

# UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



## FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

### “EXTRACTO ETANÓLICO DE *Desmodium molliculum* (Kunth) DC.Y SU EFECTO ANTIBACTERIANO SOBRE CULTIVOS DE *Escherichia coli*, ESTUDIOS IN VITRO”

Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico

Fecha de Sustentación: 30 de Enero del 2018

TESISTAS:

**Bach. NURIA CARLA OLIVERA TORRES**

**Bach. PAMELA PRINCIPE ELESCANO**

ASESOR(a):

**Mg. Q.F. ANGÉLICA MINAYA GALARRETA**

**LIMA - PERÚ**

**2018**

**TÍTULO:**

**“EXTRACTO ETANÓLICO DE *Desmodium molliculum* (Kunth) DC.Y  
SU EFECTO ANTIBACTERIANO SOBRE CULTIVOS DE *Escherichia  
coli*, ESTUDIOS IN VITRO”**

## **DEDICATORIA**

*El presente trabajo es dedicado a Dios, por darme la fortaleza de seguir luchando por mis metas y a mi angelita Seferina, abuelita sé que siempre me cuidas y proteges.*

*A mis padres y hermano, por depositar su confianza en mí, por sus sabios consejos y su apoyo incondicional, son mis pilares para enfrentar nuevos retos.*

*A mi enamorado Diego, por estar conmigo en todo momento brindándome la fuerza y motivación para no rendirme nunca.*

*A mis primas Katherin y Jheraldine, por ser las mejores hermanas, amigas y confidentes que pueda haberme dado la vida.*

**Nuria**

*El presente trabajo es dedicado a Dios, por darme la fortaleza de seguir luchando por mis metas*

*A mi mamá Gabina por depositar su confianza en mí, por sus sabios consejos y su apoyo incondicional y a mi angelito Jorge que desde el cielo me guía.*

*A mi novio Daniel, por estar conmigo en todo momento brindándome la fuerza para nunca rendirme.*

**Pamela**

## **AGRADECIMIENTO**

Agradecemos a la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, por brindarnos la oportunidad de desarrollar nuestras capacidades y adquirir nuevos conocimientos, formarnos profesionalmente; así mismo a todos los docentes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica que nos brindaron sus sabios conocimientos y consejos.

A nuestra asesora de Tesis Mg. Angélica Minaya por su valioso apoyo, sirviendo de guía en la orientación, corrección y contribución para la culminación de este trabajo.

A todos nuestros amigos y personas maravillosas que hemos conocido a lo largo de esta etapa universitaria, Gracias por su amistad y por acompañarnos durante toda la carrera profesional.

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación, se evaluó el extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. “Manayupa” y su influencia en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro. La muestra fue recolectada en el distrito de Ocotuna, departamento de Junín, Perú. Se determinó los metabolitos secundarios mediante la marcha fitoquímica; se obtuvo: alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas aminoácidos y Cumarinas. Se realizó la cromatografía del extracto etanólico. El microorganismo utilizado fue cepa *Escherichia coli* ATCC 25922. La actividad antibacteriana se evaluó mediante el método de difusión en agar (Método de Kirby- Bauer) .Las concentraciones aplicadas del extracto de *Desmodium molliculum* (Kunt) DC, fueron de 25%,50%,75% y 100%. Demostrando que el extracto etanólico a una concentración de 25% y 50% no posee actividad antibacteriana, Mientras que a 75% y 100% se evidenció actividad antibacteriana significativa. A dichas concentraciones presentó mejores resultados en la medición de los halos de inhibición a lo largo de todos los momentos de tiempo comparado con el control positivo. En las condiciones experimentales realizadas se demostró que el extracto etanólico en las concentraciones de 75% y 100% posee efecto antibacteriano e influye en los cultivos de *Escherichia coli*.

**Palabras Clave:** *Desmodium molliculum* (Kunth) DC “Manayupa”; Efecto antibacteriano; Efecto inhibitorio relativo (PEIR).

## ABSTRACT

In the research work we present, we tested the ethanolic extract of *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. "Manayupa" and its influence on the antibacterial effect in the culture of *Escherichia coli*, in vitro studies. The sample was collected in the district of Ocortuna, Junin in Peru. Secondary metabolites were analyzed by the phytochemical tracking getting alkaloids, flavonoids, tannins, saponins, amino acids and coumarins. Chromatography of the ethanolic extract was carried out. The *Escherichia coli* strain ATCC 25922 was the microorganism used in this process. The antibacterial activity was tested by the Agar disk diffusion (Kirby-Bauer method). The concentrations of *Desmodium molliculum* extract (Kunt) DC were 25%, 50%, 75% and 100% and the results of the ethanolic extract on a 25% and 50% concentration did not produce antibacterial activity. However, the outcome was quite different on concentrations of 75% and 100%; those concentrations showed better results with the zone of inhibition test through all the moments of compared time with the positive control. On the experimental conditions which were done; it has been proved that the ethanolic extract on 75% and 100% concentrations had an antibacterial effect and also had an influence on the culture of *Escherichia coli*.

**Keywords:** *Desmodium molliculum* (Kunth) DC, "Manayupa", antibacterial effect, relative inhibitory effect (PEIR).

## ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria	
Agradecimiento	
Resumen	
Abstract	
Introducción .....	1
<b>CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>3</b>
1.1 Descripción de la realidad problemática .....	3
1.2 Formulación del problema .....	4
1.2.1 Problema general.....	4
1.2.2 Problemas específicos .....	4
1.3 Objetivos .....	5
1.3.1 Objetivo general.....	5
1.3.2 Objetivos específicos .....	5
1.4 Justificación e importancia del estudio .....	6
<b>CAPITULO II: MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>7</b>
2.1 Antecedentes del estudio .....	7
2.1.1 Antecedentes nacionales .....	7
2.1.2 Antecedentes extranjeros .....	8
2.2 Bases teóricas.....	10
2.2.1 <i>Desmodium molliculum</i> .....	10
2.2.1.1 Clasificación Taxonómica.....	10
2.2.1.2 Descripción botánica.....	11
2.2.1.3 Hábitat.....	12
2.2.1.4 Distribución geográfica.....	12
2.2.1.5 Composición química.....	13
2.2.1.6 Usos terapéuticos.....	18
2.2.1.7 Acción farmacológica.....	18
2.2.2 Métodos de extracción .....	19
2.2.2.1 Maceración.....	19

2.2.2.2 Percolación.....	20
2.2.2.3 Extracción por arrastre con vapor de agua.....	20
2.2.3 Tamizaje fitoquímico.....	20
2.2.4 Efecto antibacteriano.....	20
2.2.4.1 Tipos de efecto bacteriano.....	21
2.2.4.2 Blanco de acción de los antibacterianos.....	21
2.2.5 Infecciones del tracto urinario (ITU).....	22
2.2.5.1 Clasificación de las infecciones del tracto urinario.....	22
2.2.5.2 Tratamiento.....	24
2.2.6 Bacteria <i>Escherichia coli</i> .....	26
2.2.6.1 Clasificación Científica.....	27
2.2.6.2 Patogenia.....	27
2.2.6.3 Tratamiento.....	29
2.2.6.4 Epidemiología y resistencia bacteriana.....	30
2.2.7 Método Kirby - Bauer.....	30
2.3 Hipótesis .....	31
2.3.1 Hipótesis general .....	31
2.3.2 Hipótesis específica .....	31
2.4 Variables.....	32
2.4.1 Tabla de operacionalización de variables.....	32
2.5 Marco conceptual .....	32
<b>CAPÍTULO III. MÉTODO .....</b>	<b>35</b>
3.1 Tipo de estudio.....	35
3.2 Diseño a utilizar.....	35
3.3 Población .....	36
3.3.1 Población bacteriana.....	36
3.3.2 Población vegetal.....	36
3.4 Muestra .....	36
3.4.1 Muestra bacteriana .....	36

3.4.2 Muestra vegetal .....	36
3.5 Técnicas e instrumentos de recolección de datos .....	36
3.5.1 Materiales, reactivos y equipos de laboratorio .....	36
3.5.2 Procedimiento experimental.....	39
3.5.2.1 Recolección y autenticación botánica.....	39
3.5.2.2 Preparación del material vegetal.....	39
3.5.2.3 Obtención del extracto etanólico.....	40
3.5.2.4 Tamizaje fitoquímico.....	40
3.5.2.5 Guía observacional para recolección de datos.....	43
3.5.2.6 Cromatografía en capa fina.....	48
3.5.2.7 Ensayo microbiológico.....	48
3.6 Procesamiento de datos.....	54
<b>CAPITULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
4.1 Presentación de resultados .....	55
4.2 Contratación de hipótesis.....	56
4.3 Discusión de los resultados.....	77
<b>CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>80</b>
5.1 Conclusiones.....	80
5.2 Recomendaciones.....	80
Referencias bibliográficas.....	82
<b>ANEXOS.....</b>	<b>87</b>
Anexo 1. Matriz de Consistencia.....	88
Anexo 2. Identificación taxonómica de <i>Desmodium molliculum</i> .....	90
Anexo 3. Identificación de la bacteria.....	91
Anexo 4. Evaluación de la actividad antibacteriana mediante el método de Kirby-Bauer...93	
Foto N° 1. Preparación del material vegetal <i>Desmodium molliculum</i> .....	94
Foto N° 2. Tamizaje fitoquímico: identificación de metabolitos secundarios.....	95
Foto N° 3. Cromatografía en capa fina del extracto etanólico de <i>Desmodium Molliculum</i> ..98	
Foto N° 4. Discos de sensibilidad L y D Insumed. SAC.....	98
Foto N° 5. Preparación del estándar (0,5 mc. Farland) para el inóculo.....	99

Foto N° 6. Aplicación de los discos.....	99
Foto N° 7. Incubación.....	100
Foto N° 8. Medición de los halos de inhibición por efecto del extracto etanólico.....	100

### Índice de tablas

Tabla 1. Composición química según estudios realizados.....	14
Tabla 2. Factores de riesgo para el desarrollo de ITU.....	24
Tabla 3. Infección del tracto urinario (ITU) tratamiento en el adulto.....	25
Tabla 4. Clasificación de acuerdo a sus mecanismos de virulencia.....	27
Tabla 5. Interpretación de la cantidad de metabolitos presentes.....	55
Tabla 6. Lectura de la investigación del tamizaje fitoquímico del extracto.....	55
Tabla 7. Resultados cromatografía del extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> .....	57
Tabla 8. Interpretación del crecimiento bacteriano según el porcentaje de efectividad de la concentración del extracto etanólico.....	58
Tabla 9. Lectura de porcentaje de actividad antibacteriana sobre <i>Escherichia Coli</i> a las 24, 48 y 72 horas.....	59
Tabla 10. Lectura de formación de los halos de inhibición según el porcentaje de efectividad de la concentración del extracto etanólico.....	61
Tabla 11. Porcentaje de inhibición del extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> DC. según concentración. (Expresados en %)......	65
Tabla 12. Análisis de la varianza (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por Extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> Sobre cultivos de <i>Escherichia coli</i> a las 24h.....	66
Tabla 13. Análisis de la varianza (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por Extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> (Kunth) DC. Sobre cultivos de <i>Escherichia coli</i> a las 48h.....	67

Tabla 14. Análisis de la varianza (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por Extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> (Kunth) DC. Sobre cultivos de <i>Escherichia coli</i> a las 72h.....	68
Tabla 15. Contrastes post hoc y comparaciones múltiples (ANOVA) de los efectos entre Los Halos de inhibición por extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> (Kunth) DC. Sobre cultivos de <i>Escherichia coli</i> a las 24h.....	71
Tabla 16. Contrastes post hoc y comparaciones múltiples (ANOVA) de los efectos entre Los Halos de inhibición por extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> (Kunth) DC. Sobre cultivos de <i>Escherichia coli</i> a las 48h.....	72
Tabla 17. Contrastes post hoc y comparaciones múltiples (ANOVA) de los efectos entre Los Halos de inhibición por extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> (Kunth) DC. Sobre cultivos de <i>Escherichia coli</i> a las 72h.....	74

### Índice de figuras

Figura 1. <i>Desmodium molliculum</i> .....	11
Figura 2. Distribución geográfica <i>Desmodium molliculum</i> .....	12
Figura 3. Estructura Química de Tryptamina.....	15
Figura 4. Flavonoides. Estructura Básica y Tipo.....	15
Figura 5: Estructura Química: Astragalina y Quercetina.....	16
Figura 6. Estructura Química de un tanino (Ácido Gálico).....	16
Figura 7. Esqueleto Saponina Esteroidal.....	17
Figura 8. Métodos de extracción.....	19
Figura 9. Tipos de AB y su blanco.....	21
Figura 10. Morfología bacteria <i>Escherichia Coli</i> .....	26
Figura 11. Cromatografía ascendente.....	48
Figura 12. Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar.....	52

## Índice de gráficos

Grafico 1. Porcentaje de efecto inhibitorio relativo de la Amikacina vs. El extracto etanólico (100%).....	64
Grafico 2. Porcentaje de efecto inhibitorio relativo del cloranfenicol vs. El extracto etanólico (100%).....	64
Grafico 3. Lectura de formación de los halos de inhibición según el porcentaje de efectividad de la concentración del extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> (Kunth) DC al 75 % y 100% vs Amikacina (MK) a las 24, 48, y 72h.....	69
Grafico 4. Lectura de formación de los halos de inhibición según el porcentaje de efectividad de la concentración del extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> (Kunth) dc al 75 % y 100% vs cloranfenicol (c) a las 24, 48, y 72h.....	69

## Índice de cuadros

Cuadro1.Prueba de Solubilidad.....	43
Cuadro2.Presencia de carbohidratos Generales.....	43
Cuadro3.Presencia de Carbohidratos Reductores.....	44
Cuadro4.Presencia de Metabolito Secundarios.....	44
Cuadro5.Presencia de Compuestos Fenólicos.....	45
Cuadro6.Presencia de Cumarinas.....	45
Cuadro7.Presencia de Taninos.....	46
Cuadro8.Presencia de Alcaloides.....	46
Cuadro9.Presencia de Aminoácidos.....	47
Cuadro10.Presencia de Saponinas.....	47
Cuadro11.Fórmula para la Determinación del Porcentaje de Efecto Inhibitorio Relativo (PEIR).....	53
Cuadro12.Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición.....	53



## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas han estado presentes a lo largo de la historia, produciendo estragos en la población. En la actualidad sigue siendo una realidad latente.<sup>35</sup> a causa de la proliferación y casos de resistencia bacteriana de microorganismos que sufren cambios al verse expuestos a los antimicrobianos (antibióticos, antifúngicos, antivíricos) Como consecuencia, los fármacos se tornan ineficaces y las infecciones perduran en el organismo<sup>15</sup>, lo que eleva el riesgo de contagio. Los pacientes farmacorresistentes corren mayor riesgo clínico hasta el punto de producir la muerte.<sup>15</sup> Debido a esto se buscan fuentes naturales que posean componentes con actividad antibacteriana para el desarrollo de nuevos fármacos.

Nuestro país no es ajeno a este problema, “El Perú está interesado en la investigación de los principios activos y de la actividad farmacológica de la biodiversidad existente en nuestros diferentes biotopos tropicales”.<sup>42</sup> Una de estas es la especie *Desmodium molliculum*, utilizada ancestralmente por nuestros nativos como diurética, antiinflamatoria y depurativa. Ha sido estudiada e investigada durante estos últimos quince años. En nuestro país Bonilla et al., publicaron en 2002 “Evaluación Fitoquímica y Actividad Biológica de *Desmodium molliculum* (H.B.K.) D.C. dando como resultado la presencia de metabolitos activos como flavonoides, esteroides y/o triterpenos<sup>2</sup>. Demostrando así su relación con los usos tradicionales de los pueblos nativos en problemas de inflamación<sup>2</sup>. En el 2015, Quito – Ecuador, John Landeta Maldonado, Hace mención que Los metabolitos secundarios que se creen responsables de la actividad antibacteriana de esta especie son: alcaloides, esteroides, flavonoides. Obteniendo como resultado la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* siendo el extracto de *Desmodium molliculum* un 96 % tan efectiva como la Dicloxacilina medicamento con el que realizó la comparación. Mientras que la prueba in vivo confirmo un gran avance en la curación de las heridas infectadas con *Staphylococcus aureus* en el lomo de los ratones <sup>4</sup>.

También en el 2015, Riobamba, Ecuador Alexis Salazar Toaquiza, presenta “Estudio Fitoquímico del Extracto Etanólico *Desmodium adscendens*” y Elabora una Técnica

de Cuantificación del Metabolito de mayor presencia, siendo esta del mismo género que *Desmodium molliculum*. Reporto que en la prueba fitoquímica, el extracto presento alto porcentaje de Terpenos, Flavonoides y Taninos.

Teniendo en cuenta los diferentes estudios que han sido realizados se podría difundir aún más las propiedades que posee la especie *Desmodium molliculum* en nuestro país para la elaboración de nuevos fármacos<sup>9</sup>, desarrollando programas que fomenten el uso adecuado de estos recursos terapéuticos ancestrales y sean de utilidad para que en un futuro se aminoren los casos de enfermedades farmacorresistentes. En el presente trabajo de investigación presentamos los resultados obtenidos del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* que permiten su uso como agente antibacteriano frente a bacterias patógenas como *Escherichia coli*.

## CAPÍTULO I. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1 DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

La resistencia bacteriana es consecuencia de la evolución bacteriana. *“aquellas bacterias que tengan una mutación que les permita sobrevivir se reproducirán. Ellas pasarán este rasgo genético a su descendencia, que será una generación totalmente resistente”* <sup>4</sup>. *E. coli* es la bacteria anaerobia más abundante de la flora intestinal; registrando un aproximado de 630 millones de casos de infecciones gastrointestinales en el mundo y entre 5 a 6 millones de muertes al año. También es responsable del 50% de las ITU intrahospitalarias y 90% en pacientes ambulatorios<sup>11</sup>. Debido a la proliferación y casos de resistencia bacteriana de estos microorganismos se busca obtener metabolitos con actividad antibacteriana para el desarrollo de nuevos fármacos.

*“La Asamblea Mundial de la Salud y la Organización Mundial de la Salud, quienes con el proyecto “Salud y Medicina Tradicional” han dado mucho valor a los fitomedicamentos, teniendo en cuenta que la población mundial usa plantas como su fuente primaria de agentes medicinales.”* <sup>10</sup> *“El Perú es uno de los 12 países privilegiados con mayor biodiversidad del planeta. Se calcula que existen alrededor de 250,000 plantas medicinales en los bosques tropicales, 2,000 de las cuales se encuentran en nuestra región amazónica”*<sup>10</sup>. Los pueblos indígenas han tenido durante muchos años contacto con la naturaleza, permitiéndoles conocer las características, propiedades, usos y aplicaciones tradicionales que usan en su pueblo. *“Estos conocimientos serán útiles para la ciencia, la tecnología, la industria y el comercio en general”* <sup>15</sup>, reduciendo costos de investigación, y aumentando posibilidades de un estudio exitoso<sup>15</sup>.

Con el presente trabajo de investigación se pretende contribuir a la solución de este problema de salud pública, evaluando “El extracto etanólico de *Desmodium Molliculum* y su posible efecto antibacteriano sobre cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro.

## 1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

En la actualidad en el Perú no existe una industria que elabore fármacos a base de *Desmodium molliculum* que sean consideradas productos naturales orgánicos. Se ha encontrado que posee propiedades con efecto antiinflamatorio, antibacteriano y depurativo de la sangre en diversas investigaciones las cuales lo convierten en una especia con un gran potencial que podría aprovecharse por la industria farmacéutica atribuyéndole efectos terapéuticos que han sido utilizados en los pueblos nativos y rurales desde tiempos ancestrales. Por lo tanto, la fase experimental que se realizó en este proyecto podrá ser considerada en futuras investigaciones para ser registrado como producto natural en las industrias peruanas.

### 1.2.1 Problema general

- ¿Cómo influye el extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. “Manayupa” en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro?

### 1.2.2 Problemas específicos

- ¿De qué manera la concentración al 25% del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. influye en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro?
- ¿De qué manera la concentración al 50% del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. influye en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro?
- ¿De qué manera la concentración al 75% del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. influye en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro?

- ¿De qué manera la concentración al 100% del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. influye en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro?

### 1.3 OBJETIVOS

#### 1.3.1 Objetivo general

- Determinar si el extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. influye en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro.

#### 1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar si la concentración al 25% del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. influye en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro.
- Determinar si la concentración al 50% del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. influye en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro.
- Determinar si la concentración al 75% del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. influye en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro.
- Determinar si la concentración al 100% del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunt) DC. influye en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro.

#### 1.4 JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

Hoy en día se presentan casos de resistencia bacteriana frente a los fármacos ya utilizados, *“El incremento de enfermedades causadas por microorganismos patógenos resistentes es una preocupación generalizada”*<sup>4</sup>.

El propósito de esta investigación es contribuir con el conocimiento sobre el efecto antibacteriano que poseen las plantas naturales que son una fuente muy útil para la obtención de nuevos principios activos. Se basa en evaluar *“El extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunt) ‘Manayupa’ y su efecto antibacteriano sobre cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro.”* *“En nuestro país Bonilla et al., publicaron un estudio sobre la evaluación fitoquímica y actividad biológica de *Desmodium molliculum*, refiriendo como principales metabolitos activos a los flavonoides”*<sup>2</sup>. y *“Estiguar, J. confirmó la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Desmodium molliculum* (Kunt) DC., en bacteria *Staphylococcus aureus* estudio in vitro siendo un 96 % tan efectiva como la dicloxacilina, “dando como responsables de la actividad antibacteriana de esta especie a principios activos como: alcaloides, esteroides, flavonoides siendo los más abundantes luego del análisis fitoquímico. Quito-Ecuador 2015”*<sup>4</sup>.

*“Los componentes activos identificados en las especies de *Desmodium* son similares, por eso las propiedades farmacológicas de los extractos de diversas especies de plantas de este género se caracterizan por una similitud muy significativa”*<sup>2</sup>. Se busca demostrar la importancia de estos hallazgos que servirán para mejorar el estado de salud de muchos pacientes, aprovechando la biodiversidad de nuestro país. Esto beneficiará a la población, principalmente los pacientes con bajos recursos económicos y captará el interés de la industria farmacéutica hacia esta área<sup>4</sup>. Es conveniente realizar estas investigaciones utilizando modelos in vitro, para mayor certeza de los resultados.

## CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.1 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

Dentro de las investigaciones que se realizó en las diferentes fuentes, se encontraron algunas tesis similares; son las siguientes:

#### 2.1.1 Antecedentes nacionales

**Lozano N, Bonilla P, Arroyo J. (2001)<sup>5</sup>**; Su estudio tuvo como objetivo identificar los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica a fin de corroborar la información etnofarmacológica relacionada al uso medicinal de esta especie. Evaluaron tres muestras de *Desmodium molliculum* (H.B.K) D.C procedentes de Jaén (Cajamarca), Huánuco Y Huancayo (Junín). En los resultados del estudio fitoquímico, se observó que las tres muestras en estudio, poseen abundante cantidad de metabolitos, destacándose los flavonoides. De las evaluaciones del efecto antiinflamatorio, por administración peroral, la muestra de Junín, mostro mayor actividad, cercana a la actividad de la dexametasona. La administración tópica del extracto de la muestra de Cajamarca, mostro mayor actividad antiinflamatoria. Y en el efecto cicatrizante por vía peroral el extracto de la muestra de Junín mostro mayor actividad. El estudio hematológico mostro que los elementos mononucleares (linfocitos, monocitos) estuvieron en mayor cantidad al terminar la evaluación antiinflamatoria subcrónica de 21 días de tratamiento con la muestra de Cajamarca. En su estudio concluyen que la mejor muestra es procedente de Jaén (Cajamarca) ya que posee la mejor actividad biológica evaluada.

**Acero B, Millones D, Ticona I, Torres L. (2012)<sup>7</sup>**; Su estudio tuvo como objetivo investigar el efecto del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* sobre el infiltrado leucocitario en tejido pulmonar y la medición de IgE sérica específica de alérgeno. (Efecto de *Desmodium molliculum* en la inflamación alérgica).

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BALB/c los cuales fueron inducidos mediante inyección intraperitoneal y nebulización con ovoalbúmina. El extracto liofilizado de *Desmodium molliculum* fue administrado por canulación orogástrica durante 7 días una semana después de la última nebulización. Se evaluaron los efectos del extracto sobre la inflamación leucocitaria en cortes de pulmón teñidos con Hematoxilina-eosina y los valores séricos de IgE. Los resultados fueron obtenidos mediante la prueba de Tukey con  $p=0,05$  se obtuvieron valores de diferencia de medias respecto al blanco; para la dosis de 250mg/Kg fue -150,345 (significancia=0,001); para 500mg/Kg, -59,342 (0,019); y para 1000mg/Kg, -89.771 (0,001); la más efectiva fue 500mg/Kg. Se evaluó con la misma prueba diferencia de medias respecto a Dexametasona (2mg/Kg): para control negativo, -158,125 ( $p=0,001$ ); blanco, 66,95 (0,004); y 500mg/Kg, 7,607 (0,998). El infiltrado peribronquial fue similar para el control (+) y dosis de 250 y 500 mg/Kg; en el perivascular destacó la dosis de 500 mg/Kg. En el estudio concluyen que según los valores de IgE e infiltrado peribronquial y perivascular en el pulmón, *Desmodium molliculum* tiene un efecto en la inflamación alérgica, efecto similar al obtenido con dexametasona.

### 2.1.2 Antecedentes extranjeros

**Landeta J. (2015)<sup>4</sup>**; Su estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad antibacteriana de *Desmodium molliculum*. Conocida en la zona de Ayora del Cantón Cayambe como "Treinta Reales", la cual utilizan para tratar enfermedades infecciosas dérmicas. Determino la propiedad antibacteriana del extracto de la planta a la concentración de 250 ppm produciendo la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* siendo un 96 % tan efectiva como la dicloxacilina, medicamento que utilizó para la comparación. Los resultados obtenidos de la investigación in vivo e in vitro fueron satisfactorios. Observando un buen progreso en la curación de las heridas infectadas de *Staphylococcus aureus* después del tratamiento

con el extracto de *Desmodium molliculum*. El estudio concluye que Los metabolitos activos que se creen responsables de la actividad antibacteriana de esta especie son: alcaloides, esteroides y flavonoides.

**Salazar A. (2015)**<sup>9</sup>; Su Investigación tuvo como objetivo realizar el estudio Fitoquímico del Extracto Etanólico de *Desmodium molliculum* y la Elaboración de una Técnica de Cuantificación del Metabolito de Mayor Presencia, El extracto vegetal fue macerado con etanol al 96%, reducido a 200 ml, recuperada la fase líquida para determinar las propiedades físicas, análisis cromatográfico preliminar, la separación en columna cromatográfica y monitoreo de fracciones en Cromatografía de Capa Fina (TLC). Las mezclas repurificadas, hasta pureza cromatográfica, aplicar espectroscopia Infrarrojo (IR) y Ultra Violeta. Los resultados obtenidos fueron un líquido verde oscuro de olor herbario y amargo, con densidad 0.1567g/ml, Los metabolitos identificados fueron flavonoides, alcaloides y saponinas, el estudio concluye que el metabolito con mayor presencia en el extracto etanólico fueron las saponinas.

**Rastogi S, Pandey M, Rawat A. (2011)**<sup>8</sup>; Su estudio tuvo como objetivo revisar y otorgar información sobre los usos tradicionales, investigación fitoquímica, farmacológica y toxicología de *Desmodium gangeticum* y *Desmodium adscendens*. Los resultados obtenidos aproximadamente 25 especies diferentes de *Desmodium* incluyendo *Desmodium gangeticum* y *Desmodium adscendens* se utilizan como medicina tradicional en todo el mundo. La investigación fitoquímica de estas especies ha llevado al aislamiento de alcaloides, pterocarpanos, fosfolípidos, esteroides, flavonas y glucósidos flavonoides, saponinas, triterpenoides, feniletilaminas e indol-3-alquilaminas. Los extractos crudos, las fracciones y los componentes aislados de *Desmodium gangeticum* y *Desmodium adscendens* mostraron un amplio espectro de actividades farmacológicas in vitro e in vivo como antiasmático, relajante de músculo liso, antiinflamatorio, antiulceroso,

antidiabético, antiviral, antioxidante y hepatoprotector. El estudio concluye que *Desmodium gangeticum* y *Desmodium adscendens* posee la capacidad de eliminar radicales libres, actividad anticonceptiva y antileishmaniasis.

## 2.2 BASES TEÓRICAS

Para el conocimiento, análisis y evaluación de las variables se ha consultado las diferentes teorías, definiciones y evaluaciones de literaturas que se citan a continuación:

### 2.2.1 *Desmodium molliculum*

Es una de las especies de mayor uso folklórico en los pueblos indígenas. Ha sido investigada y se ha logrado aislar e identificar sus metabolitos activos como flavonas, glicósidos esteroides, flavonoides y taninos<sup>3</sup>. Comprobando su actividad terapéutica mediante estudios in vivo e in vitro. Es conocida en nuestro país como “Manayupa”, “Runamanayupana”, “pata de perro”, “pega-pega” y en quechua “allcopachaque”. Según Brako et al, el *Desmodium molliculum* (Kunth) DC, presenta los siguientes sinónimos botánicos: *Hedysarum molliculum* HBK; *Meibomia mollicula* (HBK)<sup>2</sup>.

#### 2.2.1.1 Clasificación Taxonómica

Ha sido estudiada y clasificada como *Desmodium molliculum* y tiene la siguiente posición taxonómica, según el sistema de clasificación de Cronquist (1988).

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Fabales

**Familia:** Fabaceae

**Género:** *Desmodium*

**Especie:** *Desmodium molliculum*

Nombre Vulgar: “Manayupa”<sup>3</sup>. Sinonimia. *Desmodium molliculum* (Kunth).DC, *Desmodium molliculum* (H.B.K). DC.

Determinada por: Blgo. Severo Baldeón Malpartida

Según constancia N° 193-USM-2017, posición taxonómica, según sistema de clasificación de Cronquist (1988). (Ver Anexo 2)



**Figura1.** *Desmodium molliculum*. (Kunth)

**Fuente:** Clorofilaandcompany, 2012<sup>3</sup>

### **2.2.1.2 Descripción botánica**

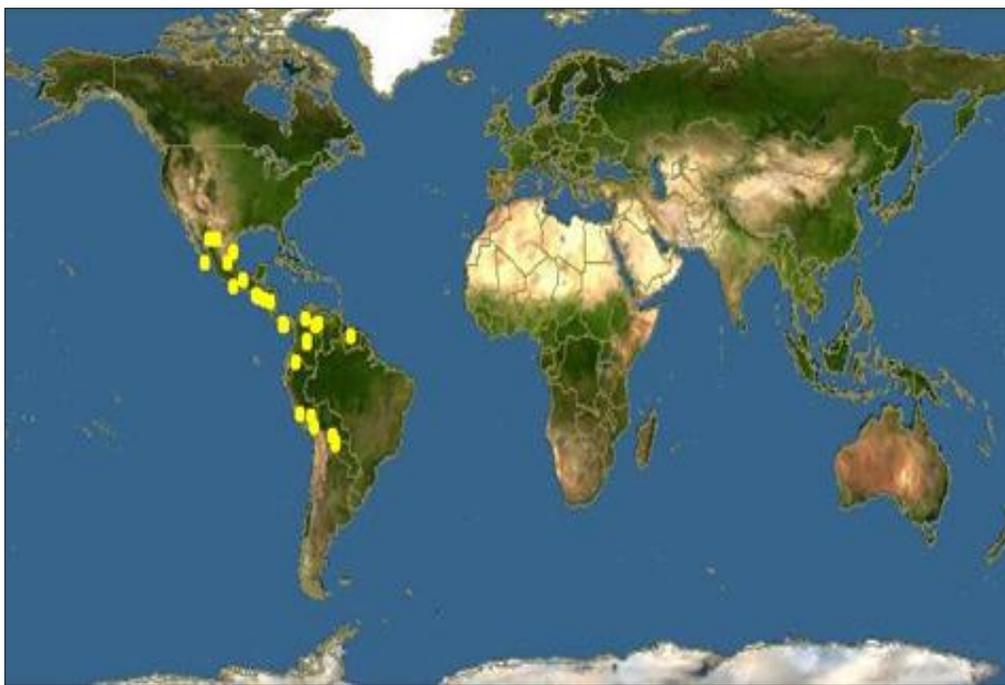
Planta herbácea perenne, rastrera oriunda del Perú. Mide aproximadamente 50cm de altura. Tallo acanalado, ligeramente rugoso, densamente pubescente<sup>1</sup>. Posee hojas compuestas, trifoliadas, estipuladas y pubescentes, sus folíolos son de borde liso<sup>16</sup>. Inflorescencia en racimos, con cáliz acampanado, el color de la corola puede variar desde rosado-violácea o blanca<sup>4</sup>. Con estandarte oblongo-ovado u orbicular. Contienen diez estambres mono a di-adelphos, filamentos unidos en un tubo, cinco más largos que alternan con cinco más cortos, con el vexilar parcialmente soldado a los demás. Ovario lineal, no sésil, estigma pequeño<sup>4</sup>. El fruto es simple, articulado de 4 a 8 secciones, mide de 1 a 3 cm y las semillas aproximadamente 1 mm de largo y 0.7 mm de ancho, con forma de riñón<sup>4</sup>. Raíz abundante, penetra profundamente en el suelo por lo que es resistente a las sequías<sup>16</sup>.

### 2.2.1.3 Hábitat

Se adapta muy bien a suelos fértiles, arenosos y arcillosos con pH desde un mínimo de 4.0. Crece entre los 3200 – 4000 m s. n. m., en campos abiertos, áreas de cultivo. Tolera heladas ligeras, poseen óptimo crecimiento entre 30/25 ° C<sup>4</sup>.

### 2.2.1.4 Distribución geográfica

Género con cerca de 350 especies de las regiones tropicales y subtropicales<sup>9</sup>. La especie *Desmodium molliculum* crece en zonas tropicales del mundo, en el Este de México, Brasil y Asia <sup>4</sup>. En nuestro país crece en forma silvestre en los Andes entre 3200 – 4000 msnm principalmente en los departamentos de Huánuco, Junín, Cuzco, Ayacucho, Lima y Cajamarca<sup>3</sup>. También presente en Ecuador, Guatemala y Venezuela; En Colombia, *Desmodium molliculum* se ha coleccionado en Antioquia, Boyacá, Cauca, Cundinamarca, Nariño, Putumayo y Valle<sup>17</sup>.



**Figura2.** *Desmodium molliculum*

**Fuente:** Discovery Life.

### 2.2.1.5 Composición química

“La composición química de esta planta ha sido poco estudiada en nuestro medio por lo cual, se conocen muy pocos de sus principios activos”<sup>3</sup>. En la rama de la Bioquímica se menciona que posee moléculas orgánicas específicas como los Terpenos, Flavonoides y Alcaloides aisladas o formando un fitocomplejo que le dan la actividad terapéutica<sup>9</sup>.

En Perú Bonilla et al<sup>5</sup>., publicaron un estudio sobre la Evaluación Fitoquímica y Actividad Biológica de *Desmodium molliculum*, dando como resultado “la presencia de aminoácidos, compuestos fenólicos, taninos catéquicos, esteroides y/o triterpenos, quinonas y leucoantocianidinas; destacando como principales metabolitos activos a los flavonoides y esteroides y/o triterpenos”<sup>2</sup>. Demostrando así su relación con los usos tradicionales de los pueblos nativos en problemas de inflamación<sup>5</sup>. La planta deshidratada posee un alto contenido en minerales y proteínas como cobre, fósforo, hierro, magnesio, manganeso, potasio, silicio, azufre, calcio, sodio, zinc<sup>4</sup>. Los metabolitos secundarios encontrados en la mayoría de especies de *Desmodium* presentan similitud, debido a esto la mayoría presenta las mismas propiedades farmacológicas<sup>3</sup>. Se ha encontrado que *Desmodium molliculum*, posee flavonoides, taninos y esteroides, los cuales le aportarían un efecto contraceptivo Sin embargo, hasta el día de hoy no se ha establecido relación entre la dosis y sus efectos para el control de la natalidad<sup>3</sup>.

En Quito, Ecuador Salazar Alexis publicó “él Estudió Fitoquímico del Extracto Etanólico de *Desmodium molliculum*”<sup>9</sup>, dando como resultado presencia de alcaloide (Tryptamina), indica que contiene 4 mg/k, 3 por ciento de ácidos grasos insaturados<sup>9</sup>, Flavonoides (Quercetina, Astragalina), Taninos y Terpenos de tipo saponina que son los metabolitos predominantes del vegetal que fueron determinados por HPLC<sup>9</sup>. El estudio Fitoquímico de Peruvian Nature S&S SAC, determina

la presencia de metabolitos secundarios como: Ácidos orgánicos; Esteroides; Saponinas, que constituyen los metabolitos secundarios característicos de leguminosas y son los principios activos del efecto antiinflamatorio<sup>9</sup>.

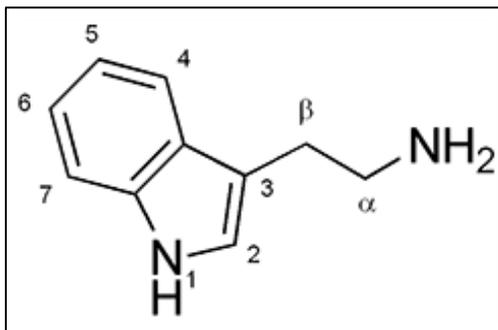
**Tabla 1.** Composición química según estudios realizados.

Flavonoides	Quercetina, Astragalina
Alcaloide	Tryptamina
Esteroides y/o Triterpenos	Saponinas: Dehidrosoyasaponina I, Soyasaponina I, II, II. Soyasaponegol B; (aglicona común de soyasaponinas I-IV)
Quinonas	-
Taninos	Leucoantocianidinas
Compuestos Fenólicos	-
Aminoácidos	-
Proteínas y minerales	cobre, fósforo, hierro, magnesio, manganeso, potasio, silicio, azufre, calcio, sodio, zinc

**Fuente:** Gonzales, 2008 <sup>9</sup>.

#### - **Alcaloides**

Corresponden al grupo más numeroso de metabolitos secundarios, *“La mayoría de alcaloides son sustancias con carácter básico, contienen nitrógeno heterocíclico, son obtenidas de plantas superiores y tienen actividades fisiológicas muy marcadas”* <sup>23</sup>. Se clasifican en; quinoleínos, isoquinoleínos, Pirrolidinos, piperidinos, indólicos, etc. *“Dadas sus características de basicidad, la extracción de alcaloides se lleva a cabo en medio ácido por formación de la sal, alcalinización y extracción con un solvente orgánico”* <sup>23</sup>. Un estudio indica que *Desmodium molliculum* contiene 4 mg/k de alcaloide (Tryptamina)<sup>9</sup>.

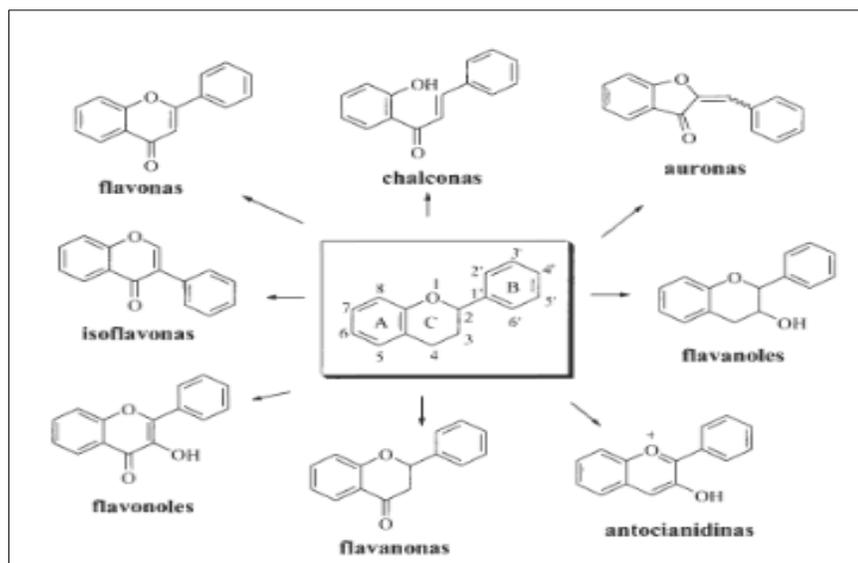


**Figura 3.** Estructura Química de Tryptamina

**Fuente:** Gonzales. 2008<sup>9</sup>

### - Flavonoides

Compuestos químicos del tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> (poseen dos anillos aromáticos unidos por una cadena de tres carbonos). Están ampliamente distribuidas en los vegetales. “Existe diversidad en cuanto a los sustituyentes del esqueleto carbonado especialmente en la cadena de tres carbonos lo que permite la clasificación en Flavonas, Flavonoles, Chalconas, Flavononas, Flavonoles, Catequinas, Auronas, Isoflavonas”<sup>23</sup>. En estudios realizados a *Desmodium molliculum* se determinó la presencia de Flavonoides como; Quercetina y Astragalina.



**Figura 4.** Flavonoides. Estructura Básica y Tipo, Gonzales. 2008<sup>23</sup>

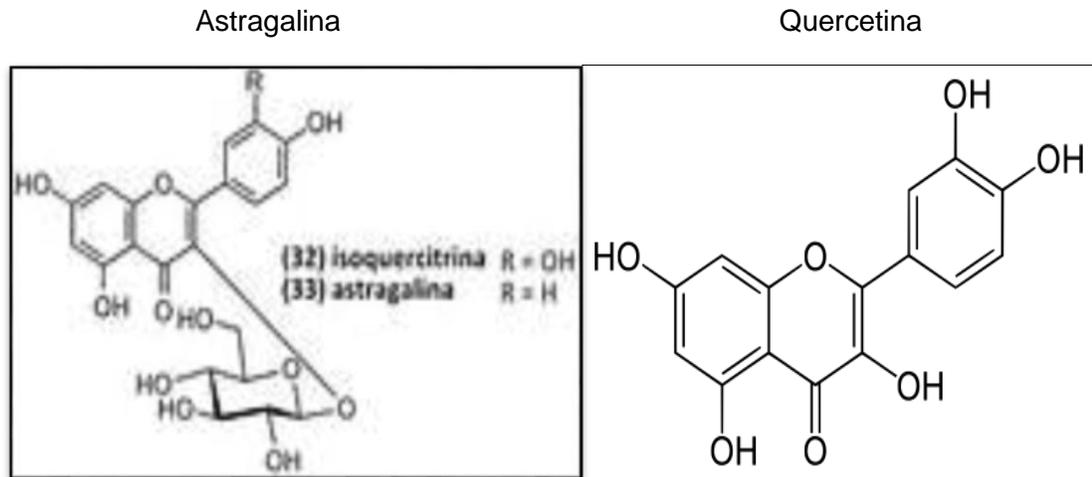


Figura 5: Estructura Química, TOSO, 2012<sup>23</sup>

- **Taninos**

Son polifenoles naturales capaces de formar uniones estables con proteínas, lo que ha permitido su uso en la industria de curtido de pieles.

Se pueden clasificar en:

**Taninos hidrolizables:** su núcleo principal es un polialcohol como la Glucosa.

**Taninos condensados:** Su formación se debe a la unión de 2 ó más leucoantocianidinas, flavan-3,4-dioles o Catequinas<sup>23</sup>. Estudios preclínicos del extracto acuoso de *Desmodium molliculum*, del Perú determinan la presencia de Taninos que se ligan a las proteínas dando una propiedad astringente<sup>9</sup>.

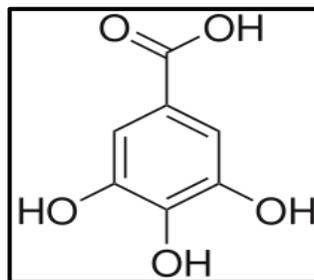


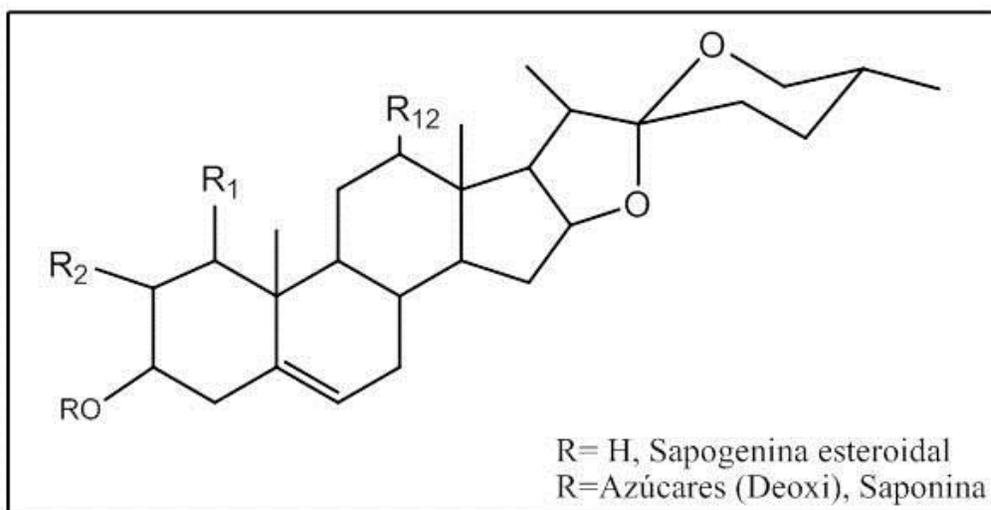
Figura 6. Estructura Química de un tanino (Ácido Gálico) Toso, 2012<sup>9</sup>.

