Huánuco, against enteropathogenic bacteria: *Escherichia coli enteropathogen* (EPEC), *Salmonella typhi*, *Shiguella flexneri* and *Vibrio cholerae* Inaba. **Methods:** The population was extracted from the tocosh produced in fermentation wells located in the province of Yarowilca district of Obas, the bacteria were isolated in Man Rogosa Sharpe broth, in anaerobiosis and incubated for 48 hours; To purify the *Lactobacillus spp.* strains, tests were performed according to the Bergey manual; Burkholder methods and the cell-free supernatant method (CFS) were used in the evaluation of the antagonistic effect, the assay was performed in triplicate at a concentration of 2 of the Mac Farland scale of lactic bacteria incubating in aerobiosis at 37° C for 18 hours **Results:** Of a total of 223 samples, 44 strains had microscopic and biochemical characteristics compatible with *Lactobacillus spp.*, The means of inhibition halos formed by the Burkholder method versus *Vibrio cholerae* Inaba 1,457.10 (11,36 mm), *Salmonella typhi* 2.240-16 (9,86 mm), *Shiguella flexneri* WHO SH-15.3 (6 mm), *enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) 2.734-18 (6mm) and by means of the cell-free supernatant method averages of *Vibrio cholerae* Inaba 1.457.10 were obtained (13,62 mm), *Salmonella typhi* 2.240-16 (10,52 mm), *Shiguella flexneri* WHO SH-15.3 (6,33 mm), *enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) 2.734-18 (6,19 mm). In the comparison of groups, it was determined that the greatest effect was obtained against *Vibrio cholerae* Inaba by both methods. **Conclusions:** It was determined that *Lactobacillus spp.* isolated from 'tocosh' had an antagonistic effect against EDS causing enteropathogenic bacteria.

Keywords: 'tocosh' - *Solanum sp.*, *Lactobacillus spp.*, Enteropathogens, cell-free supernatant, Burkholder Method.