

# UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



## FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

### “EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *VALLESIA GLABRA* (CUN CUN) FRENTE A CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *ESCHERICHIA COLI* ESTUDIO IN VITRO”

#### Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico

TESISTAS: Bach. Christian Dennis Quintanilla Carhuamaca  
Bach. Jacquelin Alvina Guerrero Lezama

ASESOR: Mg. Q. F. Teofilo Chire Murillo

LIMA – PERÚ

2018

## **DEDICATORIA**

A Dios por habernos dado lo más valioso; la alegría de vivir.

A nuestros padres por su inmenso amor, comprensión, y su gran apoyo incondicional durante el transcurso de mi carrera profesional y enseñarme con paciencia y perseverancia se puede alcanzar todo lo que te propones.

A nuestros hermanos por su apoyo, cariño y brindarnos los mejores momentos en la vida.

**Jacquelin y Christian**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por guiar nuestros caminos constantemente.

A nuestros padres por enseñarnos lo más valioso; el sacrificio y el apoyo incondicional.

A nuestro asesor de Tesis Mg. Teofilo Chire Murillo, por su valioso apoyo, orientación y generosidad; por compartir su experiencia para desarrollar y culminar el presente trabajo.

**Jacquelin y Christian**

## ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ANEXOS

INDICE DE TABLAS

RESUMEN

ABSTRACT

Introducción..... 1

**CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....3**

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 de la investigación..... 4

1.3.1. Objetivo general..... 4

1.3.2. Objetivos específicos.....4

1.4. Justificación.....5

**CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....6**

2.1. Antecedentes de la investigación..... 6

2.1.1 Antecedentes Nacionales..... 6

2.1.2 Antecedentes Internacionales.....9

2.2 Bases Teóricas..... 14

2.2.1 Características Botánicas del *Vallesia glabra* (Cun cun)..... 14

2.2.1.1 Clasificación Taxonómica..... 15

2.2.1.2 Distribución..... 15

2.2.1.3 Nombre Común..... 15

2.2.1.4 Composición química de *Vallesia glabra*..... 16

2.2.1.5 Usos y propiedades de *Vallesia glabra*..... 16

2.2.1.6 Extractos.....	18
2.2.1.7 Obtención de extractos a partir de plantas medicinales.....	18
2.2.2 Actividad antibacteriana.....	19
2.2.2.1 Clasificación de las bacterias.....	21
2.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	21
2.2.3.1 Características microbiológicas.....	21
2.2.3.2 Diagnóstico.....	22
2.2.3.3 Epidemiología.....	23
2.2.3.4 Patogenia.....	23
2.2.3.5 Enfermedades causadas por <i>S. aureus</i> .....	24
2.2.4 <i>Escherichia Coli</i> .....	24
2.3. Formulación de hipótesis.....	25
2.3.1. Hipótesis general.....	25
2.3.2. Hipótesis específicas.....	25
2.4 Variables.....	26
2.4.1 Tabla de Operacionalización de variables.....	26
2.5 Marco Conceptual.....	27
<b>CAPITULO III: METODOLOGÍA.....</b>	<b>29</b>
3.1 Tipo de Investigación.....	29
3.1.1 Tipo.....	29
3.1.2 Nivel.....	29
3.1.3. Diseño de investigación.....	29
3.2. Población y muestra.....	30
3.2.2 Poblacion y muestra vegetal.....	30
3.2.2 Poblacion y muestra microbiológica.....	30
3.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	30
3.3.1. Técnicas.....	30
3.3.2. Instrumentos de Recolección de Datos.....	30
3.3.3. Validación de Instrumentos.....	31
3.4 Materiales, insumos y equipos.....	31
3.5. Procedimiento Experimental.....	32

3.5.1. Recolección de la Muestra Vegetal.....	32
3.5.2. Preparación de la Muestra.....	33
3.5.3. Obtención del extracto etanólico.....	33
3.5.4. Estudio Microbiológico.....	33
3.5.4.1. Desarrollo del método.....	34
3.5.5. Marcha Fitoquímica.....	36
<b>CAPITULO IV: PRESETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
4.1. Presentación de resultados.....	38
4.2. Análisis Estadístico.....	41
4.3. Discusión de los Resultados.....	46
<b>CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>47</b>
5.1. Conclusiones.....	47
5.2. Recomendaciones.....	47
Referencias Bibliográficas.....	48

## INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: MATRIZ DE CONSISTENCIA.....	52
ANEXO 2: FICHA DE VALIDACIÓN POR JUICIO DE EXPERTO.....	54
ANEXO 3: FICHA DE VALIDACIÓN POR JUICIO DE EXPERTO.....	56
ANEXO 4: CERTIFICADO BOTÁNICO.....	58
ANEXO 5: TESTIMONIOS FOTOGRÁFICOS.....	59

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Operacionalización de variables.....	26
Tabla 2: Actividad antibacteriana contra <i>S. aureus</i> por el método K. Bauerel	38
Tabla 3: Actividad antibacteriana contra <i>E. coli</i> por el método K. Bauerel.	39
Tabla 4: Resultados de la Marcha fitoquímica del extracto alcohólico de hojas <i>Vallesia glabra</i> .....	40
Tabla 5: Estadísticas Descriptivas de los Halos de Inhibición encontrados del extrato etanólico de las hojas de <i>Vallesia glabra</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	41
Tabla 6: Prueba de homogeneidad de varianzas de los halos de inhibición del extracto etanólico de las Hojas de <i>Vallesia glabra</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	42
Tabla 7: Prueba de ANOVA de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico de las Hojas de <i>Vallesia glabra</i> frente a..... cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	42
Tabla 8: Comparaciones múltiples de la prueba de Tukey de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico de las Hojas de <i>Vallesia glabra</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	44
Tabla 9: Prueba de Subconjuntos de datos de Tukey de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico de las Hojas de <i>Vallesia glabra</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	45

## RESUMEN

El presente estudio tiene como objetivo evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de la planta *Vallesia glabra* (Cun cun) mediante el método Difusión de Disco en agar, en cultivos microbiológicos. Se realizó el cultivo de las bacterias *Escherichia Coli* y *Staphylococcus Aureus*. Como muestra se usó el extracto etanólico de hojas de *Vallesia glabra* (Cun cun) a distintas concentraciones: 10%, 20%, 30%, 50% y 100%. Se hizo 3 tratamientos y 3 repeticiones por cada tratamiento. El tratamiento de control positivo fue realizado con Gentamicina y el control negativo con alcohol etílico de 96°. Las placas se incubaron por 24 horas aproximadamente y luego se realizó la lectura correspondiente, donde se observó que el extracto etanólico de las hojas de *Vallesia glabra* presenta actividad antimicrobiana frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* en concentraciones de 20%, 30%, 50% y 100%. Asimismo no se observó actividad antibacteriana frente a la cepa *Escherichia Coli*. Los extractos de Cun cun al 50% y 100% presentó mayor actividad antibacteriana que el control positivo (Gentamicina) y no presentó ninguna actividad antibacteriana en el control negativo (alcohol etílico de 96°). Según la estadística inferencial (ANOVA, TUKEY), los resultados de la actividad antibacteriana de los extractos de *Vallesia glabra* (Cun cun) es de 10.66, 13.33, 18.00 y 21.33 son diferentes significativamente, es decir, las diferencias son significativas.