- **Quinonas**

Están ampliamente representadas bien sea como núcleo principal de una estructura o formando parte de moléculas complejas aromáticas o aromáticas alifáticas y a veces diméricas. Constituyen un grupo importante de pigmentos vegetales y animales<sup>45</sup>.

- **Esteroides y/o triterpenos**

Las saponinas Esteroidales se encuentran dentro de este grupo, poseen de una a seis unidades de monosacáridos unidas entre sí mediante enlaces glicosídicos<sup>9</sup>. Estudios preclínicos del extracto acuoso de *Desmodium molliculum*, del Perú indican la presencia de las siguientes Saponinas: Dehydrosoyasaponin I, Soyasaponin I y Soyasapornin III, que revelan la capacidad para la activación de los canales del potasio activados por los iones de calcio actuando como un broncodilatador<sup>9</sup>.



**Figura 7.** Esqueleto Saponina Esteroidal

**Fuente:** TOSO, 2012<sup>9</sup>.

### 2.2.1.6 Usos terapéuticos

*Desmodium molliculum*, es utilizada por pueblos nativos, indígenas desde tiempos ancestrales. La especie posee propiedades anticonceptivas, antiinflamatorias, depurativas, desintoxicantes, protectoras hepáticas, antivíricas, diuréticas, antiespasmódicas, antimicrobianas y antiinflamatorias<sup>9</sup>. En la selva amazónica se administra una infusión de la planta a personas que sufren de nerviosismo. En el chamanismo, se utiliza para promover la lactancia (galactagogo), artritis. En África lo utilizan para desintoxicar el cuerpo<sup>18</sup>. Una infusión de hojas es utilizada por los amerindios en la selva tropical para convulsiones y úlceras venéreas; También para infecciones vaginales<sup>18</sup>.

### 2.2.1.7 Acción farmacológica

Posee saponinas dentro de sus componentes, demostrando actuar como un Inmunomodulador a nivel de las células T cooperadoras, promoviendo una respuesta inmune dominante a Th1 y suprimiendo las reacciones inmunes mediadas por IgE; las saponinas presentes en *Desmodium molliculum* son; Dehydrosoyasaponin I, Soyasaponin I y Soyasaponin III, capaces de activar los canales de potasio activados por los iones de calcio interviniendo como un broncodilatador<sup>9</sup>. En relación al *Desmodium molliculum*, se ha demostrado en estudios que posee en abundancia taninos, flavonoides y esteroides, los cuales serían responsables de su actividad anticonceptiva y antiinflamatoria<sup>3</sup>. También reducen la secreción de histamina e inhiben la síntesis de leucotrienos<sup>7</sup>, atribuyéndole sus propiedades antialérgico.

## 2.2.2 Métodos de extracción

Procedimiento de separación de sustancias medicinalmente activas de tejidos animales o vegetales de componentes inactivos o inertes utilizando solventes selectivos<sup>29</sup>. La extracción sigue siendo de considerable interés para poder mejorar la obtención de drogas derivadas de fuentes vegetales y animales.

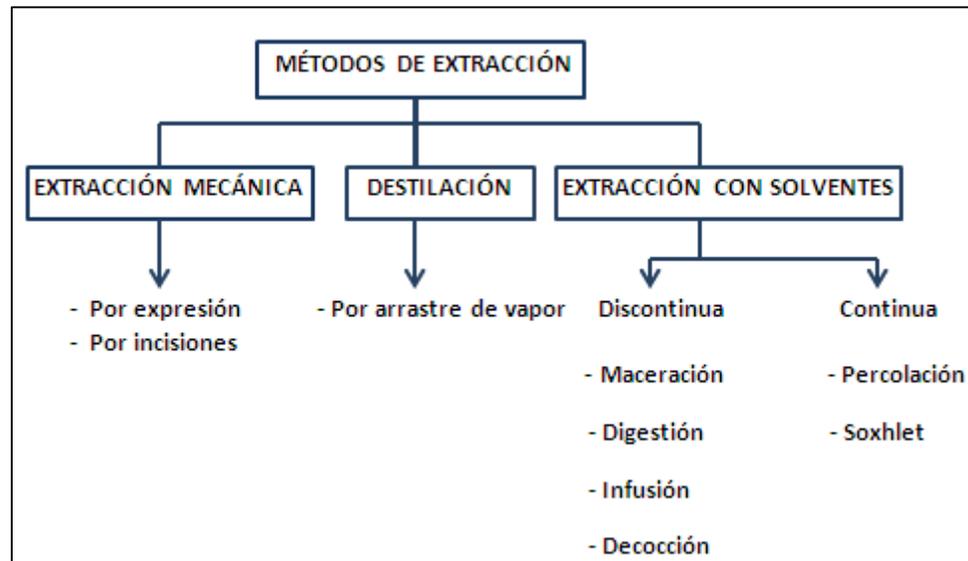


Figura 8. Métodos de extracción <sup>29</sup>

### 2.2.2.1 Maceración

Consiste en fragmentar en pequeñas partes el vegetal y dejar reposar con un disolvente apropiado, hasta que penetre en los tejidos ablandando y disolviendo las porciones solubles<sup>30</sup>. Los medios pueden ser diversos, tales como: Alcohólico, Glicérico, Agua, Oleoso o con medios más sintéticos tales como el Propilenglicol, según sea el fin a desarrollar <sup>30</sup>. La maceración es esencial cuando los principios son claramente solubles en frío y cuando la acción de la temperatura los transforma. Generalmente se utilizan los frascos de vidrio oscuro, tanto para el proceso de extracción y al momento de envasar <sup>30</sup>.

### **2.2.2.2 Percolación**

Se coloca el material fragmentado en una vasija cónica, y verter un disolvente adecuado. El material debe estar bien compactado para que el disolvente fluya con cierta lentitud y los componentes se puedan extraer con mejor precisión<sup>30</sup>.

### **2.2.2.3 Extracción por arrastre con vapor de agua**

Este método permite la difusión del vapor a través del tejido vegetal, aminorando el deterioro de los componentes de las esencias extraídas por otros métodos. Es el método más sencillo para obtener aceites esenciales, ya que son sustancias volátiles e insolubles en agua<sup>30</sup>.

### **2.2.3 Tamizaje fitoquímico**

El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés<sup>45</sup>. De acuerdo a la marcha Fitoquímica de Miranda y Cuellar<sup>45</sup>, cada muestra es sometida a la acción extractiva de solventes de polaridad creciente éter, alcohol, y agua, modificando el pH del medio con el fin de obtener los metabolitos secundarios de acuerdo a su solubilidad. Luego de separar las fracciones se realiza la identificación de metabolitos secundarios haciendo uso de reactivos de coloración y precipitación<sup>45</sup>.

### **2.2.4 Efecto antibacteriano**

Sustancia cuya propiedad es capaz de erradicar agentes bacterianos, inhibe su crecimiento e impide su proliferación sin ocasionar daño del huésped. Son generalmente fármacos como los antibióticos u otros agentes químicos capaces de atacar estos cuerpos<sup>13</sup>.

### 2.2.4.1 Tipos de efecto bacteriano

Existen tres tipos de efectos al añadir un agente antibacteriano sobre un cultivo de bacterias<sup>51</sup>.

- a. **Efecto bacteriostático:** inhibe el crecimiento de los microorganismos, pero las células bacterianas no mueren.
- b. **Efecto bactericida:** los agentes eliminan a las bacterias, pero no les ocasiona ruptura o lisis.
- c. **Efecto bacteriolítico:** los agentes causan la muerte bacteriana y producen lisis a las células que conforman el cultivo.

### 2.2.4.2 Blanco de acción de los antibacterianos

Los agentes antibacterianos actúan sobre las bacterias de diferentes maneras<sup>51</sup>, se agrupan de acuerdo a su blanco de acción aunque no comparten una estructura química similar<sup>51</sup>.

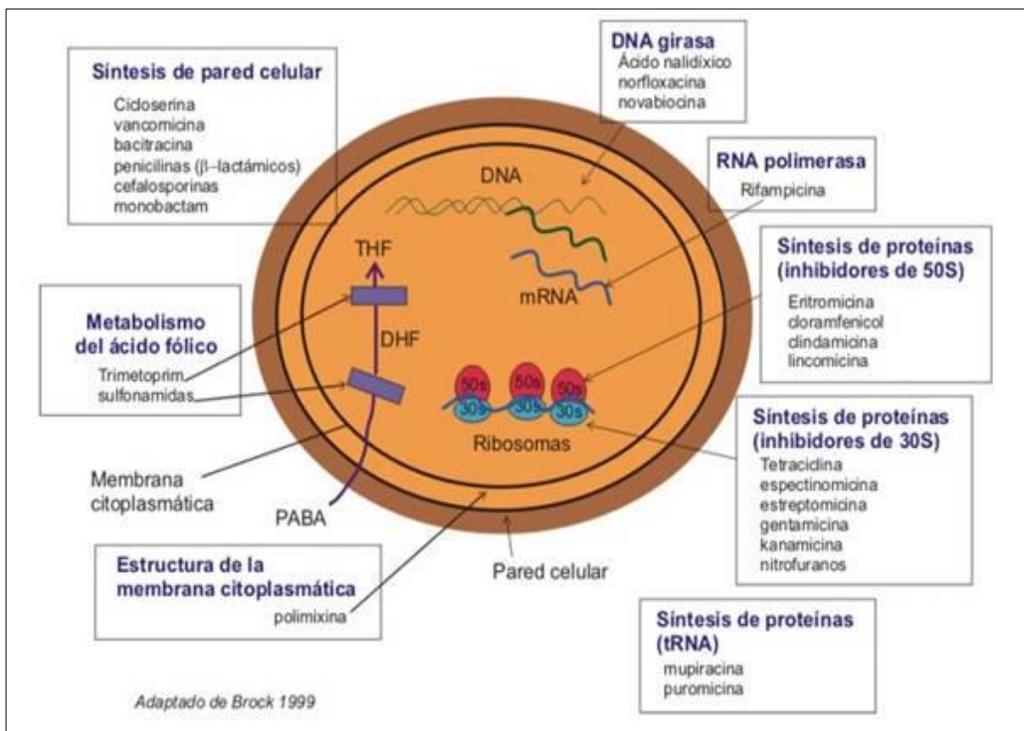


Figura 9. Tipos de AB y su blanco. (Brock 1999)

- a. **Sobre la pared celular de las bacterias:** Impiden su desarrollo o la destruyen, mediante una modificación de la permeabilidad de la membrana bacteriana. (Beta-lactámicos, glicopéptidos, polimixinas)
- b. **Inhibición de la síntesis proteica:** (tetraciclinas, eritromicina, lincomicina, estreptomycin, cloranfenicol)
- c. **Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos:** impide la replicación del ADN o su transcripción. (quinolonas)

### 2.2.5 Infecciones del tracto urinario (ITU)

Las infecciones del tracto urinario son, dentro de las infecciones bacterianas, las más frecuentes en el hombre, siendo los bacilos Gram-negativos el grupo taxonómico aislado con más frecuencia, predominando *Escherichia coli* como agente causal<sup>13</sup>.

Se caracteriza por la presencia de microorganismos en el tracto urinario a cualquier nivel, desde el extremo distal de la uretra hasta el cortez renal (uretra, vejiga, próstata, uréteres, pelvis renal o riñones), englobando diferentes entidades clínicas que requieren su catalogación mediante la correlación clínica laboratorio.

Las infecciones del tracto urinario son de gran importancia por su prevalencia. Aproximadamente el 20% de las mujeres desarrollan una infección urinaria a lo largo de su vida; es la infección nosocomial más frecuente en nuestro país y ocupa el segundo lugar de las infecciones atendidas por equipos de Atención Primaria<sup>13</sup>.

#### 2.2.5.1 Clasificación de las infecciones del tracto urinario

- **ITU inferior:** población bacteriana a nivel de vejiga y uretra que se vincula a la presencia de signos y síntomas urinarios, como turbidez y olor fétido de la orina, disuria, polaquiuria, Incluye a la cistitis y uretritis<sup>13</sup>.

- **ITU superior:** Presencia bacteriana a nivel uretral y del parénquima renal, con signos y síntomas sistémicos como; fiebre, dolor lumbar escalofríos, náuseas y vómitos. En este grupo se encuentran las pielonefritis<sup>13</sup>.
  
- **ITU no complicada.-** ocurre en pacientes con tracto urinario normal, sin alteraciones anatómicas o funcionales, cuyos síntomas están confinados a la vejiga y uretra. Estas infecciones son muy frecuentes en mujeres jóvenes sexualmente activas<sup>13</sup>.
  
- **ITU complicada.-** ligado a factores funcionales, anatómicos o farmacológicos que predisponen al paciente a una infección persistente o al fracaso del tratamiento. Estos factores incluyen condiciones a menudo encontradas en ancianos como; ampliación de la próstata, obstrucciones y otros problemas que necesitan la colocación de dispositivos urinarios. Su espectro comprende desde una cistitis complicada hasta una urosepsis con choque séptico<sup>13</sup>.
  
- **ITU o bacteriuria asintomática.-** Muchos pacientes pueden tener una bacteriuria significativa ( $\geq 10^5$  UFC/mL de orina) sin presentar síntomas.
  
- **ITU recurrente.-** Más de tres episodios de ITU demostrados por cultivo en un periodo de un año.
  
- **ITU nosocomial.-** Infección urinaria a partir de las 48 horas de la hospitalización de un paciente sin haber presentado evidencia de infección, que se asocie a algún procedimiento invasivo, en especial, colocación de un catéter urinario <sup>13</sup>.

### 2.2.5.2 Tratamiento

El tratamiento de las ITU depende de si es complicada o no complicada y siempre se debe tener en cuenta a los factores de riesgo (Tabla N° 2). Es importante seleccionar en forma empírica un antibiótico con alta eficacia sobre el agente causal, con buena distribución corporal, alta concentración en las vías urinarias y con toxicidad baja, hasta que se cuente con el resultado del urocultivo y antibiograma. Los objetivos del tratamiento deben ser la obtención de una respuesta rápida y efectiva, prevención de la recurrencia y evitar la aparición de resistencia a los antibióticos<sup>31</sup>.

**Tabla 2.** Factores de riesgo para el desarrollo de ITU

<p><b>Alteraciones al libre flujo :</b></p> <p><b>Orgánicas</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Reflujo vesicoureteral</li><li>- Instrumentación: cateterismo urinario, cirugía endoscópica</li></ul> <p><b>Obstructivas</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Cáncer de próstata, tumores</li><li>- Estenosis uretral</li><li>- Litiasis vesical y uretral</li></ul> <p><b>Funcionales</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Embarazo</li><li>- Disfunción vesical: vejiga neurogénica, incontinencia, etc.</li></ul>
<p><b>Procesos predisponentes y/o agravantes</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Diabetes mellitus</li><li>- Edad avanzada</li><li>- Insuficiencia renal crónica</li><li>- Hiperplasia de próstata</li><li>- Inmunosupresión: VIH, medicamentosa, idiopática, trasplantados, neoplasias</li></ul>
<p><b>Procesos predisponentes sociales</b></p> <ul style="list-style-type: none"><li>- Vida sexual altamente activa (promiscuidad)</li></ul>

Adaptado de Foxman B, Gillespie B, Koopman J, et al. Am J Epidemiol, 2000

La elección de un antibiótico, en diversas infecciones, depende de los niveles de concentración plasmática que alcanza el antibiótico para lograr una susceptibilidad antimicrobiana alta. Pero, en el caso de las ITU, lo importante es la concentración del antibiótico en el parénquima renal, en la capa más profunda de la pared de la vejiga y de la próstata<sup>31</sup>. Por tanto, la excreción concentración urinaria y la determinación de la actividad del antibiótico en la orina son importantes para la decisión de si su uso se justifica o no en el tratamiento de la ITU<sup>31</sup>. En la (Tabla N°3), se resume los principales antibióticos utilizados para el tratamiento de la ITU y algunos esquemas generales.

**Tabla 3.** Infección del tracto urinario (ITU) tratamiento en el adulto

<b>Categoría</b>	<b>Criterio diagnóstico</b>	<b>Patógenos principales</b>	<b>Terapia de primera línea</b>
Cistitis aguda no complicada	Análisis de orina con piuria y hematuria	Escherichia coli Staphylococcus,S Proteus mirabilis	Nitrofurantoína Cefalosporinas de 1ra generación,Ciprofloxacina
Cistitis recurrente en mujer joven	Presencia de síntomas y urocultivo: > 100 UFC/ mL	Escherichia coli Staphylococcus,S Proteus mirabilis	Ciprofloxacina, Norfloxacina, Nitrofurantoína, Cefalexina, Cefadroxilo, Ciprofloxacina
Pielonefritis aguda no complicada	Urocultivo con un conteo de 100 000 UFC/mL	Escherichia coli Staphylococcus,S Proteus mirabilis	Fluoroquinolona, Amoxicilina Cefalosporina, Gentamicina, Amikacina
ITU complicada	Urocultivo: > 10 000 UFC/m	Escherichia coli Staphylococcus,S Proteus mirabilis Enterococcus sp	Fluoroquinolona, Cefalosporina Gentamicina, Amikacina Si es resistente usar Linezolid
Bacteriuria asintomática en el embarazo	Urocultivo: > 10 000 UFC/mL	Escherichia coli Staphylococcus,S	Amoxicilina, Nitrofurantoína Cefalexina, Aztreonam

Adaptado de Foxman B, Gillespie B, Koopman J, et al. Am J Epidemiol, 2000

### 2.2.6 Bacteria *Escherichia coli*

En 1885 Theodor von Escherich, bacteriólogo alemán, la denominó *Bacterium coli*. Luego la taxonomía le asignó el nombre de *Escherichia coli*, en honor a su descubridor <sup>12</sup>.

Son ligeramente alargadas. Su volumen es de  $1\mu\text{m}^3$ , la superficie celular de  $6\mu\text{m}^2$ , midiendo aproximadamente  $0.7 \times 2.5 \mu\text{m}^3$ . Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, Este grupo posee un conjunto de características fenotípicas (fisiológicas, bioquímicas, e inmunológicas) <sup>32</sup>. *Escherichia coli*, es la bacteria dominante de la flora intestinal, no causa enfermedad a menos que se alteren las condiciones de su hábitat <sup>43</sup>. en un mismo individuo pueden coexistir más de 10 serotipos. Causando en diversas condiciones infecciones urinarias, meningitis, septicemias etc. Posee el antígeno de envoltura K1, que daría a este germen capacidades invasivas. También posee plásmidos que portan genes que codifican para la producción de diferentes enzimas, adhesinas y enterotoxinas que da a *E. coli* características patológicas específicas y la capacidad de producir infecciones urinarias o gastrointestinales dependiendo de las proteínas producidas <sup>32</sup>.

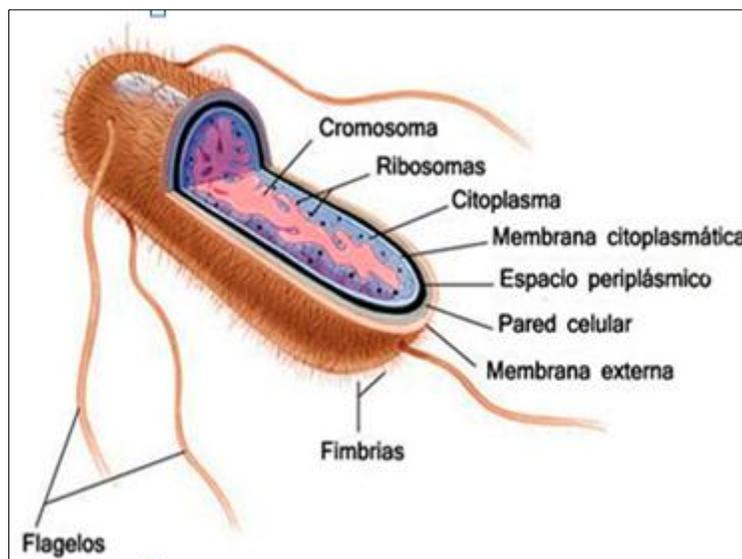


Figura10. Journal of Medical Microbiology <sup>43</sup>

### 2.2.6.1 Clasificación Científica

**Reino:** Bacteria

**Filo:** Proteobacteria

**Clase:** Gamma Proteobacteria

**Orden:** Enterobacteriales

**Familia:** Enterobacteriaceae

**Género:** *Escherichia*

**Especie:** *Escherichia coli*

### 2.2.6.2 Patogenia

*Escherichia coli* integra la flora normal intestinal, ocasionando diarrea, infección urinaria, meningitis, etc. sin embargo una cepa que causa infección urinaria no causará diarrea ni meningitis. La mutabilidad de este microorganismo esta dado porque *E. Coli* ha adquirido un conglomerado de diferentes genes de virulencia <sup>32</sup>. Las cepas de *Escherichia coli* que ocasionan enfermedades diarreicas se han agrupado en seis tipos patógenos, cada uno definido por sus propiedades de virulencia. (Tabla N° 4)

**Tabla 4.** Clasificación de acuerdo a sus mecanismos de virulencia <sup>11</sup>

Síndromes clínicos	<i>Escherichia coli</i> patógenas
Enteritis/ enfermedad diarreica	<i>E. coli</i> enteropatogénica - EPEC <i>E. coli</i> enterohemorrágica - EHEC <i>E. coli</i> enterotoxigénica - ETEC <i>E. coli</i> enteroagregativa - EAEC <i>E. coli</i> enteroinvasiva - EIEC
Infecciones del tracto urinario	<i>E. coli</i> uropatogénica - UPEC
Sepsis/meningitis	MNEC

**Fuente:** Epidemiol, 2000

- ***E. coli* enteropatogénica – EPEC:** Responsable de la diarrea acuosa de los lactantes. Produce vómitos, fiebre y una diarrea acuosa, con mucus pero sin sangre. Coloniza las microvellosidades de todo el intestino, produciendo la lesión de “adhesión y erosión” en el ribete en cepillo de la membrana de la vellosidad. También se pueden presentar casos en adultos, el principal factor de riesgo se da en edades inferiores a dos años <sup>33</sup>.
- ***E. coli* enterohemorrágica – EHEC:** Origina diarrea sanguinolenta, síndrome urémico hemolítico y colitis hemorrágica. Afecta principalmente a niños siendo el principal factor de riesgo el consumo de carne mal cocida <sup>32</sup>.
- ***E. coli* enterotoxigénica - ETEC:** Responsable de la llamada diarrea del viajero, causa una diarrea acuosa, como agua de arroz, y poca fiebre. Coloniza la porción proximal del intestino delgado. Afecta a adultos y niños, siendo el principal factor de riesgo los viajes al extranjero<sup>11</sup>.
- ***E. coli* enteroagregativa – EAEC:** produce una diarrea acuosa sin sangre y con moco, son más virulentas en adultos. Tiene un periodo de incubación entre 20 a 48 h<sup>33</sup>.
- ***E. coli* enteroinvasiva – EIEC:** Origina fiebre y diarrea profusa con heces que contienen mucus y estrías sanguinolentas. Afecta a adultos y el principal factor de riesgo son los viajes al extranjero<sup>33</sup>.
- ***E. coli* uropatógeno - UPEC:** existe una gran variedad, se diferencian entre las causantes de infecciones en la vejiga, pielonefritis, cistitis e infección en los riñones. En algunos pacientes

las infecciones del tracto urinario son recurrentes debido a que invaden células epiteliales que revisten la superficie de la vejiga; alojándose en los organelos y mitocondrias permitiéndole evadir los antibióticos. Los macrófagos no las pueden fagocitar ya que se encuentran dentro de la célula garantizando su subsistencia por un largo periodo. Se ha encontrado en estudios que la adhesina más importante, sobre todo en cepas que causan infección renal es *Pili P*. Esto permitiría la adaptabilidad en diferentes superficies mucosas y ambientales, otorgándole un mecanismo de evasión de las defensas del hospedero <sup>33</sup>.

### **2.2.6.3 Tratamiento**

Los cuadros clínicos producidos por cepas EPEC y ETEC deben atenderse con rehidratación vía oral, hasta que el proceso infeccioso se controle y disminuya. En el caso de los cuadros asociados con EHEC y en particular EIEC es necesario el empleo de antibacterianos por el ataque al estado general y el riesgo de contagio <sup>33</sup>.

- Los antibióticos de amplio espectro son efectivos pero hay mayor resistencia a la Trimetoprima- Sulfametoxazol y la Ampicilina.
- El tratamiento de elección son las quinolonas; la dosis estándar durante 3 a 5 días puede disminuir la gravedad y la duración de la enfermedad.
- la Rifaximina, un antibiótico local no absorbible para la diarrea del viajero. Es tan efectiva como la Ciprofloxacina teniendo una absorción mínima.

- La Azitromicina también es una buena elección para las embarazadas y los niños, para quienes no Están aprobadas las Fluoroquinolonas, y para los pacientes que no las toleran.
- No se deben prescribir medicamentos que dificultan el movimiento intestinal, tales como la Loperamida.

#### **2.2.6.4 Epidemiología y resistencia bacteriana**

Cuatro de cada cinco infecciones focalizadas en las vías urinarias están provocadas por la bacteria *Escherichia Coli*, Además de ser causante de la mayoría de los episodios de cistitis, la *E. coli* presenta una amplia diversidad genética que dificulta su tratamiento. En los casos en los que la infección urinaria llega al sistema circulatorio, ésta puede provocar una sepsis urinaria (infección grave) o una nefritis (inflamación de uno o ambos riñones) <sup>34</sup>.

Un informe de la OMS indica la resistencia de *E. coli* a las cefalosporinas de tercera generación y a las Fluoroquinolona, dos grupos considerables de fármacos antibacterianos en el tratamiento de las infecciones urinarias <sup>44</sup>.

#### **2.2.7 Método Kirby - Bauer**

Existen diversos métodos para determinar in vitro la susceptibilidad de bacterias ante agentes bacterianos. Sin embargo, los resultados pueden estar influenciados por el método, cepas utilizadas y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado <sup>51</sup>. El método de Kirby- Bauer es cualitativo, nos permite evaluar extractos de plantas con actividad antibacteriana, sus resultados son altamente reproducibles. Este método se basa en la relación entre la concentración necesaria del extracto para inhibir una cepa bacteriana y el diámetro del halo de inhibición. Este método se puede realizar en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia o en disco <sup>51</sup>(ver anexo 3)

## 2.3 HIPÓTESIS

### 2.3.1 Hipótesis general

El extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. influye significativamente en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro.

### 2.3.2 Hipótesis específica

- La concentración al 25% del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. influye significativamente en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro.
- La concentración al 50% del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. influye significativamente en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro.
- La concentración al 75% del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. influye significativamente en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro.
- La concentración al 100% del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. influye significativamente en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro.

## 2.4 VARIABLES

### 2.4.1 Tabla de operacionalización de variables

Variable independiente	Indicadores
Extracto Etanólico De <i>Desmodium molliculum</i> (Kunth) DC.	Tiempo (24,48,72 h) Concentración al 25% Concentración al 50% Concentración al 75% Concentración al 100%
Variable dependiente	
Efecto antibacteriano en <i>Escherichia coli</i>	Diámetro del halo

## 2.5 MARCO CONCEPTUAL

- a. **Manayupa (*Desmodium Molliculum*):** Planta herbácea perenne, sufruticosa, rastrera oriunda del Perú. También conocida como “runamanayupana”, “pata de perro”, “pega-pega” y en quechua “allcopachaque”. posee propiedades Diurética, Depurativa, Antibacteriana y Antiinflamatoria.
- b. **Extracto Etanólico:** Es una sustancia obtenida por extracción de una parte de una materia prima, a menudo usando un solvente como etanol o agua. Los extractos pueden comercializarse como tinturas o

en forma de polvo, Los principios aromáticos de muchas especias, frutos secos, hierbas, frutas, etcétera y algunas flores se comercializan como extractos <sup>25</sup>.

- c. **Concentración:** Cantidad de una sustancia (el soluto) disuelta en otra (el disolvente) en una mezcla homogénea o una disolución <sup>46</sup>.
  
- d. **Efecto Antibacteriano:** Se clasifican e dos grupos bacteriostático, son aquellas sustancias que bloquean el desarrollo y la multiplicación de las bacterias pero no las destruyen y bactericidas, que provocan la muerte bacteriana <sup>47</sup>.
  
- e. **Metabolitos primarios:** Son importantes para la vida del vegetal como proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, hormonas <sup>25</sup>.
  
- f. **Metabolitos secundarios:** No cumplen ningún rol fisiológico en los vegetales: alcaloides, glicósidos, aceites esenciales, resinas, etc. Sirven para comparar perfiles químicos y diferenciar entre las diferentes especies vegetales <sup>25</sup>.
  
- g. ***Escherichia Coli:*** Es una bacteria habitual en el intestino del ser humano y de otros animales de sangre caliente. Aunque la mayoría de las cepas son inofensivas, algunas pueden causar una grave enfermedad de transmisión alimentaria. La infección por *E. Coli* se transmite generalmente por consumo de agua o alimentos contaminados, como productos cárnicos poco cocidos y leche cruda <sup>26</sup>
  
- h. **ATCC:** American Type Culture Collection<sup>53</sup>.
  
- i. **inóculo:** Alícuota de un cultivo bacteriano transferido a un medio de cultivo <sup>53</sup>.

- j. **UFC:** Unidad formadora de colonias <sup>53</sup>.
- k. **Cepa:** Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento <sup>53</sup>.
- l. **Colonia:** Crecimiento visible bacteriano, generalmente en medios sólidos, originada por la multiplicación de una sola bacteria preexistente <sup>53</sup>.
- m. **disco de sensibilidad:** Discos impregnados con algún antimicrobiano usados para determinar la susceptibilidad antimicrobiana por disco difusión <sup>53</sup>.
- n. **Halo de inhibición:** Es la zona alrededor de un disco de antibiótico en un antibiograma en el que no se produce crecimiento bacteriano<sup>49</sup>.
- o. **Solvente:** Usualmente el componente en mayor proporción se denomina solvente <sup>48</sup>.
- p. **CLSI:** Comité de Estandarización de Laboratorios Clínicos <sup>49</sup>.
- q. **Estándar de Mc. Farland:** Estándar de turbidez de sulfato de bario. La escala usada para el inóculo de las pruebas de susceptibilidad por el método de disco difusión es 0.5 <sup>53</sup>.
- r. **PEIR:** porcentaje de Efecto Inhibitorio Relativo <sup>53</sup>.
- S. **µl:** Un microlitro, equivale a  $10^{-6}$  L = 1 mm<sup>3</sup> <sup>52</sup>.
- T. **µg:** El microgramo es una unidad de masa del Sistema Internacional de Unidades que equivalen a la milmillonésima parte de un kilogramo ( $10^{-9}$  kg) o a la millonésima parte de un gramo ( $10^{-6}$  g) <sup>52</sup>.

## CAPÍTULO III. MÉTODO

### 3.1 TIPO DE ESTUDIO

- **Observacional:** Ya que se utilizó la observación y se registró los acontecimientos sin intervenir en el curso natural de estos.
- **Transversal:** En función al tiempo, se realizó con los datos obtenidos en un momento puntual, se ejecutó en un solo momento.
- **Cuantitativo:** se realizó las diferentes mediciones del diámetro de los halos formado en el periodo de tiempo establecido.

### 3.2 DISEÑO A UTILIZAR

- **Diseño experimental:** Se realizó un control de variable de acuerdo al protocolo de estudio, con la finalidad de identificar las posibles relaciones entre causa y efecto.

El extracto se obtuvo por maceración, posteriormente se realizó la determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* y la identificación de metabolitos secundarios (Tamizaje fitoquímico). La actividad antibacteriana se determinó por el método de Kirby-Bauer cultivo *in vitro* con cepas de control de: *Escherichia coli* ATCC 25922, se analizó el extracto etanólico de la hoja y tallos de *Desmodium molliculum* (Manayupa) a concentraciones de 25%; 50%; 75% y 100%. Se determinó el porcentaje de inhibición a través de la medición del halo de inhibición formado alrededor de los discos que contendrán el extracto etanólico, se determinó activos a aquellos extractos con actividad moderadamente activa.

### **3.3 POBLACIÓN**

#### **3.3.1 Población bacteriana**

- El estudio se realizó en cepas bacterianas de *Escherichia coli* ATCC 25922

#### **3.3.2 Población vegetal**

Constituida por la especie vegetal *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. "Manayupa".

### **3.4 MUESTRA**

#### **3.4.1 Muestra bacteriana**

- Estuvo conformado por el número de colonias que se empleó para la preparación del inóculo bacteriano, esta osciló entre 5 a 7 colonias de tamaño y morfología similar.

#### **3.4.2 Muestra vegetal**

Se emplearon 500 gramos de hojas y tallos de *Desmodium molliculum* "Manayupa", que fueron recolectadas en el distrito de Ocortuna, departamento de Junín, de forma aleatoria; cumpliendo con los criterios de inclusión y exclusión

### **3.5 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

#### **3.5.1 Materiales, reactivos y equipos de laboratorio**

##### **a. Materiales de bioseguridad:**

- Guantes Quirúrgicos
- Gafas protectora
- Mascarilla

- Gorro desechables
- Mandil
- Botas descartables(protector de zapatos)

**b. Materiales de laboratorio**

- Vasos de precipitado 50ml, 200ml
- Matraces 500ml, 1000ml
- Probetas 50ml, 100ml
- Pipetas volumétricas 1ml, 2ml, 5ml, 10ml
- Placas de Petri
- Tubos de ensayo
- Tubos con tapa rosca
- Discos de antibiótico
- Embudos
- Placas de Silica gel
- Frascos goteros
- Escobillones estériles
- Frascos ámbar de 1000ml
- Frascos de vidrio pequeños
- Lunas de reloj
- Pliegos de papel de filtro
- Gradillas
- Goteros
- capilares
- Mortero
- Pinzas de madera
- Papel craft
- Bagueta
- Asa de siembra
- Hisopos

**c. Reactivos químicos:**

- Etanol
- Cloroformo
- Éter de petróleo
- Ciclohexano
- Acetato de etilo
- Alfa naftol (Molish)
- Ácido sulfúrico
- Éter de petróleo
- Ácido clorhídrico al 1%
- Rvo. Gelatina
- Solución de Fehling A
- Solución de Fehling B
- Rvo. de Tollens A y B
- $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  al 1%
- Amonio al 10%
- Ácido Acético
- Rvo. Dragendorff
- Rvo. Mayer
- Rvo. Wagner
- Ninhidrina 2,4-DNFH
- Hidróxido de sodio al 10%
- Cloruro de Hierro III al 5%
- Cintas de Magnesio metálico (Shinoda)
- Cloruro de sodio NaCl
- Alcohol de 96°

**d. Equipos de laboratorio**

- Bomba al vacío
- Balanza analítica
- Baño María

- Mechero
- Cámara cromatográfica
- Cocinilla
- Estufa Memmert N° 36309 - 2005
- Incubadora Binder N° 72772 - 2014
- Autoclave
- Lámpara de luz ultravioleta

**e. Medios de cultivo**

- Agar Mueller Hinton
- Caldo Trypticase soya

**3.5.2 Procedimiento experimental**

**3.5.2.1 Recolección y autenticación botánica**

La muestra fue recolectada en el distrito de Ocortuna, departamento de Junín. Observamos las mejores especies para su recolección (tallos, hojas, flores) con una podadora cortamos y lo guardamos en un saquillo con orificios grandes para evitar el exceso de sudoración. Luego se procedió a su identificación botánica, la planta fue identificada y autenticada por el Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Se adjunta certificado de identificación taxonómica en el anexo N° 1

**3.5.2.2 Preparación del material vegetal**

- Se empleó 500 gr de *Desmodium molliculum*. Separamos las hojas y tallos de la planta, limpiamos cuidadosamente con alcohol de 96°. Una vez limpio se extendió en una fuente para secar a temperatura ambiente por 5 días.
- Se llevó la muestra a estufa en una temperatura menor de 40° C

durante un periodo de 72 horas.

- Una vez seca se trituró la muestra, se obtuvo 250 gr de muestra seca.

### **3.5.2.3 Obtención del extracto etanólico**

- Se pesó 250 gr de *Desmodium molliculum*
- Se adicionó etanol de 96 °
- Se dejó en maceración por 2 semanas, renovando el solvente cada semana y con homogenización mecánica diaria.
- Se guardó el concentrado en frasco de vidrio ámbar debidamente rotulado.
- Después de las 2 semanas de maceración, filtramos al vacío.

### **3.5.2.4 Tamizaje fitoquímico y cromatografía**

Se realizó reacciones de identificación basado en la aplicación de pruebas de coloración y precipitación para determinar la presencia o ausencia de metabolitos activos en la planta, haciendo uso de reactivos específicos <sup>45</sup>.

- **Prueba de solubilidad**
- En un tubo de ensayo se adicionó 1ml de Ciclohexano, luego se agregó 2ml de MP.
- En un tubo de ensayo se adicionó 1ml de Etanol, luego se agregó 2ml de MP.
- En un tubo de ensayo se adicionó 1ml de Cloroformo, luego se agregó 2ml de MP.
- En un tubo de ensayo se adicionó 1ml de Éter de petróleo, luego se agregó 2ml de MP.
- En un tubo de ensayo se adicionó 1ml de Acetato de etilo, luego se agregó 2ml de MP.

- En un tubo de ensayo se adicionó 1ml de Agua destilada, luego se agregó 2ml de MP y se agregó 2ml de MP
  
- **Identificación de carbohidratos generales**
- **Reactivo Molisch:** en un tubo de ensayo se adicionó 2 ml de MP, luego se agregó V gotas del reactivo y se agitó lentamente.
  
- **Reactivo 2,4 DNFH:** en un tubo de ensayo se adicionó 2 ml MP luego se agregó X gotas del reactivo, se agitó y se llevó a baño maria por 10 min.
  
- **Identificación de carbohidratos reductores**
- **Reactivo Fehling:** en un tubo de ensayo se adicionó 2ml MP, luego se agregó III gotas del reactivo y se llevó a baño maria por 5 minutos.
- **Reactivo Tollens:** en un tubo de ensayo se adicionó 2ml MP, luego se agregó V gotas del reactivo y se agitó lentamente.
  
- **Identificación de Flavonoides**
- **Shinoda:** en un tubo de ensayo se adicionó 2ml MP, luego se agregó X gotas de reactivo Mg metálico y 10 gotas de HCl al 1%.
  
- **Reactivo Pb (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>:** en un tubo de ensayo se adicionó 2ml MP, luego se agregó III gotas de reactivo.
  
- **Identificación de compuestos fenólicos**
- **Reactivo FeCl<sub>3</sub> al 5%:** en un tubo de ensayo se adicionó 2ml MP, luego se agregó II gotas de reactivo y se agitó lentamente.

- **Identificación de Cumarinas**
  - **NaOH al 10%:** en un tubo de ensayo se adicionó 2ml de MP, luego se agregó II gotas de reactivo. (Formación de pp amarillo intenso).
  
- **Identificación de taninos**
  - **NaCl al 1%:** en un tubo de ensayo se adicionó 2ml de MP, luego se agregó V gotas de reactivo.
  - **Reactivo gelatina:** en un tubo de ensayo se adicionó 2ml de MP, luego se agregó V gotas de reactivo.
  
- **Identificación de Alcaloides**
  - **Reactivo Dragendorff:** en un tubo de ensayo se adicionó 2ml de MP, luego se agregó II gotas de reactivo, se calentó hasta sequedad y se agregó HCl al 1%
  - **Reactivo Mayer:** en un tubo de ensayo se adicionó 2ml de MP, luego se agregó III gotas de reactivo, se calentó hasta sequedad y se agregó HCl al 1% y NaCl.
  - **Reactivo Wagner:** en un tubo de ensayo se adicionó 2ml de MP, luego se agregó III gotas de reactivo, se calentó hasta sequedad y se agregó HCl 1 %.
  
- **Identificación de aminoácidos**
  - Ninhidrina: en un tubo de ensayo se adicionó 2ml de MP, luego se agregó II gotas de reactivo.
  
- **Identificación de saponinas**
  - Prueba de Liebermann-Burchard: En un tubo de ensayo se adicionó 2ml de MP, luego se agregó 1ml de agua destilada, II gotas de reactivo Anhídrido acético y I gota de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### 3.5.2.5 Guía observacional para recolección de datos: marcha Fitoquímica

#### Cuadro. N°1. Prueba de Solubilidad

- Se realizó la prueba de solubilidad del extracto etanólico de las hojas y tallos de *Desmodium molliculum*

MP	AGUA	ALCOHOL	METANOL	CLOROFORMO	CICLOHEXANO	ETER DE PETROLEO
<b>HOJA Y TALLO</b>	Soluble (+)	Soluble (+)	Soluble (+)	Insoluble (-)	Insoluble (-)	Insoluble (-)

Leyenda:

- + Positivo (soluble)
- Negativo (insoluble)

Determinación cualitativa de carbohidratos generales del extracto etanólico de las hojas y tallos de *Desmodium molliculum* "Manayupa".

#### Cuadro. N°2. Presencia de carbohidratos Generales

REACTIVO	FORMULACIÓN	EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS Y TALLOS
MOLISCH	2mL MP + V gotas Rvo agitación lenta	color anillo violeta (-)
2,4 DNFH	2mL MP + X gotas Rvo agitar y llevar a BM*10'	pp rojo ladrillo (++)

LEYENDA

- Ausencia
- +/- Escaso
- + Moderado
- ++ Abundante
- +++ Muy abundante

Determinación cualitativa de Carbohidratos Reductores del extracto etanólico de las hojas y tallos de *Desmodium molliculum*

**Cuadro. N°3.**Presencia de Carbohidratos Reductores

REACTIVO	FORMULACIÓN	EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS Y TALLOS
TOLLENS (carbohidratos)	2mL MP + V gotas Rvo agitación lenta	formación anillo violeta -
FELLING	2mL MP +III gotas Rvo + BM*5'	espejo de plata -

LEYENDA

- Ausencia
- +/- Escaso
- + Moderado
- ++ Abundante
- +++ Muy abundante

Determinación cualitativa de Metabolito Secundarios del extracto etanólico de las hojas y tallos de *Desmodium molliculum*

**Cuadro. N°4.**Presencia de Metabolito Secundarios

FLAVONOIDES		
REACTIVO	FORMULACIÓN	EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS Y TALLOS
SHINODA	2mL MP + X gotas Rvo Mg metálico + X gotas HCl (c)	Cambio de coloración, formación burbujeante +++
Pb (CH <sub>3</sub> COO) <sub>2</sub> 1%	2mL MP +III gotas Rvo	color amarillo tenue ++

LEYENDA

- Ausencia
- +/- Escaso
- + Moderado
- ++ Abundante
- +++ Muy abundante

Determinación cualitativa de Compuestos Fenólicos del extracto etanólico de las hojas y tallos de *Desmodium molliculum*

**Cuadro. N°5. Presencia de Compuestos Fenólicos**

COMPUESTOS FENOLICOS		
REACTIVO	FORMULACION	EXTRATO ETANOLICO DE LAS HOJAS Y TALLOS
FeCl <sub>3</sub> 5%	2mL MP + II gotas Rvo agitación lenta	pp verde: taninos  +++

LEYENDA

- Ausencia
- +/- Escaso
- + Moderado
- ++ Abundante
- +++ Muy abundante

Determinación cualitativa de Cumarinas del extracto etanólico de las hojas y tallos de *Desmodium molliculum* (Manayupa).

**Cuadro. N°6. Presencia de Cumarinas**

CUMARINAS		
REACTIVO	FORMULACION	EXTRATO ETANOLICO DE LAS HOJAS Y TALLOS
NaOH 10%	2mL MP + II gotas Rvo	pp amarillo intenso ++

LEYENDA

- Ausencia
- +/- Escaso
- + Moderado
- ++ Abundante
- +++ Muy abundante

Determinación cualitativa de Taninos del extracto etanólico de las hojas y tallos de *Desmodium molliculum* (Manayupa).

**Cuadro. N°7.Presencia de Taninos**

TANINOS		
REACTIVO	FORMULACION	EXTRATO ETANOLICO DE LAS HOJAS Y TALLOS
NaCl 1%	2mL MP + V gotas Rvo+ V gelatina salada	Coloración amarillo intenso +

LEYENDA

- Ausencia
- +/- Escaso
- + Moderado
- ++ Abundante
- +++ Muy abundante

Determinación cualitativa de alcaloides del extracto etanólico de las hojas y tallos de *Desmodium molliculum* (Manayupa)

**Cuadro. N°8.Presencia de Alcaloides**

ALCALOIDES		
REACTIVO	FORMULACION	EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS Y TALLOS
DRAGENDOUFF	2mL MP + II gotas	Coloración verde intenso ++
MAYER	2mL MP + III gotas Rvo	Rojo intenso -
WAGNER	2mL MP + III gotas Rvo	pp marrón +++

LEYENDA

- Ausencia
- +/- Escaso
- + Moderado
- ++ Abundante
- +++ Muy abundante

Determinación cualitativa de aminoácidos del extracto etanólico de las hojas y tallos de *Desmodium molliculum* (Manayupa)

**Cuadro. N°9.Presencia de Aminoácidos**

AMINOÁCIDOS		
REACTIVO	FORMULACIÓN	EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS Y TALLOS
NINHIDRINA	2mL MP + II gotas Rvo=	pp amarillo- intenso + + +

LEYENDA

- Ausencia
- +/- Escaso
- + Moderado
- ++ Abundante
- +++ Muy abundante

Determinación cualitativa de saponinas del extracto etanólico de las hojas y tallos de *Desmodium molliculum* (Manayupa)

**Cuadro. N°10.Presencia de Saponinas**

SAPONINAS		
REACTIVO	FORMULACIÓN	EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS Y TALLOS
Anhídrido acético y H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2mL MP + 1mL Agua destilada + II gotas de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	coloración azul verdusco + + +

LEYENDA

- Ausencia
- +/- Escaso
- + Moderado
- ++ Abundante
- +++ Muy abundante

- **Cromatografía en capa fina**
- Se sembró la muestra en la lámina de cromatografía usando un tubo capilar.
- Preparamos la fase móvil correspondiente y se colocó en la cámara cromatográfica. Cubrimos para que se sature.
- Se colocó la lámina cromatográfica en el interior de la cámara. Esperamos hasta que la fase móvil suba por capilaridad a través de la lámina, hasta un centímetro por debajo del borde superior y retiramos.
- Se visualizó la lámina en la lámpara de luz ultravioleta.