**Palabras clave:** Cun cun, *Vallesia glabra*, antibacteriano, extracto.

## ABSTRACT

The objective of this study is to evaluate the in vitro antibacterial activity of the *Vallesia glabra* plant (Cun cun) by means of the Disco diffusion method in agar, in microbiological cultures. The culture of *Escherichia Coli* and *Staphylococcus Aureus* bacteria was carried out. As a sample, the ethanolic leaf extract of *Vallesia glabra* (Cun cun) was used at different concentrations: 10%, 20%, 30%, 50% and 100%. There were 3 treatments and 3 repetitions for each treatment. The positive control treatment was performed with Gentamicin and the negative control with ethyl alcohol of 96°. The plates were incubated for approximately 24 hours and then the corresponding reading was made, where it was observed that the ethanolic extract of the leaves of *Vallesia glabra* presents antimicrobial activity against the *Staphylococcus aureus* strain in concentrations of 20%, 30%, 50% and 100%. Likewise, no antibacterial activity was observed against the *Escherichia Coli* strain. Cun cun extracts at 50% and 100% showed higher antibacterial activity than the positive control (Gentamicin) and did not present any antibacterial activity in the negative control (96 ° ethyl alcohol). According to the inferential statistics (ANOVA, TUKEY), the results of the antibacterial activity of the extracts of *Vallesia glabra* (Cun cun) is 10.66, 13.33, 18.00 and 21.33 are significantly different, that is, the differences are significant.

**Key words:** Cun cun, *Valles glabra*, antibacterial, extract.

## INTRODUCCIÓN

La actividad antimicrobiana de extractos y aceites esenciales de plantas nativas son motivo de muchos estudios teniendo sendos reportes en muchos países como Brasil, Cuba, India, México y Jordania, “que tienen una diversidad de flora y una rica tradición en el uso de plantas medicinales para su uso como antibacteriano o antifúngico. Las plantas medicinales producen una variedad de sustancias con propiedades antimicrobianas y se espera que los compuestos se usen para el desarrollo de nuevos antibióticos”.<sup>1</sup>

En el presente estudio se planteó determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Vallesia glabra* (Cun cun) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, determinando la mejor concentración con mayor efecto, a fin de aportar evidencia que demuestre que pueda ser usado como antimicrobiano.

En cuanto a su estructura , el presente estudio en su desarrollo comprende cinco capítulos:

En primer capítulo se proponen el planteamiento del problema, la formulación de problemas, los objetivos, las hipótesis y justificación.

En el segundo capítulo se desarrolla el marco teórico, expresadas en las bases teóricas y bases conceptuales de la investigación, mencionándose además los antecedentes nacionales e internacionales.

En el tercer capítulo se indica la metodología que se utilizó para evaluar la actividad antibacteriana in vitro, de la planta *Vallesia glabra* (Cun cun) frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, mediante método de difusión en disco en agar. Señalando las variables de estudio, la población y la muestra, así como las técnicas e instrumentos utilizados.

En el cuarto capítulo se realizó la presentación, análisis y discusión de resultados, donde se determina que frente a la cepa de *Staphylococcus aureus*, la actividad antibacteriana es superior en concentraciones de 50% y 100% a la del control positivo con Gentamicina. Asimismo frente a la cepa *Escherichia Coli*, no existe actividad antibacteriana.

En el quinto y último capítulo se indicaron las conclusiones y recomendaciones, del presente estudio, donde las conclusiones se basan a los resultados obtenidos de la parte experimental. Culminandose con señalar la referencias bibliográficas y los anexos correspondientes.

# CAPÍTULO I

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### 1.1 Descripción de la realidad problemática

Las bacterias son seres vivos que ingresan a nuestro organismo, pudiendo provocar enfermedades e incluso provocar la muerte. Las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* liberan sustancias químicas llamadas toxinas que dañan nuestros tejidos y causan enfermedades.

La bacteria *Staphylococcus aureus* se encuentra en la nariz (por lo general de manera temporal), de los adultos sanos cerca del 30% y en la piel cerca del 20% de éstos. Los porcentajes son más altos en los pacientes que están hospitalizados y aún más en los que trabajan en un hospital.

El contagio es por medio del estornudo y la tos, inhalando las gotitas que expulsamos o utilizando objetos contaminados como: aparatos de gimnasio, teléfono, control remoto, botones del ascensor, etc.

La *Escherichia Coli* se encuentra presente en el intestino y puede causar diferentes enfermedades como: diarrea, infección renal y hasta la muerte.

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* se tratan con antibióticos, pero a la vez éstos medicamentos pueden afectar otros órganos como el estómago, intestino, hígado, riñón, etc.

Esta investigación se realiza como una alternativa para combatir este tipo de infecciones por *Staphylococcus aureus* y utilizar el *Vallesia glabra* (Cun cun), como un antibiótico natural. El Cun cun contiene alcaloides, cumarinas y saponinas que se encuentran en las hojas teniendo una acción antibacteriana y como tratamiento alternativo de solución en las infecciones y de bajo costo.

## **1.2. Formulación del Problema**

### **1.2.1. Problema general**

¿El extracto etanólico de las Hojas del *Vallesia glabra* (Cun cun) presentará efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*?

### **1.2.2. Problemas específicos**

1. ¿Qué tipo de metabolitos secundarios estarán presentes en el extracto etanólico de las Hojas del *Vallesia glabra* (Cun cun)?
2. ¿La concentración al 10%, 20%, 30%, 50% y al 100% del extracto etanólico de las Hojas del *Vallesia glabra* (Cun cun) presentará efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*?

## **1.3. Objetivos de la investigación**

### **1.3.1. Objetivo general**

Determinar si el extracto etanólico de las Hojas del *Vallesia glabra* (Cun cun) presenta efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

### **1.3.2. Objetivos específicos**

1. Hallar los tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las Hojas del *Vallesia glabra* (Cun cun).

2. Determinar si la concentración al 10%, 20%, 30%, 50 y al 100% del extracto etanólico de las Hojas del *Vallesia glabra* (Cun cun) presentan efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

#### **1.4. Justificación**

En el Perú hay una gran diversidad de plantas que poseen propiedades terapéuticas sin estudios farmacológicos que fundamenten la veracidad de su uso que se le destina.