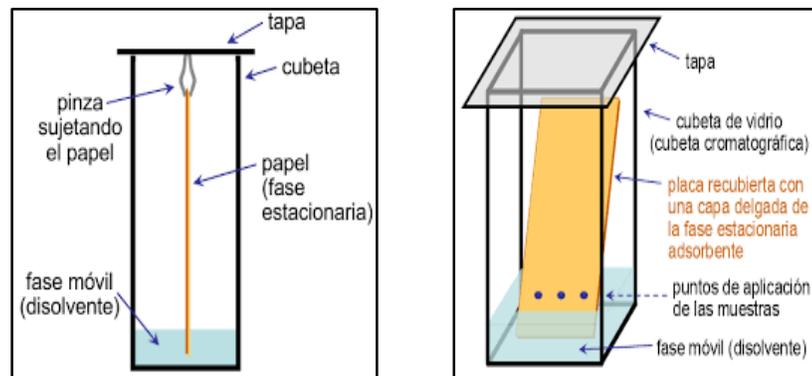


Figura 10. Cromatografía ascendente <sup>7</sup>

### 3.5.2.6 Ensayo microbiológico

Se utilizó el método de Kirby Bauer, consiste en la difusión de una muestra a través de una capa de agar solidificado, en una extensión tal que el crecimiento de microorganismos sensibles es inhibido en zonas alrededor del área que contiene los discos de papel secante impregnados con el antibiótico y la muestra del extracto de *Desmodium molliculum* <sup>50</sup>. Como se observa en el anexo N° 4.

- **Cepa control**

Se trabajó con la cepa control, *Escherichia coli* ATCC 25922.

- **Controles**

Como control negativo se utilizó agua destilada estéril y como control positivo siguiendo lo establecido por el INS <sup>52</sup>, se utilizaron discos de sensibilidad LyD Insumed. SAC de los antibióticos Cloranfenicol (30ug) y Amikacina (30ug) contra *Escherichia coli* ATCC <sup>R</sup> 25922.

- **Medio de cultivo**

Los medios de cultivo utilizados fueron el agar Mueller-Hinton y caldo Trypticase soya. El Agar Mueller-Hinton se adicionó en placas de Petri para ensayo de sensibilidad antibacteriana <sup>52</sup>.

· **Preparación de agar Mueller-Hinton**

- Se utilizó el medio de cultivo Muller-Hinton.
- Se preparó el medio de cultivo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. se pesó 10,88 gr del agar y se disolvió en 320 ml de agua destilada, pH a 7.2-7.4 con solución de NaOH 0.1N.
- Se esterilizó en autoclave a una temperatura de 121° C por 15 minutos.
- Se llevó a baño maría para enfriar a temperatura 48-50°C.
- Se distribuyó el medio en las placas de Petri hasta un nivel aproximado de 4 mm. Esto corresponde a 20 ml de medio en placas Petri de 15 x 100 ml de diámetro interno.

- Se dejó solidificar el medio de cultivo durante 30 minutos.
- **Preparación del estándar (0,5 mc. Farland) para el inóculo**
- Para preparar este estándar se agregó 0.5 ml de BaCL<sub>2</sub> a 9,9 ml de una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Mezclar perfectamente en constante movimiento para mantener la suspensión.
- Se distribuyó de 4 ml a 6 ml en 10 tubos con tapa rosca similares a los que se usarán para preparar el inóculo.
- Se ajustó bien las tapas y se almacenó en un lugar oscuro a temperatura ambiente.
- **Dilución de los diferentes extractos**

Se vertió 100 ml de extracto etanólico el cual se consideró a una concentración al 100 %, a partir de éste se hicieron diluciones con agua destilada estéril para obtener concentraciones al 75 % ,50 % y 25 % respectivamente <sup>4</sup>. Los extractos se guardaron en frascos de color ámbar.

- Concentración al 25% = 25ml de extracto etanólico y 75 ml de agua destilada.
- Concentración al 50% = 50 ml de extracto etanólico y 50 ml de agua destilada.
- Concentración al 75% = 75 ml de extracto etanólico y 25 ml de agua destilada.
- Concentración al 100% = 100 ml de extracto etanólico.

- **Preparación de discos de sensibilidad con el extracto**

Los discos de sensibilidad se prepararon utilizando papel Wattman N°4, empleando un perforador convencional. Estos discos fueron esterilizados en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Luego se procedió a agregar a cada uno de los discos 20 µl de las concentraciones al 25 %, 50 %, 75 % y 100 % del extracto etanólico y se dejó secar a temperatura ambiente.

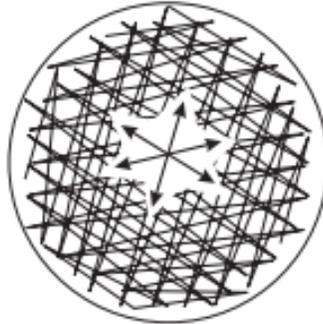
- **Preparación del inóculo**

- Se transfirió la bacteria a un tubo que contiene de 4 a 5 mL de caldo Tripticasa soya.
- Se incubó el caldo a una temperatura entre 35°C a 37°C, hasta que alcance o exceda la turbidez del estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland (por lo general de 2 a 6 horas).
- La suspensión que se preparó contendrá aproximadamente  $1.5 \times 10^9$  U.F.C/mL para *E. coli*. ATCC 25922.

- **Inoculación de las placas**

- Dentro de los 15 minutos siguientes al ajuste de la turbidez del inóculo, se sumergió un hisopo estéril en la suspensión, rotamos varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo.

- Se inoculó la superficie seca de la placa, estriando con el hisopo en tres direcciones para asegurar una distribución uniforme del inóculo ver Figura 11.



**Figura 11.** Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar.

**Fuente:** INS

#### - **Aplicación de los discos**

- Se colocaron los discos individuales de menor a mayor concentración del extracto sobre la superficie del agar de Mueller- Hinton con ayuda de pinzas estériles presionando suavemente para asegurar un contacto completo con la superficie del agar <sup>52</sup>.
- Los discos cargados con las diferentes concentraciones del extracto, los controles positivo y control negativo se colocaron sobre placas inoculadas con *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Un disco no debe ser removido una vez que tomó contacto con la superficie del agar debido a que algunos antibióticos se difunden rápidamente.

#### - **Incubación**

- Después de 15 minutos de aplicar los discos, se incubaron las placas en posición invertida a 35°C durante 18 horas. Después del tiempo recomendado de incubación, se examinó cada placa, donde se

procedió a medir los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco.

- **Medición de los halos de inhibición**
- Se midió la zona de inhibición de cada disco contra una superficie oscura bajo luz reflejada.
- Medimos el diámetro de la zona incluyendo los mm del disco, con una regla o vernier sobre el respaldo de la placa Petri sin remover la placa.

**Cuadro N° 11:** Fórmula para la Determinación del Porcentaje de Efecto Inhibitorio Relativo (PEIR)

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{\text{Diámetro de la muestra} \times 100}{\text{Diámetro del control}}$$

Todos los ensayos fueron llevados por triplicado y se realizó cultivos de control de todas las cepas para comprobar su viabilidad. El criterio utilizado para la clasificación de la actividad antimicrobiana de los extractos evaluados en el cuadro N°12.

**Cuadro N° 12:** Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición.

Actividad antibacteriana	Porcentaje de inhibición
Inactivo	<19%
Poco activo	20 – 30%
Moderadamente activo	31 – 50%
Buena actividad	>61%

**Fuente:** Carvalho Xavier, 2002

### 3.6 PROCESAMIENTO DE DATOS

Se calculó la media y desviación estándar de los diámetros de inhibición, como medidas de tendencia central, obtenidas del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunt) DC. “Manayupa”, que son presentados en tablas y gráficos. Los resultados se evaluaron mediante el método de Análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Science) v.23, por Windows 10, con el fin que tenga consistencia la información levantada de la ejecución del instrumento de investigación. Empleamos este método ya que permite comparar varias medias en diversas situaciones; muy ligado, por tanto, al diseño experimental. Las diferencias entre medidas de grupos fueron analizadas mediante el test de comparaciones múltiples. Valor  $p < 0.05$  fue considerado como significativo. Los resultados muestrales fueron inferidos mediante estimación por intervalo a un 95% de confianza.

#### **Prueba estadística:**

Análisis de Varianza:

Es el procedimiento estadístico que nos sirve para medir la variación total de las observaciones, la que se divide para sus componentes, quedando el residuo como error experimental. Este análisis nos indica la relación entre una variable dependiente (El efecto antibacteriano sobre cultivos de *Escherichia Coli* estudios in vitro) y los factores independientes (Extracto etanólico de *Desmodium molliculum*).

El análisis de varianza es un método en el que se puede comparar dos o más medias de las observaciones, además nos permite medir la variación de las respuestas numéricas como valores de evaluación de diferentes variables.

Se calculó el porcentaje de inhibición del extracto etanólico *Desmodium molliculum* (Kunt) DC, en la prueba de actividad antibacteriana por el método de Difusión en agar (Kirby Bauer), estos valores son presentados en tablas y gráficos, clasificados de acuerdo a las especificaciones.

## CAPITULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1 PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

- **Investigación fitoquímica**

**Tabla N°5:** Interpretación de la cantidad de metabolitos presentes

Muy abundante	+++
Abundante	++
Moderado	+
Escaso	+/-
Ausencia	-

**Tabla N°6:** Lectura de la investigación del tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC.

Principio Activo	Nombre de la Reacción	Resultado	Interpretación
Flavonoides	Reacción de Shinoda	+++	Muy abundante
	Reacción con $Pb(CH_3COO)_2$	++	Abundante
Taninos	Cloruro Férrico al 5%	+++	Muy abundante
	Gelatina Salada	++	Abundante
Aminoácidos	Reacción con Ninhidrina	++	Abundante
Saponinas	Reacción con agua	+++	Muy abundante

<b>Cumarinas</b>	Reacción NaOH al 10%	++	Abundante
<b>Alcaloides</b>	Reacción Dragendorff	+	Moderado
	Reacción Mayer	+	Moderado
	Reacción Wagner	+	Moderado

### **Interpretación de los resultados:**

Como se observa en la tabla N° 6, el extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunt) DC, presento un abundante contenido de metabolitos en su composición.

La presencia de alcaloides en el extracto se presenta como cantidad moderada. Referente a los flavonoides se encuentran en una cantidad abundante gracias a los resultados de las pruebas como son la reacción de Shinoda el color rojo es notable y la reacción de medio alcalino permite observar la coloración anaranjada característica y al añadir FeCl<sub>3</sub> la coloración cambia a una coloración verdosa. Los taninos se encuentran en una cantidad abundante porque al añadir FeCl<sub>3</sub> al 5% la coloración se tornó verde entendiéndose como la presencia de taninos y con la gelatina salada (1% de gelatina + 10 % de NaCl) si se logró identificar el precipitado blanco.

Al analizar la presencia de saponinas se observó la presencia abundante de estos ya que formó una cantidad alta de espuma cuando se añadió agua y se agitó la mezcla. Con respecto a los aminoácidos y Cumarinas se encuentran en cantidad abundante. Gracias a la investigación fitoquímica del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunt) DC. Se logró determinar la

presencia de Alcaloides, Flavonoides, Taninos, Saponinas, Aminoácidos y Cumarinas.

**Tabla 7. Resultados cromatografía del extracto etanólico de *Desmodium molliculum***

Principio activo	Fase Móvil	Revelador	Número de manchas	Rf
Alcaloides	Cloroformo: metanol (18:1)	Reactivo de Dragendorff	1	0.92
Flavonoides	Butanol: ácido acético: agua (4:1:5)	UV Fluorescencia	6	0.98 0.56 0.58 0.18 0.16

**Fuente:** Salazar, Alexis. 2015

Rf = factor de retención de cada compuesto calculado como: distancia recorrida por el compuesto / distancia recorrida por la fase móvil.

#### **Interpretación de los resultados:**

En la cromatografía de capa fina realizada al extracto etanólico de *Desmodium molliculum* a 365 nm para flavonoides se evidenció la presencia de compuestos con fluorescencia verde que corresponderían a 6 flavonoides diferentes. Y una débil fluorescencia a 254 nm en la cromatografía de capa fina para alcaloides indica la presencia de alcaloides.

- **Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro**

**Tabla N°8:** Interpretación del crecimiento bacteriano según el porcentaje de efectividad de la concentración del extracto etanólico

<b>Crecimiento Microbiano</b>	<b>Especificación Crecimiento</b>
-	Ausencia
+/-	Escaso
+	Moderado
++	Abundante
+++	Muy abundante

**Tabla N°9:** Lectura de porcentaje de actividad antibacteriana sobre Escherichia Coli a las 24, 48 y 72 horas.

Concentración	Placa Petri	Tiempo (horas)		
		24h	48h	72h
25 %	1	+++	+++	+++
	2	+++	+++	+++
	3	+++	+++	+++
50 %	1	++	+++	++
	2	+++	++	+++
	3	+++	+++	++
75 %	1	+	+	+/-
	2	+	+/-	+/-
	3	+/-	+	+

<b>100 %</b>	<b>1</b>	+/-	+/-	-
	<b>2</b>	+/-	-	-
	<b>3</b>	-	-	-

**Interpretación de los resultados:**

Como se observa en la tabla N° 9, se presenta los resultados obtenidos del crecimiento de *Escherichia Coli* a las 24, 48 y 72 horas en las diferentes placas petri que se realizaron por triplicado para una mejor apreciación del estudio, Cada placa contiene una determinada concentración del extracto etanólico.

- El extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC, a una concentración al 25% a las 72h no presento actividad antibacteriana significativa, ya que se observó crecimiento bacteriano muy abundante, de la misma manera a una concentración al 50% a las 72h presentó crecimiento abundante de la bacteria y no se evidenció formación del halo de inhibición.
- A una concentración al 75% a las 24h se observó escaso crecimiento bacteriano, a las 48 y 72h no se observó cambio significativo, pero si se evidenció formación tenue del halo de inhibición.
- A una concentración al 100% a las 24h se observó escaso crecimiento bacteriano, a las 48 y 72 h se observó evidencia de la formación de los halos de inhibición muy notorios, demostrando el efecto antibacteriano que posee el extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC.

**Tabla N° 10: Lectura de formación de los halos de inhibición según el porcentaje de efectividad de la concentración del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC**

Concentración del extracto	Lectura									Σ	Promedio (mm)
	24 horas			48 horas			72 horas				
	Lectura 1 (mm)	Lectura 2 (mm)	Lectura 3 (mm)	Lectura 1 (mm)	Lectura 2 (mm)	Lectura 3 (mm)	Lectura 1 (mm)	Lectura 2 (mm)	Lectura 3 (mm)		
25 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
50 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
75 %	4	4	4	5	5	4	6	6	5	43	4,77
100 %	6	4	6	10	10	12	14	16	16	93.99	10,44
Amikacina	16	18	16	22	22	20	28	28	26	196	21,77
Cloranfenicol	12	12	10	14	14	12	16	16	18	124	13,77
Agua Destilada 0 %	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

### **Interpretación de los resultados:**

De acuerdo a lo reportado en la tabla N° 10, los resultados obtenidos de la Lectura de formación de los halos de inhibición son:

- El extracto a una concentración al 25 y 50% no presentan formación del halo de inhibición, por lo tanto a dicha concentración no posee efecto antibacteriano.
- El extracto a una concentración al 75% si presenta formación del halo de inhibición en las muestras por triplicado que se realizó, el mejor resultado se observó a las 72 h de incubado. La suma promedio fue de 43 y el rango promedio de 4,77.
- Se reporta que el extracto a una concentración al 100% si presenta formación del halo de inhibición en las muestras por triplicado que se realizó, los resultados fueron más significantes en comparación a la concentración al 75%. La suma promedio fue de 93.99 y el rango promedio de 10,44.
- En las muestras procesadas por triplicado, los resultados en los controles positivos fueron: el antibiótico Amikacina fue mejor en comparación al Cloranfenicol, presentando mayor medida de la formación de los halos de inhibición. La suma promedio fue de 196 y el rango promedio de 21,77 mientras que Cloranfenicol la suma promedio fue de 124 y el rango promedio de 13,77.

### Fórmula para la determinación del porcentaje de inhibición.

El porcentaje de Efecto Inhibitorio Relativo (PEIR) se calculó aplicando la siguiente fórmula <sup>(53)</sup> teniendo como referencia la medición del diámetro de la zona de inhibición del control positivo y la medición del halo de los extractos ensayados.

### Porcentaje de Efecto Inhibitorio Relativo (PEIR)

$$\text{PEIR} = \frac{\text{X } \emptyset \text{ Halo de inhibición del extracto}}{\text{X } \emptyset \text{ Halo de inhibición del control positivo}} \times 100$$

El halo de inhibición del desarrollo de *Escherichia Coli* promedio del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunt) DC a 75% es 4,77 mm y de la Amikacina como fármaco de referencia es 21,77 mm.

$$\text{PEIR} = \frac{4,77}{21,77} \times 100 = 21,91\%$$

El halo de inhibición del desarrollo de *Escherichia Coli* promedio del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunt) DC a 100% es 10,44 mm y de la Amikacina como fármaco de referencia es 21,77 mm.

$$\text{PEIR} = \frac{10,44}{21,77} \times 100 = 47,96\%$$

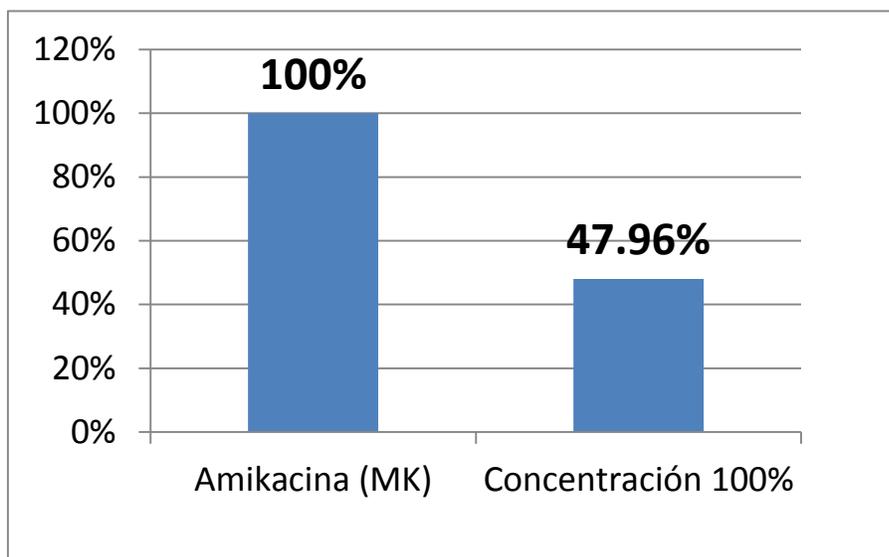
El halo de inhibición del desarrollo de *Escherichia Coli* promedio del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunt) DC a 75% es 4,77 mm y del Cloranfenicol como fármaco de referencia es 13,77 mm.

$$\text{PEIR} = \frac{4,77}{13,77} \times 100 = 34,64\%$$

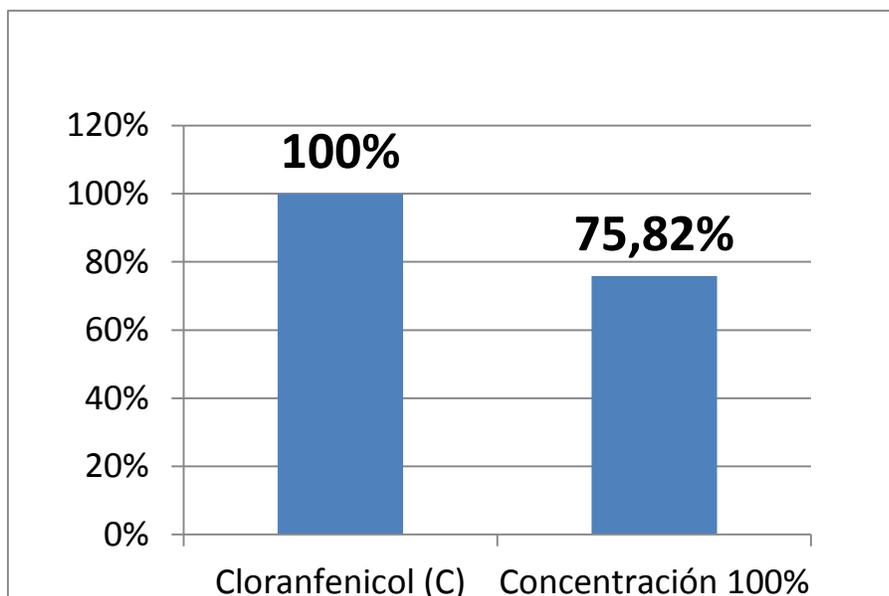
El halo de inhibición del desarrollo de *Escherichia Coli* promedio del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunt) DC a 100% es 10,44 mm y del Cloranfenicol como fármaco de referencia es 13,77 mm.

$$\text{PEIR} = \frac{10,44}{13,77} \times 100 = 75,82\%$$

**Grafico 1.** Porcentaje de efecto inhibitorio relativo de la Amikacina vs. El extracto etanólico (100%)



**Grafico 2.** Porcentaje de efecto inhibitorio relativo del cloranfenicol vs. El extracto etanólico (100%)



**Tabla N° 11: Porcentaje de inhibición del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. según concentración. (Expresados en %)**

Concentración del extracto	Promedio (mm)
25%	0
50%	0
75%	4,77
100%	13,77
Amikacina (AMK)	21,77
Cloranfenicol (C)	13,77

Concentración del extracto vs control positivo	Porcentaje de inhibición	Actividad antibacteriana
Extracto de 75 % vs Amikacina	21,96%	Poco activo
Extracto de 100 % vs Amikacina	47,96%	Moderadamente activo
Extracto de 75 % vs Cloranfenicol	34,64%	Moderadamente activo
Extracto de 100 % vs Cloranfenicol	75,82%	Buena actividad

### **Interpretación de los resultados:**

Se aplicó la fórmula para la determinación del porcentaje de inhibición.