Una de las especies de plantas mayormente conocidas con propiedades medicinales es el *Vallesia glabra* (Cun cun). El presente estudio tiene como finalidad demostrar la actividad antimicrobiana y de esta forma aportar en el conocimiento de ésta planta en el Perú.

Este estudio se justifica ampliamente, porque es de suma importancia encontrar alternativas de tratamiento antibacteriano, debido a que las patologías microbianas están en crecimiento y por lo tanto, se busca extender estudios de otro tipo de fuentes principalmente naturales que puedan dar una respuesta eficaz, a un bajo costo.

Los resultados de la presente investigación tendrá una utilidad práctica en la posibilidad de ser un componente para la elaboración de productos farmacéuticos antimicrobianos.

Asimismo dichos resultados, así como la metodología y procedimientos utilizados van a servir de referencia para otros estudios similares que se puedan realizar en adelante sobre las propiedades del *Vallesia glabra* (Cun cun).

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1. Antecedentes de la investigación

##### 2.1.1 Antecedentes Nacionales

**RAYMUNDO S. (PIURA 2015) “Etnobotánica de las especies del monte ribereño en el río Chira, Sullana”.**

La etnobotánica es el aprovechamiento tradicional de las plantas por la población. Con el objetivo de dar a conocer la etnobotánica de las especies del monte ribereño en el río Chira se realizó el presente estudio, que abarcó desde el centro poblado de Alamor en el distrito de Lancones hasta La Bocana en el distrito de Miramar, durante los meses de agosto del 2014 hasta enero del 2015. Se aplicó 72 encuestas en 12 centros poblados aledaños al monte ribereño, registrando 129 especies de plantas, pertenecientes a 105 géneros y 36 familias. Estas especies fueron contenidas en 11 categorías de utilidad: forrajeras (67), medicinales (64), ornamentales (26), construcción (24), cercos vivos (18), combustible (17), artesanales (12), otras utilidades (11), alimentación (4), herramientas (3) y sahumeros (2). Las familias etnobotánicas más representativas por su número de especies útiles fueron: Fabaceae (24); Poaceae (20); Arnarantaceae (7), Asteraceae (7); Cyperaceae (7) y Apocynaceae (5). Las especies que presentaron mayor utilidades fueron: *Prosopis pallida*, *Acacia macracantha*, *Colicodendron scabridum*, *Cordia tutea* y *Salix chilensis*. En conclusión la especie *Vallesia glabra* es una planta con gran utilidad medicinal; lo utilizan como germinicida para heridas e infecciones dermatológicas como acné, sarpullido y varicela. Asimismo lo utilizan para la construcción; como empastados con barro mezclando las hojas de Cun cun con barro.<sup>2</sup>

**SALAZAR L. (Piura 2014) "Efecto antimicrobiano de extractos de *Allium sativum* L. "ajo" sobre el crecimiento *in vitro* de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923"**

Se determinó el efecto antimicrobiano sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de los extractos acuoso, etanólico y metanólico de *Allium sativum* L "ajo", que se obtuvieron por maceración del extracto puro de ajo con los solventes etanol y metanol, a los cuales se realizó detección de algunos compuestos químicos como saponinas y aminoácidos. Los diferentes extractos de *A. sativum* obtenidos, se ensayaron en concentraciones de 25%, 50%, 75 % y 100 %. Mediante los métodos de difusión en agar y dilución en tubo se determinó la eficacia antimicrobiana. El extracto acuoso presentó mayor efecto inhibitorio sobre *Escherichia coli*, en cambio el extracto acuoso y extracto metanólico mayor efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus*; la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) para *E. coli* fue 0.78% v/v del extracto acuoso, mientras para *S. aureus* fue 0.39 %v/v del extracto acuoso. La concentración de 100 % del extracto acuoso *A. sativum*, presentaron igual efecto antimicrobiano que Cloranfenicol y Amikacina sobre *E. coli* y superaron el efecto antimicrobiano de Vancomicina sobre *S. aureus*.<sup>3</sup>

**PÉREZ F, et al. (2011) "Estudio fitoquímico preliminar de las plantas medicinales del norte del Perú".**

Se realizó el estudio fitoquímico preliminar de 31 plantas medicinales del norte del Perú mediante el ensayo a la gota. En el 100% de las plantas se encontró esteroides; 9,7%, quinonas; 83,9%, flavonoides; 80,6%, cardiotónicos; 93,5%, taninos; 83,9%, antocianinas; 48,4%, saponinas; y 58,1%, alcaloides. Los metabolitos secundarios encontrados justificarían el uso específico medicinal de las 31 especies, y sus aplicaciones medicinales podrían enfatizarse como cardiotónicas y anticariogénicos, previa evaluación y experimentación. De acuerdo a los resultados las hojas de *Vallesia glabra* (Cun cun) presenta los siguientes metabolitos secundarios; esteroides, flavonoides, cardiotónicos, taninos, antocianinas, saponinas y alcaloides.<sup>4</sup>

**MEDRANO A, et al. (Iquitos 2017) “Actividad antimalárica in vitro por citometría de flujo de extractos de especies vegetales de la familia Apocynaceae de la región Loreto, LIPNAA - Iquitos”.**

Evaluar la actividad antiplasmodial in vitro por citometría de flujo de 17 extractos etanólicos y 15 extractos alcaloidales básicos, obtenidos de ocho especies vegetales de la familia Apocynaceae de la Región Loreto. Las cepas empleadas fueron: Plasmodium falciparum cepa FCR-3 (cloroquina resistente) y cepa 3D7 (cloroquina sensible), cultivadas por la metodología de Trager y Jensen con modificaciones. El ADN de P. falciparum se tiñó con bromuro de etidio para su cuantificación por citometría de flujo. De los extractos ensayados, 15 resultaron activos inhibiendo el crecimiento de alguna de las cepas de Plasmodium, siendo el extracto etanólico de hojas de Odontadenia geminata el que presentó mayor actividad frente a la cepa FCR-3 (cloroquina resistente); y el extracto alcaloidal básico de hojas de Malouetia tamaquarina frente a la cepa 3D7 (cloroquina sensible). El tamizaje fitoquímico reveló la presencia de alcaloides, lactonas y flavonoides, entre otros metabolitos hallados.<sup>5</sup>

**ARCE W. (Iquitos 2014) “Aislamiento e identificación estructural e los alcaloides de la corteza de la especie vegetal Aspidosperma camporum Mull Arg (Quillobordon) utilizado como antimalárico ”.**