- En el extracto a una concentración de 25 y 50% se reporta ausencia de formación del halo de inhibición, Mientras en el extracto a una concentración de 75% reporta 21,96 % de efecto inhibitorio tomando como referencia a la Amikacina (MK) que tendrá el 100% de efectividad y en comparación con el cloranfenicol (C) fue de 34,64% de efecto inhibitorio.
- En el extracto a una concentración de 100% reporta 47,96% de efecto inhibitorio tomando como referencia a la Amikacina (MK) que tendrá el 100%

de efectividad y en comparación con el Cloranfenicol (C) fue de 75,82% de efecto inhibitorio.

### Análisis estadístico de los resultados obtenidos en los ensayos in vitro.

**Tabla N° 12:** Análisis de la varianza (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunt) DC. sobre cultivos de *Escherichia coli* a las 24h

#### Unidireccional

Descriptivos						
Lectura_1_24h						
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
25%	3	,00	,000	,000	,00	,00
50%	3	,00	,000	,000	,00	,00
75%	3	4,00	,000	,000	4,00	4,00
100%	3	5,33	1,155	,667	2,46	8,20
Amikacina	3	18,67	3,055	1,764	11,08	26,26
Cloranfenicol	3	11,33	1,155	,667	8,46	14,20
Agua destilada	3	,00	,000	,000	,00	,00
Total	21	5,62	6,801	1,484	2,52	8,71

ANOVA					
Lectura_1_24h					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	900,952	6	150,159	87,593	,000
Dentro de grupos	24,000	14	1,714		
Total	924,952	20			

**Tabla N° 13:** Análisis de la varianza (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. sobre cultivos de *Escherichia coli* a las 48h

**Unidireccional**

Descriptivos						
Lectura_1_48h						
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
25%	3	,00	,000	,000	,00	,00
50%	3	,00	,000	,000	,00	,00
75%	3	4,67	,577	,333	3,23	6,10
100%	3	10,67	1,155	,667	7,80	13,54
Amikacina	3	21,33	1,155	,667	18,46	24,20
Cloranfenicol	3	13,33	1,155	,667	10,46	16,20
Agua destilada	3	,00	,000	,000	,00	,00
Total	21	7,14	7,882	1,720	3,55	10,73

ANOVA					
Lectura_1_48h					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1233,905	6	205,651	332,205	,000
Dentro de grupos	8,667	14	,619		
Total	1242,571	20			

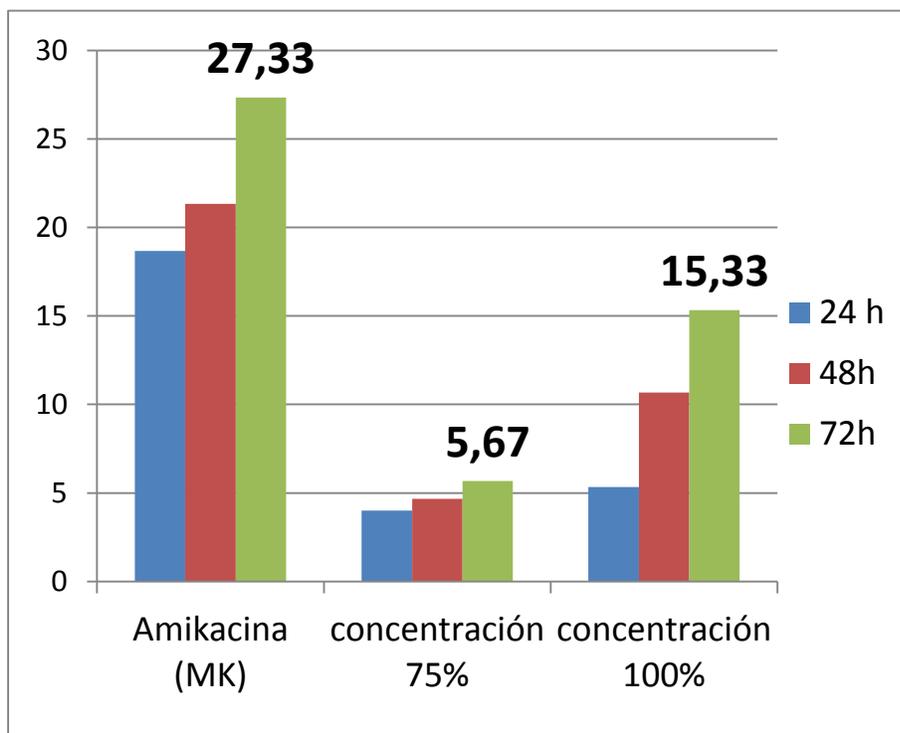
**Tabla N° 14:** Análisis de la varianza (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. sobre cultivos de *Escherichia coli* a las 72h

**Unidireccional**

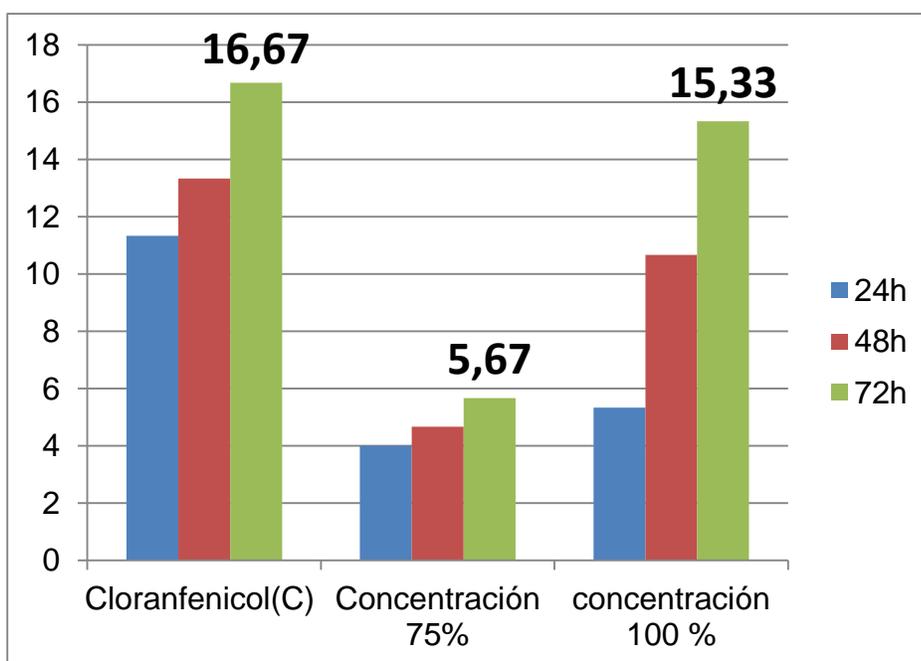
Descriptivos						
Lectura_1_72h						
	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
25%	3	,00	,000	,000	,00	,00
50%	3	,00	,000	,000	,00	,00
75%	3	5,67	,577	,333	4,23	7,10
100%	3	15,33	1,155	,667	12,46	18,20
Amikacina	3	27,33	1,155	,667	24,46	30,20
Cloranfenicol	3	16,67	1,155	,667	13,80	19,54
Agua destilada	3	,00	,000	,000	,00	,00
Total	21	9,29	10,184	2,222	4,65	13,92

ANOVA					
Lectura_1_72h					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2065,619	6	344,270	556,128	,000
Dentro de grupos	8,667	14	,619		
Total	2074,286	20			

**Grafico 3.** Lectura de formación de los halos de inhibición según el porcentaje de efectividad de la concentración del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC al 75 % y 100% vs Amikacina (MK) a las 24, 48, y 72h



**Grafico 4.** Lectura de formación de los halos de inhibición según el porcentaje de efectividad de la concentración del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) dc al 75 % y 100% vs cloranfenicol (c) a las 24, 48, y 72h



### **Interpretación de los resultados estadísticos:**

Las tablas 12, 13 y 14 muestran el Análisis de Varianza de los efectos sobre los cultivos de *Escherichia Coli* con sus pruebas de comparaciones múltiples e intervalos de confianza al 95% según lo siguiente:

Para la bacteria *Escherichia coli* se encontraron significancias estadísticas, en el modelo corregido ( $p=0,000$ ), de igual forma para la intersección entre extracto etanólico, la bacteria y la concentración se determinó significancia estadística ( $p=0,000$ ) lo mismo para los diferentes niveles de concentraciones ( $p =0,000$ ).

La tabla 13 muestra la media de las concentraciones a las 72 h, la concentración al 75% es de 5,67, al 100% es de 15,33. Mientras que los controles positivos, Amikacina es de 27,33 y Cloranfenicol es de 16,67. Por lo tanto se aprecia que el extracto etanólico en la concentración al 100% a las 72h posee efecto antibacteriano aproximado al efecto de cloranfenicol(C).

**Tabla N° 15:** Contrastes post hoc y comparaciones múltiples (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. Sobre cultivos de *Escherichia coli* a las 24h

**Pruebas post hoc**

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: Lectura_1_24h							
	(I) Concentración del extracto	(J) Concentración del extracto	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	25%	50%	,000	1,069	1,000	-3,65	3,65
		75%	-4,000 <sup>†</sup>	1,069	,028	-7,65	-,35
		100%	-5,333 <sup>†</sup>	1,069	,003	-8,98	-1,68
		Amikacina	-18,667 <sup>†</sup>	1,069	,000	-22,32	-15,02
		Cloranfenicol	-11,333 <sup>†</sup>	1,069	,000	-14,98	-7,68
		Agua destilada	,000	1,069	1,000	-3,65	3,65
	50%	25%	,000	1,069	1,000	-3,65	3,65
		75%	-4,000 <sup>†</sup>	1,069	,028	-7,65	-,35
		100%	-5,333 <sup>†</sup>	1,069	,003	-8,98	-1,68
		Amikacina	-18,667 <sup>†</sup>	1,069	,000	-22,32	-15,02
		Cloranfenicol	-11,333 <sup>†</sup>	1,069	,000	-14,98	-7,68
		Agua destilada	,000	1,069	1,000	-3,65	3,65
	75%	25%	4,000 <sup>†</sup>	1,069	,028	,35	7,65
		50%	4,000 <sup>†</sup>	1,069	,028	,35	7,65
		100%	-1,333	1,069	,864	-4,98	2,32
		Amikacina	-14,667 <sup>†</sup>	1,069	,000	-18,32	-11,02
		Cloranfenicol	-7,333 <sup>†</sup>	1,069	,000	-10,98	-3,68
		Agua destilada	4,000 <sup>†</sup>	1,069	,028	,35	7,65
	100%	25%	5,333 <sup>†</sup>	1,069	,003	1,68	8,98
		50%	5,333 <sup>†</sup>	1,069	,003	1,68	8,98
		75%	1,333	1,069	,864	-2,32	4,98
Amikacina		-13,333 <sup>†</sup>	1,069	,000	-16,98	-9,68	
Cloranfenicol		-6,000 <sup>†</sup>	1,069	,001	-9,65	-2,35	
Agua destilada		5,333 <sup>†</sup>	1,069	,003	1,68	8,98	
Amikacina	25%	18,667 <sup>†</sup>	1,069	,000	15,02	22,32	
	50%	18,667 <sup>†</sup>	1,069	,000	15,02	22,32	

		75%	14,667*	1,069	,000	11,02	18,32
		100%	13,333*	1,069	,000	9,68	16,98
		Cloranfenicol	7,333*	1,069	,000	3,68	10,98
		Agua destilada	18,667*	1,069	,000	15,02	22,32
	Cloranfenicol	25%	11,333*	1,069	,000	7,68	14,98
		50%	11,333*	1,069	,000	7,68	14,98
		75%	7,333*	1,069	,000	3,68	10,98
		100%	6,000*	1,069	,001	2,35	9,65
		Amikacina	-7,333*	1,069	,000	-10,98	-3,68
		Agua destilada	11,333*	1,069	,000	7,68	14,98
	Agua destilada	25%	,000	1,069	1,000	-3,65	3,65
		50%	,000	1,069	1,000	-3,65	3,65
		75%	-4,000*	1,069	,028	-7,65	-,35
		100%	-5,333*	1,069	,003	-8,98	-1,68
		Amikacina	-18,667*	1,069	,000	-22,32	-15,02
		Cloranfenicol	-11,333*	1,069	,000	-14,98	-7,68

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

**Tabla N° 16:** Contrastes post hoc y comparaciones múltiples (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. Sobre cultivos de *Escherichia coli* a las 48h

### Pruebas post hoc

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: Lectura_1_48h							
	(I) Concentración del extracto	(J) Concentración del extracto	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
HSD	25%	50%	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
Tukey		75%	-4,667*	,642	,000	-6,86	-2,47
		100%	-10,667*	,642	,000	-12,86	-8,47

	Amikacina	-21,333 <sup>†</sup>	,642	,000	-23,53	-19,14
	Cloranfenicol	-13,333 <sup>†</sup>	,642	,000	-15,53	-11,14
	Agua destilada	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
50%	25%	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
	75%	-4,667 <sup>†</sup>	,642	,000	-6,86	-2,47
	100%	-10,667 <sup>†</sup>	,642	,000	-12,86	-8,47
	Amikacina	-21,333 <sup>†</sup>	,642	,000	-23,53	-19,14
	Cloranfenicol	-13,333 <sup>†</sup>	,642	,000	-15,53	-11,14
	Agua destilada	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
75%	25%	4,667 <sup>†</sup>	,642	,000	2,47	6,86
	50%	4,667 <sup>†</sup>	,642	,000	2,47	6,86
	100%	-6,000 <sup>†</sup>	,642	,000	-8,19	-3,81
	Amikacina	-16,667 <sup>†</sup>	,642	,000	-18,86	-14,47
	Cloranfenicol	-8,667 <sup>†</sup>	,642	,000	-10,86	-6,47
	Agua destilada	4,667 <sup>†</sup>	,642	,000	2,47	6,86
100%	25%	10,667 <sup>†</sup>	,642	,000	8,47	12,86
	50%	10,667 <sup>†</sup>	,642	,000	8,47	12,86
	75%	6,000 <sup>†</sup>	,642	,000	3,81	8,19
	Amikacina	-10,667 <sup>†</sup>	,642	,000	-12,86	-8,47
	Cloranfenicol	-2,667 <sup>†</sup>	,642	,013	-4,86	-,47
	Agua destilada	10,667 <sup>†</sup>	,642	,000	8,47	12,86
Amikacina	25%	21,333 <sup>†</sup>	,642	,000	19,14	23,53
	50%	21,333 <sup>†</sup>	,642	,000	19,14	23,53
	75%	16,667 <sup>†</sup>	,642	,000	14,47	18,86
	100%	10,667 <sup>†</sup>	,642	,000	8,47	12,86
	Cloranfenicol	8,000 <sup>†</sup>	,642	,000	5,81	10,19
	Agua destilada	21,333 <sup>†</sup>	,642	,000	19,14	23,53
Cloranfenicol	25%	13,333 <sup>†</sup>	,642	,000	11,14	15,53
	50%	13,333 <sup>†</sup>	,642	,000	11,14	15,53
	75%	8,667 <sup>†</sup>	,642	,000	6,47	10,86
	100%	2,667 <sup>†</sup>	,642	,013	,47	4,86
	Amikacina	-8,000 <sup>†</sup>	,642	,000	-10,19	-5,81
	Agua destilada	13,333 <sup>†</sup>	,642	,000	11,14	15,53
Agua destilada	25%	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
	50%	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
	75%	-4,667 <sup>†</sup>	,642	,000	-6,86	-2,47

	100%	-10,667 <sup>*</sup>	,642	,000	-12,86	-8,47
	Amikacina	-21,333 <sup>*</sup>	,642	,000	-23,53	-19,14
	Cloranfenicol	-13,333 <sup>*</sup>	,642	,000	-15,53	-11,14

**Tabla N° 17:** Contrastes post hoc y comparaciones múltiples (ANOVA) de los efectos entre los halos de inhibición por extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. Sobre cultivos de *Escherichia coli* a las 72h

**Pruebas post hoc**

Comparaciones múltiples							
Variable dependiente: Lectura_1_72h							
	(I) Concentración del extracto	(J) Concentración del extracto	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
HSD Tukey	25%	50%	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
		75%	-5,667 <sup>*</sup>	,642	,000	-7,86	-3,47
		100%	-15,333 <sup>*</sup>	,642	,000	-17,53	-13,14
		Amikacina	-27,333 <sup>*</sup>	,642	,000	-29,53	-25,14
		Cloranfenicol	-16,667 <sup>*</sup>	,642	,000	-18,86	-14,47
		Agua destilada	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
	50%	25%	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
		75%	-5,667 <sup>*</sup>	,642	,000	-7,86	-3,47
		100%	-15,333 <sup>*</sup>	,642	,000	-17,53	-13,14
		Amikacina	-27,333 <sup>*</sup>	,642	,000	-29,53	-25,14
		Cloranfenicol	-16,667 <sup>*</sup>	,642	,000	-18,86	-14,47
		Agua destilada	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
	75%	25%	5,667 <sup>*</sup>	,642	,000	3,47	7,86
		50%	5,667 <sup>*</sup>	,642	,000	3,47	7,86
		100%	-9,667 <sup>*</sup>	,642	,000	-11,86	-7,47
		Amikacina	-21,667 <sup>*</sup>	,642	,000	-23,86	-19,47
		Cloranfenicol	-11,000 <sup>*</sup>	,642	,000	-13,19	-8,81
		Agua destilada	5,667 <sup>*</sup>	,642	,000	3,47	7,86
	100%	25%	15,333 <sup>*</sup>	,642	,000	13,14	17,53
		50%	15,333 <sup>*</sup>	,642	,000	13,14	17,53
		75%	9,667 <sup>*</sup>	,642	,000	7,47	11,86

	Amikacina	-12,000 <sup>*</sup>	,642	,000	-14,19	-9,81
	Cloranfenicol	-1,333	,642	,415	-3,53	,86
	Agua destilada	15,333 <sup>*</sup>	,642	,000	13,14	17,53
Amikacina	25%	27,333 <sup>*</sup>	,642	,000	25,14	29,53
	50%	27,333 <sup>*</sup>	,642	,000	25,14	29,53
	75%	21,667 <sup>*</sup>	,642	,000	19,47	23,86
	100%	12,000 <sup>*</sup>	,642	,000	9,81	14,19
	Cloranfenicol	10,667 <sup>*</sup>	,642	,000	8,47	12,86
	Agua destilada	27,333 <sup>*</sup>	,642	,000	25,14	29,53
Cloranfenicol	25%	16,667 <sup>*</sup>	,642	,000	14,47	18,86
	50%	16,667 <sup>*</sup>	,642	,000	14,47	18,86
	75%	11,000 <sup>*</sup>	,642	,000	8,81	13,19
	100%	1,333	,642	,415	-,86	3,53
	Amikacina	-10,667 <sup>*</sup>	,642	,000	-12,86	-8,47
	Agua destilada	16,667 <sup>*</sup>	,642	,000	14,47	18,86
Agua destilada	25%	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
	50%	,000	,642	1,000	-2,19	2,19
	75%	-5,667 <sup>*</sup>	,642	,000	-7,86	-3,47
	100%	-15,333 <sup>*</sup>	,642	,000	-17,53	-13,14
	Amikacina	-27,333 <sup>*</sup>	,642	,000	-29,53	-25,14
	Cloranfenicol	-16,667 <sup>*</sup>	,642	,000	-18,86	-14,47

\*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

### Interpretación de los resultados estadísticos:

La tabla 15, 16 y 17 muestra las comparaciones múltiples de los efectos entre los halos de inhibición por extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. Sobre cultivos de *Escherichia Coli* del que se aprecia lo siguiente:

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los halos de inhibición según niveles de concentración del extracto etanólico para *Escherichia coli* con significancias ( $p=0,000$ )  $p<0,05$ ; siendo la de mayor diferencia la del nivel de concentración al 100% en comparación con los demás niveles.

## 4.2 CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

- El extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. Presentó formación de halos de inhibición por lo tanto influye de manera significativa en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro.
- El extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. en concentración al 25% no presentó influencia significativa en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro. Ya que no se observa formación del halo de inhibición, por lo tanto a dicha concentración no posee efecto antibacteriano.
- El extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC, en concentración al 50% no presentó influencia significativa en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro. Ya que no se observa formación del halo de inhibición, por lo tanto a dicha concentración no posee efecto antibacteriano.
- El extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC, en concentración al 75% si presentó influencia significativa en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro. Ya que se observa formación del halo de inhibición a las 24h de incubado, los mejores resultados se vieron a las 72h de incubación, por lo tanto a dicha concentración si posee efecto antibacteriano.
- El extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC, en concentración al 100% si presentó influencia significativa en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro. Ya que se observa formación del halo de inhibición a las 24h de incubado, los mejores resultados se vieron a las 72h de incubación, por lo tanto a dicha concentración si posee efecto antibacteriano.

### 4.3 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Con el presente estudio se comprueba que el extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. A una concentración de 75 y 100% si posee efecto antibacteriano en cultivos de *Escherichia Coli*, estudios in vitro.

Las propiedades antibacterianas a partir de productos vegetales han sido comprobadas a través de intensas investigaciones. Generalmente, son evaluadas y confirmadas a través de ensayos biológicos in vivo e in vitro, por medio de pruebas de sensibilidad con métodos de difusión en Agar como en la presente investigación. En su estudio Rastogi S<sup>8</sup> Señala que el género *Desmodium gangeticum* y *Desmodium adscendens* mostraron un amplio espectro de actividades farmacológicas in vitro e in vivo. La investigación fitoquímica de estas especies ha llevado al aislamiento de alcaloides, esteroides, flavonoides, saponinas, triterpenoides.

Metabolitos que serían los posibles responsables de la actividad farmacológica y la eficacia terapéutica antiinflamatoria. “Estiguar, J. confirmó “la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC”. En bacteria *Staphylococcus aureus* estudio in vitro siendo un 96 % tan efectiva como la dicloxacilina, “dando como responsables de la actividad antibacteriana de esta especie a principios activos como: alcaloides, esteroides, flavonoides siendo los más abundantes luego del análisis fitoquímico<sup>4</sup>.

Luego del análisis de los resultados de la investigación fitoquímica del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. Se determinó un abundante contenido de metabolitos en su composición, La presencia de alcaloides es moderada, también posee flavonoides en abundancia, taninos, saponinas aminoácidos y Cumarinas.

En nuestro país Bonilla et al., publicaron un estudio sobre la Evaluación Fitoquímica y Actividad Biológica de *Desmodium molliculum*, dando como resultado “la presencia de aminoácidos, taninos, compuestos fenólicos, esteroides y/o triterpenos, quinonas y leucoantocianidinas; destacando como

principales metabolitos activos a los flavonoides y esteroides y/o triterpenos”<sup>2</sup>. Demostrando así su relación con los usos tradicionales de los pueblos nativos en problemas de inflamación <sup>2</sup>. Posiblemente la actividad antibacteriana que se aprecia en esta investigación es consecuencia de la presencia de flavonoides y alcaloides que científicamente ha evidenciado su actividad antibacteriana. Sin embargo, existe la necesidad de estudiar a fondo estos metabolitos secundarios y descubrir su modo de acción, farmacocinética, biodisponibilidad y vías fisiológicas con suficiente detalle.