El presente trabajo de investigación tiene por objetivo, aislar e identificar los alcaloides de la corteza de Aspidosperma camporum Müll Arg (Quillobordon) (Apocynaceae), especie vegetal que se utiliza tradicionalmente como antimalárico en la Amazonía Peruana. El estudio se realizó en la Unidad Especializada: Laboratorio de Investigación de Productos Naturales Antiparasitarios de la Amazonía en lo referente a la extracción, fraccionamiento cromatográfico, purificación y aislamiento de los alcaloides y en el Instituto de Agrobiología de Canarias del Consejo Superior de Investigación Científico de Tenerife (España) se realizaron, la toma de los espectros de RMN, espectrometría de masas de alta y baja resolución, los experimentos, bidimensionales de coherencia cuántica homonuclear, los cuales permitieron determinar las estructuras químicas de los

alcaloides aislados. La corteza de *Aspidosperma camporum* (4.4 Kg), se maceró con etanol a temperatura ambiente por un periodo de 60 días, con renovación de solvente cada 72 horas, el etanol se eliminó a presión reducida en un rotavapor hasta sequedad, se pesó y se obtuvo 102.4 g de extracto etanólico. A partir del extracto etanólico se obtuvo el extracto alcaloidal en medio básico (13.8 g) Utilizando técnicas cromatográficas de columna, cromatografía de capa fina, cromatografía preparativa se aislaron tres alcaloides. La estructura química se determinó por la interpretación de sus datos espectroscópicos (RMN1H y 13C, HSQC y HMBC) y datos espectrométricos y por comparación con los datos publicados en la bibliografía química, los cuales fueron identificados como: 10-Metoxi desacetilakuammilina, Aspidolimidina y Flenderina.<sup>6</sup>

### 2.1.2 Antecedentes Internacionales

**ZECHES M, et al. (Bolivia 1995) “Alcaloides de hojas y tallos de *Vallesia glabra*”.**

En género *Vallesia* incluye 12 especies, 3 de los cuales se estudiaron químicamente: *Vallesia dichotoma* Ruiz. y PaV. (de Perú), *Vallesia antillana* (de Cuba) y *Vallesia glabra* Cav. (de Bolivia). Asimismo, se aislaron solo dos alcaloides, vallesina y aspidospermina. La extracción de alcaloides se llevó a cabo de acuerdo con el proceso habitual ácido-base, y se obtuvieron los siguientes rendimientos: 2.4% (tallos), 2.9% (hojas). La purificación se realizó por cromatografía en columna (gel de sílice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH con cantidades crecientes de MeOH), y el aislamiento de alcaloides puros se realizó por CCF preparativa, CC (con los mismos disolventes) o por cristalización. Este estudio muestra que *V. glabra* posee un alto contenido de alcaloides.<sup>7</sup>

**GIMÉNEZ G, et al. (Argentina 2013) “Anatomía foliar de *Vallesia glabra* (Apocynaceae), especie de importancia medicinal y en frugivoría”.**

*Vallesia glabra* (Apocynaceae), especie de importancia en frugivoría. *Vallesia glabra* (Cav.) Link, conocido vulgarmente como “ancoche”, es un arbusto de 1,50 a 3 m de altura, de importancia medicinal y alimenticia para algunas aves. Posee una amplia distribución en el norte y centro de Argentina. En este trabajo se describe la anatomía foliar de *V. glabra*. Se utilizó material fresco con los que se realizaron diafanizados y secciones transversales y longitudinales de lámina y pecíolo mediante técnicas anatómicas convencionales. Los resultados muestran que la hoja es cartácea, ovada de venación pinnada, camptódroma, con estructura dorsiventral, anfiestomática y cutícula estriada. Los estomas son anomocíticos y ciclocíticos. El pecíolo en sección transversal es subcircular con tricomas simples, cristales en forma de drusa y almidón compuesto en el parénquima que rodea al haz vascular central. Se observó además, la presencia de tubos laticíferos no articulados en pecíolo y lámina. Los caracteres morfo-anatómicos antes mencionados son válidos para la correcta identificación de esta especie.<sup>8</sup>

**MORÁN E. et al. (México 2014) “Capacidad antioxidante, cinética de barrido de radicales y perfil fenólico de extractos de metanol de plantas silvestres del sur de Sonora, México”**

Se investigó los perfiles antioxidantes y fenólicos de los extractos de metanol de *Rhizophora mangle* L, *Krameria erecta*, *Lycium berlandieri* Dunal, *Vallesia glabra* Link y *Forchammeria watsonii* Rose, se utilizó el método del radical libre 2, 2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) se usó para el ensayo antioxidante de extractos de plantas de metanol. La determinación de compuestos fenólicos y se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando una columna analítica C18 eluyendo con acetonitrilo en un programa de gradiente. La capacidad antioxidante del extracto metanólico de todas las plantas fue dependiente de la concentración y mostró una capacidad antioxidante máxima de 100 µg / mL. En contraste con el control positivo de ácido ascórbico (100%), la capacidad antioxidante de *R. mangle* (95,71%) mostró la capacidad de

eliminación de DPPH más elevada, seguida de *K. erecta* (91%), *L. berlandieri* (85,99%) y *V. glabra* (57.70%). *F. watsonii* dió el valor más bajo de eliminación de DPPH (15.23%). Todos los valores de la capacidad antioxidante fueron estadísticamente diferentes ( $p \leq 0.05$ ).<sup>9</sup>

**ABAD A. et, al. (Venezuela 2007). “Actividad antimicrobiana y estudio fitoquímico preliminar de *Mandevilla veraguasensis* (Apocynaceae)”**

Se probó la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto en acetato de etilo de las hojas de *Mandevilla veraguasensis* (Seem.) de la familia Apocynaceae. Se observó una moderada actividad frente a las bacterias Gram positivas *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, la cual puede ser atribuida, en parte, a los flavonoides 4'-O-metil-kaempferol y quercetina, aislados de este extracto. Asimismo el estudio fitoquímico de numerosas especies de la familia Apocynaceae, ha conducido al aislamiento de metabolitos muy diversos, con una amplia variedad de actividades biológicas especialmente anticancerosa, leishmanicida, antibacteriana. En términos generales, la familia se caracteriza por biosintetizar glicósidos cardiotónicos, flavonoides, cumarinas, iridoides, ciclitoles, triterpenoides y particularmente alcaloides esteroidales e indólicos.<sup>10</sup>

**EDWIN E. et, al. (India 2007) “Efecto antimicrobiano, antiulceroso y antidiarreico de las hojas de buganvilla (*Bougainvillea glabra* Choisy) “.**

Con el fin de evaluar científicamente algunos de los usos tradicionales de la buganvilla (*Bougainvillea glabra* Choisy), se realizó el presente estudio para examinar los efectos antidiarreicos, antiulcerosos y antimicrobianos del extracto acuoso, etanólico y acetónico de sus hojas. Se probó la actividad antidiarreica en un modelo de diarrea inducida con aceite de ricino en ratas y se utilizó loperamida (3 mg/kg) como estándar de referencia. Se determinó la acción antiulcerosa mediante un modelo de úlcera inducida con alcohol y se utilizó omeprazol (10 mg/kg) como estándar. Ambos estudios se realizaron con dos niveles de dosis, 200 mg/kg y 400 mg/kg, respectivamente. La actividad antimicrobiana se estudió mediante un método de difusión en disco con una concentración de 500 µg/disco de extracto, utilizando ofloxacina (5 µg/disco) como estándar. Los organismos

utilizados fueron *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Proteus vulgaris*, y se determinó la zona de inhibición. Los extractos de plantas mostraron una significativa acción antidiarreica, antiulcerosa y antimicrobiana en el presente estudio. Los resultados obtenidos corroboran lo sostenido por los profesionales de la medicina locales.<sup>11</sup>

### **ROJAS N. “Estudio de las propiedades antimicrobianas de los alcaloides de *Vallesia antillana* Wood”.**

Se señala que para continuar el estudio de la actividad antimicrobiana evidenciada por algunos alcaloides indólicos aislados de *Vallesia antillana* (Apocynaceae), se ensayan la vallesina (N-a formil desacetil aspidoespermina), y la desacetil aspidoespermina, alcaloides relacionados estructuralmente con la aspidoespermina, la cual demostró poseer cierta actividad antimicrobiana según trabajos informados anteriormente por nuestro grupo. Se emplea el método de difusión en medio agarizado de doble capa con cortes cilíndricos, y se constata la acción inhibitoria del crecimiento sobre cepas de bacterias de interés clínico humano, y se comparan los resultados a concentraciones similares con los obtenidos para dos antibióticos estándares. Se concluye que las nuevas estructuras probadas son más activas que la aspidoespermina, y se establece la relación estructura-actividad(AU).<sup>12</sup>

### **BARBOSA I, et al. (Brasil 2002) “Actividad antibacteriana de extractos de Apocynaceae y CIM de extracto orgánico de la raíz de *Tabernaemontana angulata*”.**

Se realizaron tres extractos orgánicos y acuosos obtenidos de 11 especies de Apocynaceae, utilizando el método de la microdilución en caldo contra *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. El extracto orgánico obtenido del cauce de *Tabernaemontana angulata* presentó actividad contra la bacteria Gram positiva *S. aureus*. La concentración inhibitoria mínima verificada para ese extracto varió de 2,50 a 1,25 mg / ml. Cloranfenicol se utilizó como antimicrobiano estándar. El análisis fitoquímico indicó la presencia de triterpenos y alcaloides en el extracto activo.<sup>13</sup>

**CICCIO J, et al. (Costa Rica). “Estudio Fitoquímico de *Stemmadenia glabra* Benth. (Apocynaceae) II. Aislamiento e identificación de alcaloides”**

En la actualidad se conocen una gran cantidad de alcaloides estructuralmente relacionados con el indol (ca. 700). Estos compuestos se encuentran distribuidos principalmente en tres familias botánicas: Apocynaceae, Loganiaceae y Rubiaceae. Muchos generos pertenecientes a estas familia han sido estudiados y entre ellos *Stemmadenia* no es la excepción.<sup>14</sup>

**LUZ H, et al. (Brasil 2014). “Prospección fitoquímica de *Himatanthus drasticus* Plumel (Apocynaceae), de la mesorregión oriental maranhense”.**

El uso indiscriminado de *Himatanthus drasticus* (Janaúba) por pequeños caprinocultores en el control de la verminosis en pequeños rumiantes fue lo que motivó a la realización del estudio fitoquímico del mismo. Las cascás de la janaúba fueron recolectadas en la mesorregión. Este de Maranhão y conducidas a los laboratorios de Nutrición de la Universidad Estatal del Estado Maranhão y de Productos Naturales de la Universidad Federal de Maranhão para la identificación botánica y fitoquímica por la metodología de la Prospección Preliminar y CCD, realizando pruebas para las diversas clases de metabolitos secundarios. A partir de las cortezas del vegetal molido y deshidratado se realizó la preparación del extracto bruto (EB). El material se colocó en una mezcla hidroalcohólica de EtOH: H<sub>2</sub>O (7: 3 v: v), y sometido a agitación mecánica esporádica. Los Subextratos fueron obtenidos a partir del EBHA por el proceso de partición líquido-líquido, ETOH: H<sub>2</sub>O (2: 1, v: v). Las mezclas se prepararon con los siguientes disolventes orgánicos de polaridades crecientes: hexano, acetato de etila y butanol. Los análisis cromatográficos evidenciaron la presencia de grupos de metabolitos secundarios en el extracto y en los subextratos. Las clases de metabolitos secundarios que presentaron mayor expresividad en el análisis de prospección fueron los alcaloides y taninos, mientras que en el análisis por CCD fueron los flavonoides y terpenos, indicando el potencial de la acción farmacológica de las cáscaras de *H. drasticus*.<sup>15</sup>

## **MOSQUERA O, et al. ( Colombia) “Evaluación de la actividad insecticida in vitro de extractos vegetales contra la broca del café”**

En la búsqueda de plantas con actividad insecticida para ser empleadas en el manejo integrado de la broca del café (*Hyphothenemus hampei*), se evaluaron 46 extractos crudos de diclorometano y metanol obtenidos de plantas recolectadas en zonas de reserva de la Ecorregión del Eje Cafetero. Dichas plantas pertenecen a las familias Apocynaceae, Asteraceae, Euphorbiaceae, Melastomataceae, Solanaceae, Ranunculaceae, Rubiaceae y Urticaceae. La actividad insecticida in vitro se evaluó utilizando como unidad experimental un vial, en el cual se introdujo una hembra de broca adulta y un grano de café pergamino impregnado con el respectivo extracto a evaluar (diclorometano o metanol) a 1000 mg/L. Para cada extracto se utilizaron cien unidades experimentales con dos repeticiones. Los extractos de diclorometano de las especies *Clematis haenkeana*, *Piper umbellatum* y *Phenax uliginosus* fueron los más activos contra *H. hampei*. Los extractos metanólicos más activos fueron los de *Topobea cf discolor*, *Dunalia solanacea* y *Rodostemonodaphne sp.* Estos resultados confirman el potencial de las plantas de la zona de reserva de la Ecorregión del Eje Cafetero como fuente de nuevos agentes con actividad insecticida contra *H. hampei*.<sup>16</sup>