En la prueba de cromatografía en capa fina a 365 nm para flavonoides se evidenció la presencia de compuestos con fluorescencia verde que corresponderían a 6 flavonoides diferentes, observando 6 manchas en la placa. Y una débil fluorescencia a 254 nm en la cromatografía de capa fina para alcaloides que indicaría la presencia de alcaloides.

Al analizar los resultados conseguidos por el método de difusión en agar, podemos señalar que este método es apropiado para evaluar de manera cualitativa la actividad antibacteriana de extractos naturales, tal como señala el INS <sup>53</sup>. Los parámetros que deben tomarse en cuenta para que los resultados aportados sean comparables con los indicados por otros autores, deben ser: medio de cultivo, condiciones de incubación, concentración de inóculo inicial del microorganismo, y concentración del producto ensayado.

En lo referente a los resultados obtenidos en el extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC., podemos señalar que la bacteria utilizada en la determinación de la actividad antibacteriana; *Escherichia coli* ATCC 25922, demostró que el extracto etanólico a una concentración al 75% presentó moderada actividad antibacteriana significativa, mientras que el extracto etanólico a una concentración al 100% presentó una mejor actividad antibacteriana significativa ya que la medición de los halos fue mayor. Demostrándose así que las concentraciones del extracto etanólico de

*Desmodium molliculum* (Kunth) DC., con actividad antibacteriana fueron al 75 y 100%.

Además, podemos indicar que hubo diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en los diámetros de los halos de inhibición de las diferentes concentraciones del extracto etanólico frente a *Escherichia coli*, destacándose las concentraciones al 75% y 100%. Considerando así que poseen efecto antibacteriano activo frente a los cultivos de *Escherichia Coli*. La razón de estas diferencias en la actividad del extracto etanólico puede deberse a que sustancias como: flavonoides, alcaloides, fenoles, taninos se encuentran en mayor proporción, ya que según Rastogi S, <sup>8</sup> éstos y otros compuestos como las quinonas, terpenos, y alcaloides son responsables de la actividad antibacteriana de la especie *Desmodium*.

El efecto antibacteriano del extracto de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. Se obtuvo, calculando los porcentajes del efecto inhibitorio relativo (PEIR) de las concentraciones al 75% y 100% siendo estas concentraciones las que presentaron formación del halo de inhibición, Obteniendo los mayores valores con PEIR de 75,82 respecto a Cloranfenicol (C) a una concentración al 100 % seguido del PEIR 47,96 % respecto a Amikacina (MK) y la concentración al 75% con PEIR de 34,64% respecto a Cloranfenicol (C) y 21,96% respecto a Amikacina (MK). Por lo tanto se aprecia que el extracto etanólico en la concentración al 100% posee efecto antibacteriano aproximado al efecto de cloranfenicol (C).

## **CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

### **5.1 CONCLUSIONES**

- El extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. influye de manera significativa en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro.
- El extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. en las concentraciones de 25 % y 50 %, no presentaron formación del halo de inhibición por lo tanto no influye de manera significativa en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro.
- El extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. en las concentraciones de 75 % y 100 %, si influyen de manera significativa en el efecto antibacteriano en los cultivos de *Escherichia coli*, estudios in vitro.
- La concentración al 100% del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. Presentó efecto inhibitorio aproximado al fármaco control Cloranfenicol (C) en cultivos de *Escherichia coli*., estudios in vitro.

### **5.2 RECOMENDACIONES**

A nivel del gobierno nacional, regional y local, formular y gestionar planes de promoción de la salud y prevención para disminuir la práctica de automedicación con antibacterianos. Informar, educar y concientizar a todas las diferentes instituciones relacionadas como el Ministerio de Salud, para que a través de la Dirección General de Medicamentos Insumos y Drogas (DIGEMID) se realicen las acciones necesarias para profundizar el seguimiento en los centros de dispensación de medicamentos como: Farmacias, Boticas y demás centros de salud existentes en el país.

De la misma manera que se intensifique el apoyo a nuevas investigaciones del campo fitoquímico, ya que existe un gran potencial de *Desmodium molliculum* que debe aprovecharse para el beneficio de la salud.

Los centros Universitarios deben promover conjuntamente con la autoridad de la cual deriva, el estudio de las diferentes plantas nativas que posee nuestro país, Realizar nuevas investigaciones que permitan profundizar el conocimiento de las características que determinan o condicionan la presencia de nuevos metabolitos con propiedades terapéuticas.

Concientizar la presencia y el aporte del químico farmacéutico, como profesional de la salud cumpliendo con su rol frente a la población, orientando y educando a los pacientes sobre el uso correcto de los antibióticos, las reacciones adversas de los mismos y los peligros de la automedicación.

Promover el estudio de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC., ya que posee un gran potencial para futuras investigaciones. Pues por los metabolitos que esta presenta se puede determinar que posea otras propiedades biológicas para lo cual se deberá realizar un monitoreo para detectar la mayor cantidad de compuestos con posibilidad de actividad farmacológica.

El extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. Siempre debe permanecer en frascos ámbar para evitar el daño de los metabolitos secundarios por efecto de la fotorradiación.

Analizar si los extractos obtenidos, poseen los mismos efectos antibacterianos en periodos de tiempo mayores al utilizado en esta investigación.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Herrera L, “Contribución al estudio florístico de la provincia de concepción, (Junín): Dicotiledóneas”. Tesis para optar el título de Químico Farmacéutico. p. 79. UNMSM. 2002.
2. Acaro F, Arroyo J, “Efecto anticonceptivo y postcoital del extracto etanólico de las hojas del *Desmodium molliculum* (HBK).DC “Manayupa” en ratas hembras Holtzmann.” Facultad de farmacia y bioquímica. Unidad de postgrado. Tesis de la Facultad de Farmacia y Bioquímica Unidad de Post- Grado, Lima- Perú, 2010.
3. Hanco Y, Gonzales I, Vargas R, “Efecto del *Desmodium molliculum* (Manayupa) sobre la fertilidad y el peso en ratas” “*rattus norvegicus*”. Arequipa, 2016.
4. Landeta J., Naranjo L., “Evaluación de la actividad antibacteriana de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC. Treinta Reales, utilizando un modelo in vivo” Quito, Marzo, 2015.
5. Nancy Lozano R, Pablo Bonilla R, Jorge Arroyo A “Evaluación Fitoquímica y Actividad Biológica de *Desmodium molliculum* (H.B.K.) D.C. (Manayupa)” Instituto de Ciencias Farmacéuticas y Recursos Naturales, Facultad de Farmacia y Bioquímica UNMSM. Ciencia e Investigación Vol. IV (2), 2001.
6. Camasca Vargas A, Estudio de la demanda y estimación del valor cultural y económico de plantas medicinales comercializadas en la ciudad de Ayacucho Lima-Perú 2012.
7. Acero Carrión B, Millones Sánchez D, Ticona Rebagliati I, Torres Bravo L, “Actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* en el modelo murino de asma.” Estudiante de Medicina. Facultad de Medicina Humana “San Fernando, UNMSM. Lima, Perú 2012.
8. Rastogi S, Pandey M, & Rawat A, K. S. “An ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological profile of *Desmodium gangeticum* (L.) DC. and *Desmodium adscendens* (Sw.) DC”. (2011). Journal of Ethnopharmacology An Interdisciplinary Journal Devoted to Indigenous Drugs”.136 (2011) 283–296.
9. Salazar Toaquiza A., “Estudio Fitoquímico del Extracto Etanólico *Desmodium adscendens* (Hierba del infante) y Elaboración de una Técnica de Cuantificación del Metabolito de mayor presencia” Riobamba, Ecuador 2015.

10. Barría Acosta G., Sánchez Tello A, “Actividad Antimicrobiana de los Extractos Vegetales de *Senna reticulata* (willd) “Retama” Sobre Microorganismos Patógenos”. Iquitos-2012.
11. www.facmed Escherichia coli diarrogénica [Internet]. México: 2012[consultado 3 agosto 2017]. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>
12. Hernández Álvarez E, “*Escherichia Coli*. Productores de Blee aislados de Urocultivo: implicaciones en el Diagnóstico Y tratamiento de la Infección Urinaria.” Madrid, 2010.
13. Morote Castro E, “Prevalencia de E. Coli BLEE en pacientes mujeres del Hospital Nacional PNP” – “LNS”. LIMA – PERÚ – 2015
14. León Rodríguez L, “Multirresistencia Antimicrobiana de Cepas *Escherichia coli* Productoras de Betalactamasas de espectro extendido (blee) aislados en Urocultivo del hospital regional “Manuel Nuñez Butrón” puno, 2012.
15. Sociedad Peruana de Derecho Ambiental [Internet]. Análisis de Potenciales Casos de Biopiratería en el Perú; 2005[consultado el 10 de septiembre de 2017] Disponible en: <http://cendoc.esan.edu.pe/fulltext/e-documents/SerieIniciativa3.pdf>.
16. Conocimientos tradicionales [Internet], plantas naturales de Cajamarca; 2012 [consultado el 17 de septiembre de 2017]. Disponible en: [http://www.pdrs.org.pe/img\\_upload\\_pdrs/36c22b17acbae902af95f805cbae1ec5/Plantas\\_Medicinales\\_de\\_Cajamarca\\_inc.\\_fe\\_de\\_erratas.pdf](http://www.pdrs.org.pe/img_upload_pdrs/36c22b17acbae902af95f805cbae1ec5/Plantas_Medicinales_de_Cajamarca_inc._fe_de_erratas.pdf).
17. Biblioteca Digital; *Desmodium molliculum*; [Internet] Lámina XIII (2731). Disponible en: [http://bibdigital.rjb.csic.es/Imagenes/Ff\(8\)MUT\\_FI\\_Exp\\_Bot\\_N\\_Gra\\_20\\_01/MUT\\_FI\\_Exp\\_Bot\\_N\\_Gra\\_20\\_01\\_064.pdf](http://bibdigital.rjb.csic.es/Imagenes/Ff(8)MUT_FI_Exp_Bot_N_Gra_20_01/MUT_FI_Exp_Bot_N_Gra_20_01_064.pdf)
18. Tropilab, 2005. [Internet] *Desmodium adscendens* Disponible en: <http://www.tropilab.com/desmodium-ad.html>.
19. Nikolai Sharapin. (2000) Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos (págs. 198) primera edición Marzo.
20. Uso Industrial de Plantas Aromáticas y Medicinales 2009. Disponible en: <http://ocw.upm.es/ingenieria-agroforestal/uso-industrial-de-plantas-aromaticas-y-medicinales/contenidos/material-de-clase/tema12.pdf>.

21. Ávalos García A, Pérez-Urria Carril E, Metabolismo secundario de plantas. Departamento de Biología Vegetal I. 2 (3): 119-145, (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad Complutense. Madrid 2009.
22. Obtenido de: Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, México, 2009. [consultado el 11 de julio de 2017]. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/atlas.php>.
23. Tamizaje fotoquímico, 2006. Disponible en: <file:///C:/Documents%20and%20Settings/Administrador/Mis%20documentos/Downloads/Tamizaje%20fitoquimico.pdf>.
24. Departamento de Salud Pública. [Internet], Facultad de Medicina, UNAM. [consultado el 13 de noviembre de 2017] Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/enfermedades-vias-urinarias.html>
25. Farmacognosia, 2009[Internet]. [Consultado el 10 de julio de 2017]. Disponible en: <http://farmacognosia-.blogspot.pe/>.
26. OMS, Escherichia Coli, 2016. [Internet], Disponible en: [Consultado el 15 de julio de 2017]. [http://www.who.int/topics/escherichia\\_coli\\_infections/es/](http://www.who.int/topics/escherichia_coli_infections/es/)
27. Minsa, Ley general de salud. 2002. Disponible en: <http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/LEYN26842.pdf>.
28. Senasa 2000 Obtenido en: [https://www.senasa.gob.pe/senasa/wpcontent/uploads/jer/NOR\\_GEN\\_ENF\\_TUB/DS\\_031-2000-AG.pdf](https://www.senasa.gob.pe/senasa/wpcontent/uploads/jer/NOR_GEN_ENF_TUB/DS_031-2000-AG.pdf).
29. Alfonso R. Gennaro, Remington: Farmacia, 20<sup>o</sup> edición, Tomo 1 – 2003.
30. Lamerque A, Zygadlo J, Labuckas D, Fundamentos teórico-prácticos de química orgánica primera edición- 2008.
31. Infección del tracto urinario y manejo antibiótico. 2006, [Consultado el 12 de noviembre de 2017]. Obtenido de: <http://www.scielo.org.pe/pdf/amp/v23n1/a06v23n1>.
32. Bacilos gran negativos 2002, [Consultado el 18 de octubre de 2017]. Disponible en: <http://higiene.edu.uy/cefa/Libro2002/Cap%2022.pdf>.

33. Sánchez Rodríguez J, Patógenos emergentes en la línea de sacrificio de porcino.
34. Infocistitis, 2015. [Internet], Obtenido de: <http://cistitisderepeticion.com/porque-bacteria-e-coli-cistitis-urinarias/>.
35. Creces, ciencia y tecnología, 2002. [Internet], Disponible en: <http://www.creces.cl/new/index.asp?imat=%20%20%3E%20%2037&tc=3&nc=5&art=897>.
36. Jácome Roca A, Historia de los medicamentos – Academia Nacional de Medicina, primera edición. Bogotá - Colombia 2003.
37. Gerard J, Tortora R, Funke L. Introducción a la microbiología, 2005.
38. Valpuesta Moralejo J. A la búsqueda del secreto de la vida: Una breve historia de la Biología, Madrid-2008.
39. Curtis H, Schnek A, Curtis Biología 7a edición, Madrid – España 2008.
40. Javier de la Torre Díaz, 30 años de VIH-SIDA: Balance y nuevas perspectivas de prevención.
41. Pamplona Roger J, Salud por las plantas medicinales. 1ª edición - 2006.
42. Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas M, Verde-Star M, Investigación en plantas de importancia médica, 2016.
43. Uribe L, Manual de Practicas Biología Molecular de la Célula I 1ª edición – 2005.
44. OMS, Resistencia a los antibióticos, 2014. [Consultado el 13 de agosto de 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/amr-report/es/>.
45. Marcano D, Hasegawua M, Fitoquímica Orgánica. Caracas, 2002.
46. Ignacio De la Peña L, Larousse Diccionario Esencial Química. 1ª edición 2003.
47. Fernández L, Velázquez. Farmacología Básica y Clínica. 18ª edición 2008.

48. Riaño Cabrera N, Fundamentos de química analítica básica. Análisis cuantitativo. 2ª edición 2007.
49. Guillem Prats, Microbiología clínica. 1ª edición, España 2005.
50. Sensibilidad antimicrobiana, 2012. [Internet]. [Consultado el 22 de julio de 2017]. Disponible en: <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-determinacion-de-la-sensibilidad-metodo-de-dilucion-2012.pdf>.
51. Camere ,R. Evaluación in vitro del Efecto Antibacteriano y Citotóxico del Extracto Metanólico de semilla y pulpa de la *Myrciaria dubia* (camu camu) sobre cepas de *Streptococcus mutans* (atcc 25175) y *Streptococcus sanguinis* (atcc 10556), Lima- Perú 2015.
52. Salazar, L. "Efecto antimicrobiano de extractos de *Allium sativum* L. "ajo" sobre el crecimiento in vitro de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923". Piura, Perú 2014.
53. Sacsquispe Contreras R, Velásquez Pomar J. Manual de Procedimientos para la prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el método de disco difusión. INS. Lima – 2002.

# **ANEXOS**

## Anexo 1. Matriz de Consistencia

PROBLEMAS	OBJETIVOS	HIPOTESIS	VARIABLES	INDICADORES	METODOLOGIA
<p><b>GENERAL:</b></p> <p>¿Cómo influye el extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> en los cultivos de <i>Escherichia coli</i>, estudios in vitro?</p> <p><b>ESPECÍFICOS:</b></p> <p>¿De qué manera la concentración al 25% del extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> influye en el efecto antibacteriano en los cultivos de <i>Escherichia coli</i>, estudios in vitro?</p> <p>¿De qué manera la concentración al 50% del extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> influye en el efecto antibacteriano en los cultivos de <i>Escherichia coli</i>, estudios in vitro?</p>	<p><b>GENERAL:</b></p> <p>Determinar si el extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> influye en los cultivos de <i>Escherichia coli</i>, estudios in vitro</p> <p><b>ESPECÍFICOS:</b></p> <p>-Determinar si la concentración al 25% del extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> influye en el efecto antibacteriano en los cultivos de <i>Escherichia coli</i>, estudios in vitro</p> <p>- Determinar si la concentración al 50% del extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> influye en el efecto antibacteriano en los cultivos de <i>Escherichia coli</i>, estudios in vitro</p>	<p><b>GENERAL:</b></p> <p>El extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> influye significativamente en los cultivos de <i>Escherichia coli</i>, estudios in vitro</p> <p><b>ESPECÍFICOS:</b></p> <p>-La concentración al 25% del extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> influye significativamente en el efecto antibacteriano en los cultivos de <i>Escherichia coli</i>, estudios in vitro.</p> <p>-La concentración al 50% del extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> influye significativamente en el efecto antibacteriano en los cultivos de <i>Escherichia coli</i>, estudios in vitro.</p>	<p><b>VI:</b></p> <p>Extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i></p> <p><b>VD:</b></p> <p>El efecto antibacteriano sobre cultivos de <i>Escherichia Coli</i> estudios in vitro.</p>	<p><b>VI:</b></p> <p>Dosis:</p> <p>Concentración al 25%</p> <p>Concentración 50%</p> <p>Concentración al 75%</p> <p>Concentración al 100%</p> <p><b>VD:</b></p> <p>-Medición diámetro de halos</p> <p>-Tiempo: 24, 48 Y 72 h</p>	<p><b>ENFOQUE</b></p> <p>Cuantitativo:</p> <p>Mediciones del diámetro de los halos.</p> <p><b>DISEÑO</b></p> <p>Experimental</p> <p><b>TIPO</b></p> <p>-Observacional:</p> <p>Se observa y se registra los acontecimientos sin intervenir en el curso natural de estos.</p> <p>-Transversal:</p> <p>En función al tiempo, se ejecuta en un solo momento.</p> <p><b>POBLACIÓN VEGETAL</b></p> <p>Constituida por la especie vegetal <i>Desmodium molliculum</i> (Kunth) DC. "Manayupa".</p>

<p>¿De qué manera la concentración al 75% del extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> influye en el efecto antibacteriano en los cultivos de <i>Escherichia coli</i>, estudios in vitro?</p> <p>¿De qué manera la concentración al 100% del extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> influye en el efecto antibacteriano en los cultivos de <i>Escherichia coli</i>, estudios in vitro?</p>	<p>-Determinar si la concentración al 75% del extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> influye en el efecto antibacteriano en los cultivos de <i>Escherichia coli</i>, estudios in vitro</p> <p>-Determinar si la concentración al 100% del extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> influye en el efecto antibacteriano en los cultivos de <i>Escherichia coli</i>, estudios in vitro</p>	<p>-La concentración al 75% del extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> influye significativamente en el efecto antibacteriano en los cultivos de <i>Escherichia coli</i>, estudios in vitro.</p> <p>-La concentración al 100% del extracto etanólico de <i>Desmodium molliculum</i> influye significativamente en el efecto antibacteriano en los cultivos de <i>Escherichia coli</i>, estudios in vitro.</p>			<p><b>POBLACIÓN BACTERIANA</b> -El estudio se realizó en cepas bacterianas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.</p> <p><b>MUESTRA BACTERIANA</b> -conformado por el número de colonias que se empleó para la preparación del inóculo bacteriano.</p> <p><b>MUESTRA VEGETAL</b> 500 gr de hojas y tallos de <i>Desmodium molliculum</i> (Kunth) DC. "Manayupa</p> <p><b>TECNICA</b> -Tamizaje fitoquímico - Método de kirby-Bauer</p> <p><b>INSTRUMENTO Y RECOLECCIÓN DE DATOS</b> -Medios de cultivo y reactivos - Bomba de vacío - Autoclave - Incubadora - fichas de registro de datos</p>
--	--	--	--	--	--

## Anexo 2. Identificación taxonómica de *Desmodium molliculum*.

 UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS  
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA  
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
  
MUSEO DE HISTORIA NATURAL

---

"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

**CONSTANCIA N°193-USM-2017**

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (planta fértil) recibida de **Nuria Olivera Torres y Pamela Príncipe Elescano**; estudiantes de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, ha sido estudiada y clasificada como: *Desmodium molliculum* (Kunth.) DC., y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUBCLASE: ROSIDAE**

**ORDEN: FBALES**

**FAMILIA: FABACEAE**

**GENERO: *Desmodium***

**ESPECIE: *Desmodium molliculum* (Kunth) DC.**

Nombre vulgar: "Manayupa"  
Determinado por: Blgo. Severo Baldeón Malpartida

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que considere conveniente.

Lima, 13 de setiembre de 2017

  
**Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA**  
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



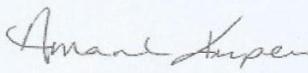
ACE/ddb

### Anexo 3. Identificación de la bacteria



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> Escherichia coli <b>Catalog Number:</b> 0335 <b>Lot Number:</b> 335-211 <b>Reference Number:</b> ATCC® 25922™* <b>Purity:</b> Pure <b>Passage from Reference:</b> 3	<b>Expiration Date:</b> 2018/8/31 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Tracy A Blenker <b>Release Date:</b> 2016/10/13
--	---

<b>Macroscopic Features:</b> 2 colony types, both are gray & beta hemolytic: one is circular to irregular, convex, slightly erose edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge & rough <b>Microscopic Features:</b> Gram negative straight rod	<b>Performance</b> <b>Medium:</b> SBAP <b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> MALDI-TOF See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 16 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm   Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(\*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.



(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

TESTING CERT #2655.01

## Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



### Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

### Meaning of Consistency Categories (A – C)

Category	Description
A	<b>Species Consistency:</b> The best match was classified as 'green' (see above). Further 'green' matches are of the same species as the first one. Further 'yellow' matches are at least of the same genus as the first one.
B	<b>Genus Consistency:</b> The best match was classified as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or 'yellow' matches have at least the same genus as the first one. The conditions of species consistency are not fulfilled.
C	<b>No Consistency:</b> Neither species nor genus consistency (Please check for synonyms of names or microbial mixture).

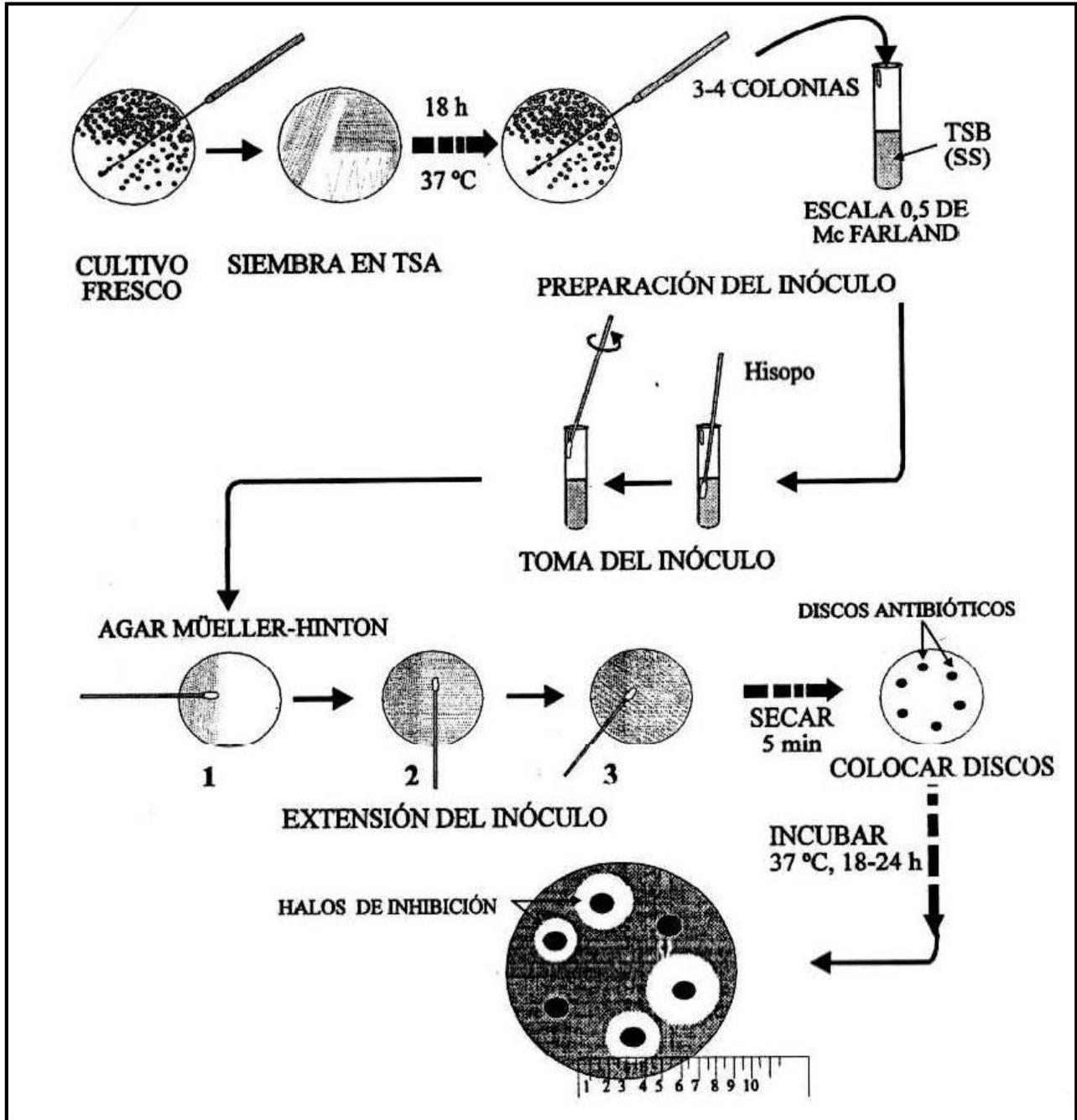
Analyte Name: Escherichia coli  
 Analyte Description: 0335  
 Analyte ID: 335-211  
 Analyte Creation Date/Time: 2016-10-05T14:44:12.278 TB  
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, IVD, Listeria  
 Applied Taxonomy Tree:

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value
D3( +++ ) ( A )	335-211	Escherichia coli	2.575

### Comments:

closely related to Shigella and not definitely distinguishable at the moment

**Anexo 4.** Evaluacion de la actividad antibacteriana mediante el metodo de kirby- Bauer

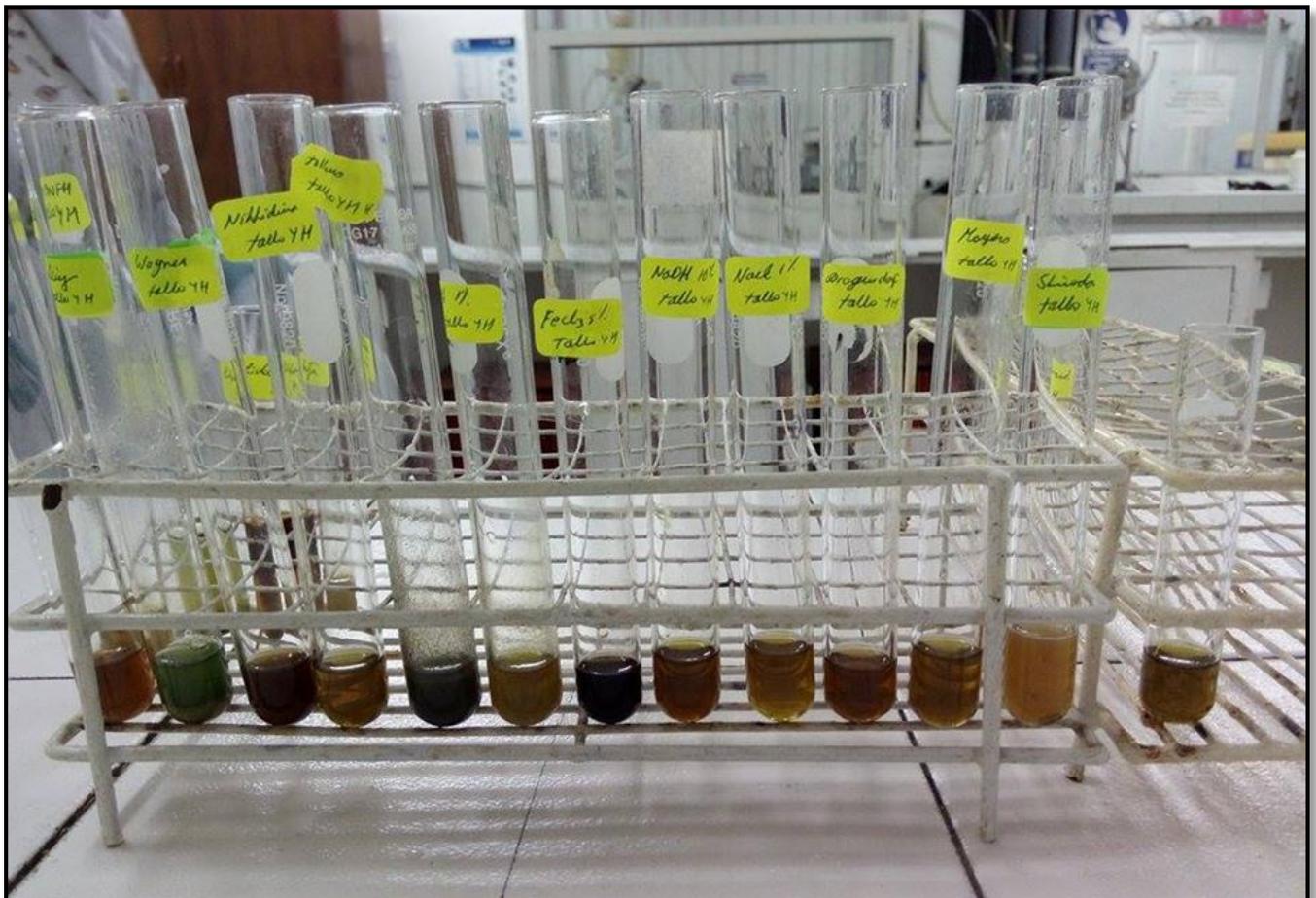


fuelle: Microbiologia general- Antibiograma.

Foto N° 1. Preparación del material vegetal *Desmodium molliculum*



Foto N°2. Tamizaje fitoquímico, identificación de metabolitos secundarios



## Prueba de solubilidad

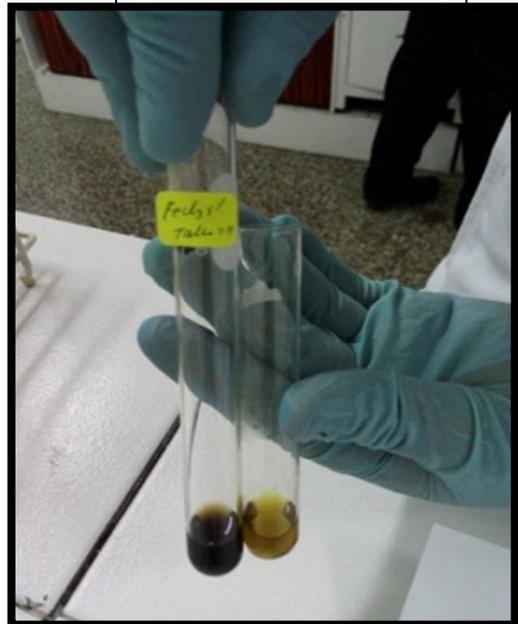


## Identificación de compuestos fenolicos y flavonoides

### Reacción de shinoda

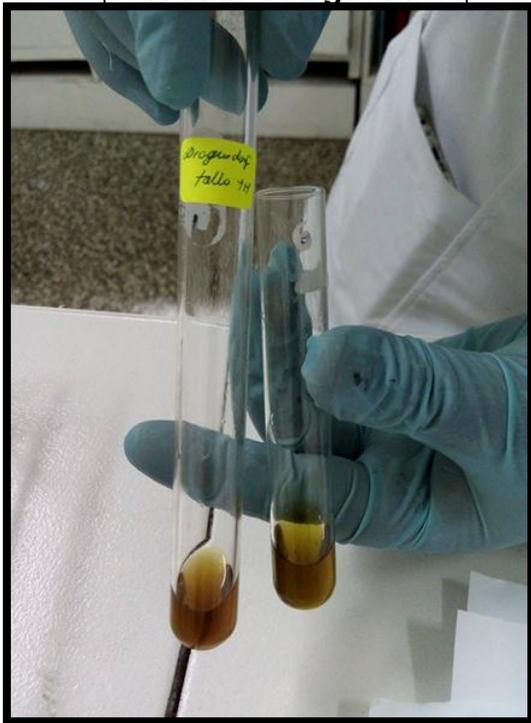


### Cloruro Ferrico $FeCl_3$

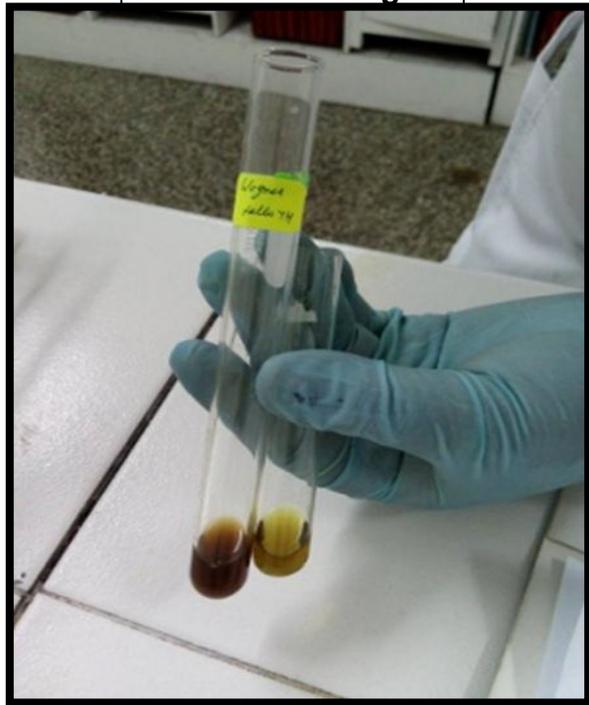


## Identificación de Alcaloides

Reacción Dragendorff



Reacción de Wagner



Identificación de cumarinas



Identificación de taninos

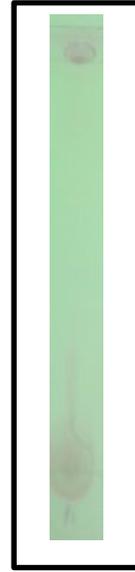


Foto 3. Cromatografía en capa fina del extracto etanólico de *Desmodium*

*Molliculum*



Placa a 254nm, revelada con reactivo de Dragendorff, con UV fluorescencia, se observó presencia de compuestos con fluorescencia verde que corresponderían a 6 flavonoides diferentes



Una débil fluorescencia a 254 nm en la Cromatografía de capa fina para alcaloides que indicaría la presencia de alcaloides. No se logró determinar que alcaloide específico es.

Foto N° 4. Discos de sensibilidad Ly D Insumed. SAC, Antibióticos Cloranfenicol (30ug) y Amikacina (30ug)



Foto N° 4. - Preparación del estándar (0,5 mc. farland) para el inóculo



TUBO	Cl <sub>2</sub> Ba 1%	SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> 1%	u.f.c/ml
1	0,1	9,9	3,0x10 <sup>8</sup>
2	0,2	9,8	6,0x10 <sup>8</sup>
3	0,3	9,7	9,0x10 <sup>8</sup>
4	0,4	9,6	1,2x10 <sup>9</sup>
5	0,5	9,5	1,5x10 <sup>9</sup>
6	0,6	9,4	1,8x10 <sup>9</sup>
7	0,7	9,3	2,1x10 <sup>9</sup>
8	0,8	9,2	2,4x10 <sup>9</sup>
9	0,9	9,1	2,7x10 <sup>9</sup>
10	1,0	9,0	3,0x10 <sup>9</sup>

Foto N° 5. Aplicación de los discos

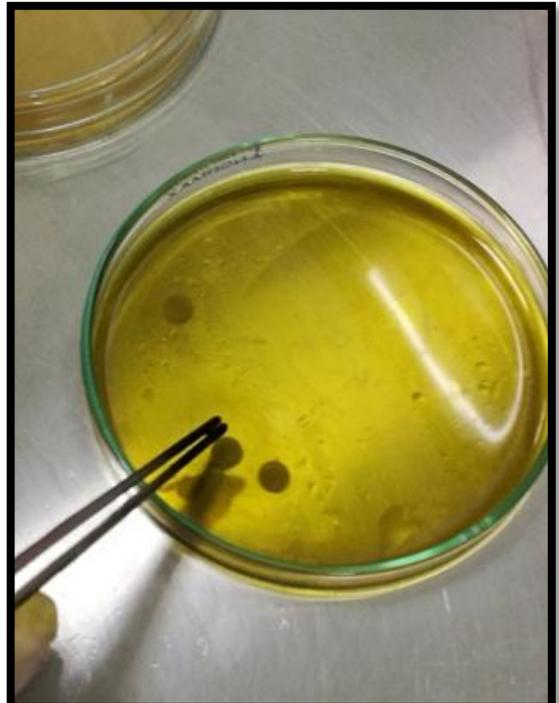


Foto Nº 6. Incubación

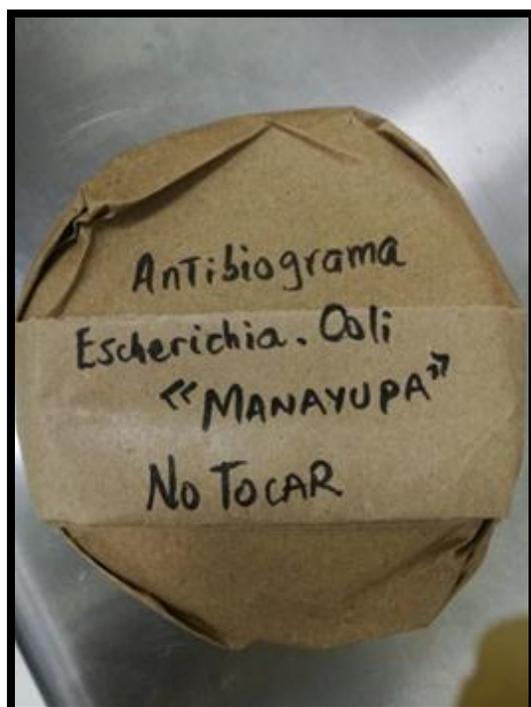
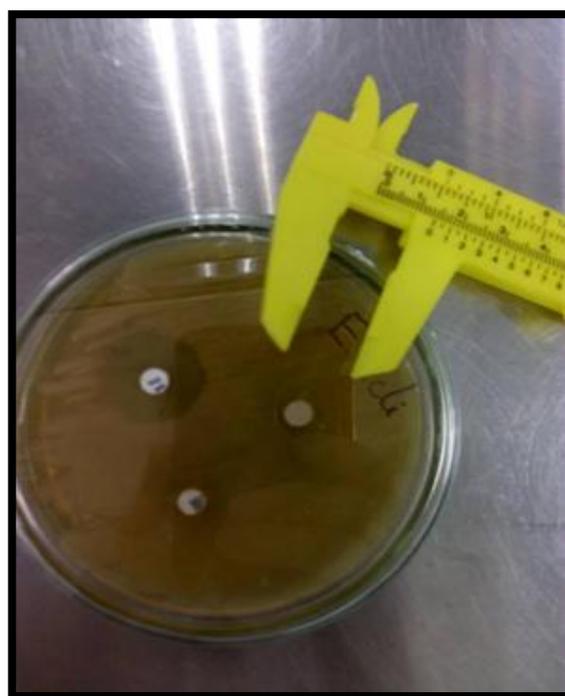
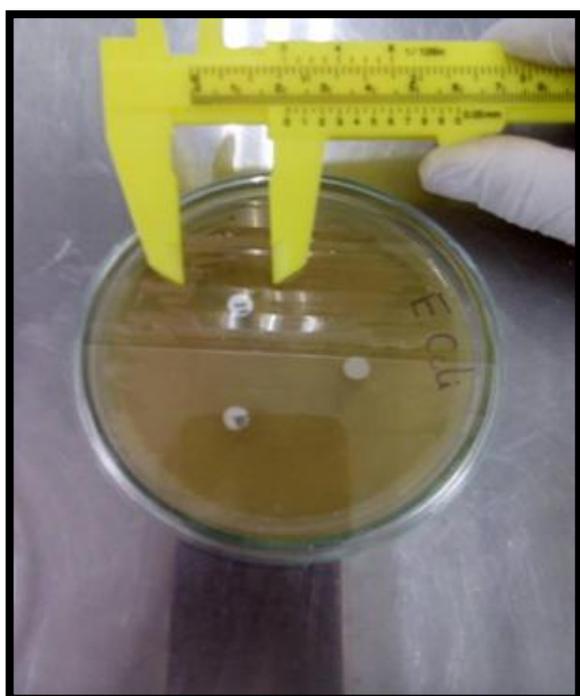


Foto Nº 7. Medición de los halos de inhibición por efecto del extracto etanólico de *Desmodium molliculum* (Kunth) DC.



Halo de inhibición con la concentración de 75 % a las 24h



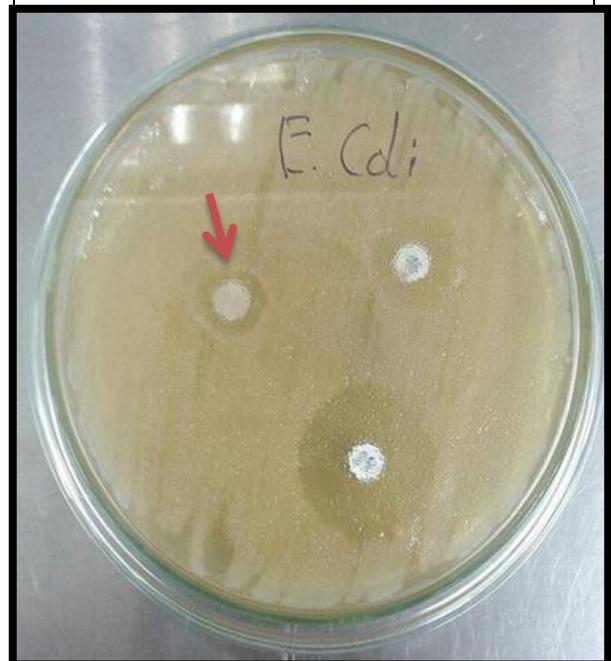
Halo de inhibición con la concentración de 100% a las 24h



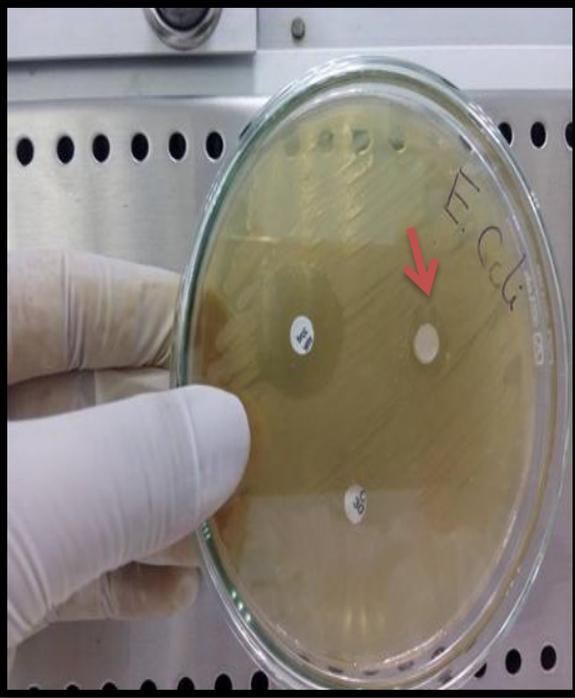
Halo de inhibición con la concentración de 75 % a las 48h



Halo de inhibición con la concentración de 100 % a las 48h



**Halo de inhibición con la concentración  
de 75 % a las 72h**



**Halo de inhibición con la concentración  
de 100 % a las 72h**



# Informe de Tesis

*por* Nuria Olivera Pamela Principe

---

**Fecha de entrega:** 09-ene-2018 08.00a.m. (UTC-0500)

**Identificador de la entrega:** 901195966

**Nombre del archivo:** Nuria\_Olivera.docx (104.03K)

**Total de palabras:** 7678

**Total de caracteres:** 46098

## Informe de Tesis

### INFORME DE ORIGINALIDAD

<b>31%</b>	<b>31%</b>	<b>2%</b>	<b>10%</b>
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

### FUENTES PRIMARIAS

<b>1</b>	<b>www.dspace.uce.edu.ec</b> Fuente de Internet	<b>5%</b>
<b>2</b>	<b>www.researchgate.net</b> Fuente de Internet	<b>3%</b>
<b>3</b>	<b>tesis.ucsm.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>2%</b>
<b>4</b>	<b>repositorioacademico.upc.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>2%</b>
<b>5</b>	<b>www.scribd.com</b> Fuente de Internet	<b>2%</b>
<b>6</b>	<b>alicia.concytec.gob.pe</b> Fuente de Internet	<b>2%</b>
<b>7</b>	<b>Submitted to UNIV DE LAS AMERICAS</b> Trabajo del estudiante	<b>1%</b>
<b>8</b>	<b>cybertesis.unmsm.edu.pe</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>
<b>9</b>	<b>www.scielo.org.pe</b> Fuente de Internet	<b>1%</b>