## **2.2 BASES TEÓRICAS**

### **2.2.1 Características Botánicas del *Vallesia glabra* (Cun Cun)**

La *Vallesia glabra* es un arbusto de hasta 3 m de altura, tallo completamente verde, con nudos negruzcos, hojas lisas en forma de lanzas. Flor pequeña, tubular, blanca y con borde en forma de estrella. Frutos medianos, de color blanquecino y perlado. Semilla: Subclaviforme, blanquecina, longitudinalmente surcada de 6-8 mm de largo por 2,5 mm de diámetro. 100 gr de semillas de *Vallesia glabra* contiene aproximadamente 4000 unidades.<sup>17</sup>

### 2.2.1.1 Clasificación Taxonómica

- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Orden: Gentianales
- Familia: Apocynaceae
- Género: *Vallesia*
- Especie: *Vallesia glabra*

### 2.2.1.2 Distribución

El arbusto de Cun cun esta distribuída en América tropical y subtropical, a los 500 msnm aprox. La especie *Vallesia glabra* se extiende desde el norte de la provincia de Córdoba en Argentina hasta California en Estados Unidos de Norteamérica. Ha sido observada en México (Oaxaca); EE UU (Florida, California); el Caribe (Bahamas, Cuba, Jamaica); Suramérica (Colombia, Ecuador, Bolivia, Paraguay y norte de Argentina); en Perú (Amazonas, Apurímac, Cajamarca, Ica, La Libertad, Lambayeque y Tumbes).<sup>17</sup>

### 2.2.1.3 Nombre Común

La especie *Vallesia glabra* se le conoce con una amplia variedad de nombres, debido a que es posible encontrarla en diversos puntos del continente americano. Por este motivo y gracias a sus propiedades, que la nombran regionalmente: Cun cun, cun-con, perlillo, cuncush o calato (Perú); Ancoche, ancochi, ancuchi, coquillo, tetilla o teta de gata (Argentina); Perlilla (Ecuador); Cacarahue, frutilla, huelatave, huevito, (México); Amarguillo, leche leche, mataco, chulu chulu (Bolivia); Payute (Paraguay); Glabrous valesia, pearlberry (California).<sup>17</sup>

#### **2.2.1.4 Composición química de *Vallesia glabra***

Estudios realizados sobre la composición química de los extractos muestran un alto contenido de alcaloides y glucósidos, los que actúan como convulsivos al comienzo y después como paralizantes, aboliendo rápidamente los reflejos.

Un estudio fitoquímico preliminar de plantas medicinales del norte del Perú realizado por F. Pérez et al. (2011), determinó la presencia de metabolitos secundarios en hojas, tales como esteroides, flavonoides, taninos, saponinas y alcaloides. Los esteroides, por su parte, poseen función hormonal y participan en los mecanismos de defensa frente a la infección con microorganismos patógenos (Castilla et al., 2009); los flavonoides y antocianinas presentan propiedades farmacológicas, incluyendo la actividad inhibidora de enzimas, antiinflamatoria, anticancerígena, antibacteriana, antitumoral y antiviral (Litter, 1998; García-Valdecasas et al., 1999); los taninos son polifenoles hidrosolubles, antidiarreicos, antioxidantes naturales, antisépticos y vasoconstrictores (Gruenwald et al., 2000). Las saponinas tienen actividad antimicrobiana y contra infecciones del tracto urinario (Guerra et al., 2008); los alcaloides son sustancias con actividad fisiológica muy intensa en dosis pequeñas, se les atribuye efectos antitrombóticos, antiinflamatorios y vasodilatadores (Lores et al., 1996).<sup>17</sup>

#### **2.2.1.5 Usos y propiedades de la especie *Vallesia glabra***

- **Uso medicinal y fitotóxico:**

Con el transcurrir de los años, los pueblos se han servido de las propiedades medicinales de *Vallesia glabra* usándola de todas las formas. En los centros poblados aledaños al río Chira en Perú, se utiliza continuamente. Tiene un gran poder germicida para heridas, y para cualquier infección dermatológica. Se usan las hojas molidas o el extracto para bajar la fiebre. Y se usa toda la planta machacada como un buen desinflamante en el tratamiento del acné.

Entre los pueblos Izoceño-Guaraní del sudeste de Bolivia, la planta

tiene muchos usos en la medicina tradicional: las cenizas de las hojas quemadas se aplican a la piel para tratar la dermatitis; el dolor reumático es también tratado aplicando una pomada hecha de hojas; el macerado de hojas también se usa para tratar el dolor de vejiga.<sup>17</sup>

- **Usos culturales**

En México se ha empleado la planta en varias formas culturales y religiosas, incluso para evitar hechizos o que patógenos etéreos entren en llagas o lesiones. Esta planta es muy utilizada por los chamanes en Ecuador, para hacer limpieza cuando una persona está con vómitos, fiebre, mareos, diarreas lo sacuden con esta planta y lo soplan con aguardiente hasta curar.<sup>17</sup>

- **Servicios ecosistémicos**

La especie *Vallesia glabra* ofrece hábitat para animales (insectos, aves, reptiles); Es alimento para aves (fruto maduro); Además, Cun cun sirve para aumentar la fertilidad del suelo y detener el avance del desierto. Fue una de las especies utilizadas por el departamento de Ciencia y Conservación del Jardín botánico Kew Royal, durante el Festival del Huarango en Ica. Para restaurar, aumentar la biodiversidad y como especie biocontroladora de los bosques secos del sur de Perú.<sup>17</sup>

- **Uso productivo**

Se utiliza como repelente de insectos defoliadores y nectarífero. También existe referencia de que la planta es útil como parte de la alimentación de pollos de engorde, con un efecto significativo en el aumento de peso y su madera se utiliza para hacer escobas y sillas artesanalmente.<sup>17</sup>

### 2.2.1.6 Extractos

Los denominados “**extractos** son preparaciones líquidas (**extractos** fluidos y tinturas) o semisólida (**extractos** blandos o densos), o sólida (**extractos** secos), obtenidos desde de drogas vegetales o tejidos animales en estado por lo general seco”.<sup>18</sup>

### 2.2.1.7 Obtención de extractos a partir de plantas medicinales

La preparación de los **extractos** es realizado con métodos y procedimientos específicos, usando alcohol etílico u otro solvente adecuado. Pudiendo ser mezclados diferentes lotes de droga vegetal o tejido animal previo a la extracción. Los componentes de naturaleza vegetal o tejido animal antes de la extracción debe someterse a un tratamiento preliminar, entre otras cosas, inactivación de enzimas, molienda o trituración. Los restos no deseados deben ser eliminadas previo a la extracción.<sup>19</sup>

Los componentes vegetales, tejido animal y solvente empleado para los extractos deben cumplir con las farmacopeas. Para los **extractos** secos donde el solvente orgánico es extraído por evaporación, suele emplearse solvente recuperado o reciclado, siempre que el proceso de recuperación sea controlado y monitoreado para que el solvente cumpla los estándares apropiados antes del reuso o mezclado con otros solventes.<sup>19</sup>

“El agua utilizada para la preparación de extractos debe ser de calidad adecuada. Excepto para el ensayo de endotoxinas bacterianas, el agua cumple con la sección de agua purificada. El agua potable puede ser usada si cumple con la especificación definida para la producción de un determinado extracto”.<sup>19</sup>

Donde sea aplicable, la concentración para lograr la consistencia se logra utilizando métodos adecuados, como son la presión reducida y a una temperatura a la cual el deterioro de los constituyentes es reducido al mínimo.<sup>19</sup>

En el proceso de obtención de los extractos, “los aceites esenciales que hayan sido separados durante el proceso pueden ser repuestos al extracto en una etapa apropiada en el proceso de manufactura. Los excipientes utilizados se pueden adicionar en diferentes etapas convenientes del proceso de manufactura por ejemplo, mejorar la calidad tecnológica tal como la homogeneidad o consistencia. Los estabilizadores y preservativos antimicrobianos también pueden ser adicionados”.<sup>19</sup>

### **2.2.2 Actividad antibacteriana**

El vocablo tiene relación a una sustancia cuyas características tienen la capacidad de remover agentes bacterianos o la inhibición de su desarrollo o multiplicación sin incurrir en el daño del objeto u organismo que las porta. Estos agentes con efecto contra las bacterias se pueden separar en dos tipos según el efecto que ejerce sobre las bacterias, estos son, bactericidas y bacteriostáticos.<sup>20</sup>

#### **- CATEGORÍAS DE ANTIMICROBIANOS:**

Estas “comprenden dos tipos

#### **I. Bactericidas:**

1.  $\beta$ -lactámicos: Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapénicos, Monobactámicos
2. Aminoglucósidos
3. Glicopéptidos: Vancomicina, Teicoplanina
4. Quinolonas
5. Fosfocina

## II. Bacteriostáticos:

1. Sulfamidas
2. Clindamicina
3. Macrólidos
4. Tetraciclinas
5. Cloramfenicol: Para la Neisserias, meningitidis y H. influenzae es bactericida".<sup>20</sup>

### 2.2.2.1 Clasificación de las bacterias

#### Según su forma:

Estas bacterias presentan formas diversas, una misma especie puede presentar distintas morfologías, lo que se conoce como **pleomorfismo**. Gran parte de ellas presentan un tamaño diez veces menor que el de las células eucariotas, es decir, entre 0,5 y 5  $\mu\text{m}$ . De éste modo, se puede diferenciar hasta tres tipos principales de bacterias:<sup>21</sup>

- **Coco**

Proviene del griego *kókkos*, lo que quiere decir, forma de grano, es decir forma esférica. Estas se clasifican en:

- Diplococo**: Cocos en grupos de dos.
- Tetracoco**: Cocos en grupos de cuatro.
- Estreptococo**: Cocos en cadenas.
- Estafilococo**: Cocos racimos irregulares.

- **Bacilo**

Proviene del latín *baculus*, lo que significa "vara", tienen forma de bastoncillo.

- **Formas helicoidales**

- **Vibrio**: de forma curvada y con apariencia de coma, judía o cacahuete.

- **Espirilo:** de apariencia helicoidal rígida.
- **Espiroqueta:** en forma de tirabuzón (helicoidal flexible)

Clasificación según su función:

Las bacterias se pueden dividir también en función de si consumen oxígeno o no para sobrevivir: las aerobias necesitan oxígeno, en tanto que las anaerobias no. Las bacterias que viven en zonas hidrotermales no necesitan oxígeno como fuente de energía.<sup>21</sup>

- **Autótrofas y heterótrofas**

En relación a la fuente de carbono que utilizan para su desarrollo, las bacterias se pueden diferenciar en autótrofas y heterótrofas. Las bacterias autótrofas (producen sus nutrientes), lo obtienen del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). No obstante, la mayor parte de las bacterias son heterótrofas (no producen sus nutrientes) y consiguen el carbono de compuestos derivados de la glucosa.<sup>21</sup>

### **2.2.3 *Staphylococcus aureus***

#### **2.2.3.1. Características microbiológicas**

El género *Staphylococcus* está compuesto por cocos gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5 µm, organizados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Ogston adecuó el nombre de *Staphylococcus*, del griego **staphyle** que significa racimo de uvas, para diferenciar a los cocos causantes de inflamación y supuración. “Son bacterias sin movilidad, no esporuladas, acapsulados, existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. La mayoría de los *staphylococcus* producen catalasa (enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre); característica que se utiliza para diferenciar el género *Staphylococcus* de los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus* que son catalasa negativos”.<sup>22</sup>

El género *Staphylococcus* “presenta 32 especies, de las cuales 16 de ellas están presentes en los humanos, muchas de ellas forman parte de la microbiota de piel y mucosas en humanos, y otras se encuentran sólo entre la flora de otros mamíferos y aves. Variedades de éstas especies son patógenas cuando existe predisposición e inmunosupresión en el huésped o en presencia de cuerpos extraños. En la mayor parte de los casos, cada variedad tiende a ocupar una ubicación anatómica específica en el huésped que coloniza”.<sup>22</sup>

Entre las especies que colonizan al humano, las de mayor importancia clínica son: *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus lugdunensis*; en tanto que en animales se encuentra además del *Staphylococcus aureus* y el *Staphylococcus intermedius*. El *Staphylococcus epidermidis* y el *Staphylococcus aprophyticus* son comúnmente responsables de infecciones relacionadas con dispositivos e infecciones del tracto urinario, siendo éstos menos infecciosos que *Staphylococcus aureus*. “Algunas especies tienen preferencia por sitios específicos, los cuales son indicados por su nombre como *Staphylococcus epidermidis* que coloniza la piel, *Staphylococcus capitis* que coloniza el cuero cabelludo. El *Staphylococcus aureus* se encuentra ampliamente distribuido entre los primates, pero no está restringido únicamente a ellos; por ejemplo, les produce mastitis en el ganado bovino y ovino. En el hombre, la localización nasal del *Staphylococcus aureus* permite su diseminación y, como consecuencia, la multirresistencia a los antibióticos como a la meticilina *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA)”.<sup>22</sup>

### **2.2.3.2 Diagnóstico**

Los datos clínicos y epidemiológicos son fundamentales para orientar el diagnóstico microbiológico, así como la sospecha del agente etiológico causante de la infección, por lo que se requiere del aislamiento y la identificación de *S. aureus* a partir de muestras clínicas. Entre dichas muestras se encuentra en la sangre, tejidos, líquidos normalmente estériles, aspirados de abscesos, las cuales al ser teñidas con la tinción de Gram permiten observar la forma y agrupación, así como una respuesta inflamatoria con la presencia de leucocitos polimorfonucleares.<sup>22</sup>

### **2.2.3.3 Epidemiología**

*Staphylococcus aureus* es uno de los patógenos más importantes a nivel mundial, bacteria oportunista que forma parte de la microflora humana: poco después del nacimiento, los neonatos son colonizados por *Staphylococcus aureus*, los sitios de colonización incluyen el muñón del cordón umbilical, el área perineal, la piel y, a veces, el tracto gastrointestinal. También puede contaminar la vestimenta y la ropa de cama. La colonización más frecuente por *Staphylococcus aureus* es la mucosa nasal, el principal reservorio lo constituye el hombre enfermo o el portador. Es más frecuente la colonización en el hospital, especialmente en pacientes con hemodiálisis, diabéticos tipo 1, pacientes con lesiones cutáneas, sujetos infectados con VIH y adictos a las drogas. El portador nasofaríngeo asintomático es también origen frecuente de *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina. Las infecciones causadas por los MRSA son las mismas a las producidas por cepas sensibles a la metilicina y particularmente las heridas quirúrgicas. Un aspecto importante en años recientes en salud pública son las infecciones por *Staphylococcus aureus* que han reemergido debido a que la bacteria se ha tornado resistente a diversos antibióticos con los que normalmente se les trata. Durante varias décadas se han reportado un gran número de brotes epidémicos de *Staphylococcus aureus* a nivel mundial, sobre todo en los hospitales, centros de atención, clínicas y recientemente ha surgido en la comunidad. Actualmente, estos brotes se dividen como infecciones nosocomiales e infecciones adquiridas en la comunidad.<sup>23</sup>

### **2.2.3.4 Patogenia**

Entre 20 y 50% de la población mundial es portadora de *Staphylococcus aureus* en fosas nasales y 30% de forma permanente en piel y tracto gastrointestinal. Cuando las barreras mecánicas se rompen, esta bacteria puede alcanzar los tejidos más profundos y producir enfermedad. Las personas hospitalizadas con infecciones por *Staphylococcus aureus* se infectan con la misma cepa que coloniza sus fosas nasales, la colonización también permite la transmisión entre individuos del hospital como en la comunidad. Para una adecuada supervivencia e invasión del huésped todo este sistema de factores de virulencia deben de estar

dentro de un sistema de comunicación célula-célula conocido como quorum sensing (QS). Este sistema QS está mediado por pequeñas proteínas producidas por las bacterias que se denominan autoinductoras, y dependiendo de factores ambientales, pueden activar un gran número de genes que contienen los factores de virulencia.<sup>23</sup>

#### **2.2.3.5. Enfermedades causadas por *S. aureus***

Las infecciones causadas por *S. aureus* se “producen por lesiones cutáneas, traumáticas o quirúrgicas que favorecen la penetración de la bacteria desde la piel a los tejidos profundos. Las infecciones por *S. aureus* son supurativas y tienden a producir abscesos debido a su amplia versatilidad. Esta bacteria es capaz de causar enfermedades de amplio espectro como infecciones menores de la piel e infecciones invasoras serias como: infecciones del sistema nervioso central, osteomielitis, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario y el síndrome de choque tóxico, así como infecciones gastrointestinales”.<sup>23</sup>

#### **2.2.4 *Escherichia Coli***

La *Escherichia coli* es una bacteria que esta comunmente en el intestino del ser humano y de los animales de sangre caliente. La mayor parte de las cepas de *Escherichia coli* son inocuas. No obstante algunas de ellas, como *Escherichia coli* productora de toxina Shiga, tienen la probabilidad de provocar graves anomalías por consumo de alimentos. Esta se transmite al hombre básicamente a través del consumo de nutrientes contaminados, como las carnes picadas crudas o poco cocidas, leche cruda, hortalizas y productos germinadas crudos contaminadas.<sup>24</sup>

La *Escherichia coli* produce toxinas conocidas como toxina Shiga por su similitud con las toxinas producidas por *Shigella dysenteriae*. La *Escherichia coli* productora de toxina Shiga puede crecer a temperaturas que oscilan entre 7 °C y 50 °C, con una temperatura óptima de 37 °C. Muchas de ellas pueden desarrollarse en alimentos ácidos, hasta a un pH de 4,4, y en alimentos con una proporción de agua ( $a_w$ ) mínima de 0,95. Esta toxina se destruye cociendo los alimentos una temperatura de 70 °C o más. *Escherichia coli* O157: H7 es el serotipo de *Escherichia coli*.<sup>24</sup>

### **2.2.4.1 Síntomas**

Entre los síntomas que destacan en estas infecciones son “los dolores abdominales y algunos casos a diarrea sanguinolenta (colitis hemorrágica). También puede haber fiebre y vómitos. El tiempo de desarrollo varía entre tres y ocho días, con una mediana de tres a cuatro días. La mayor parte de los pacientes se recuperan en diez días, pero en un pequeño porcentaje de los casos (especialmente niños pequeños y ancianos) la infección puede conducir a una patología potencialmente mortal, como el síndrome hemolítico urémico (SHU). El SHU se destaca por una insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica y trombocitopenia (deficiencia de plaquetas)”.<sup>25</sup>

Tienen la posibilidad de manifestarse además con neuropatías (como convulsiones, accidente cerebrovascular y coma) en el 25% de los pacientes con SHU, así como secuelas renales crónicas, por lo general, en aproximadamente un 50% de los sobrevivientes.<sup>25</sup>

La población que sufre diarrea sanguinolenta o calambres abdominales intensos tienen que buscar atención médica. Los antibióticos no tienen que formar parte del tratamiento de los pacientes con patologías por *E. coli* productora de toxina Shiga, y probablemente incrementa el riesgo de Síndrome Hemolítico Uremico mas adelante.<sup>25</sup>

## **2.3. Formulación de hipótesis**

### **2.3.1. Hipótesis general**

El extracto etanólico de las Hojas del *Vallesia glabra* (Cun cun) presenta efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

### **2.3.2. Hipótesis específicas**

1. El extracto etanólico de las Hojas del *Vallesia glabra* (Cun cun) presenta varios tipos de metabolitos secundarios.

2. La concentración al 10%, 20%, 30%, 50% y al 100% del extracto etanólico de las Hojas del *Vallesia glabra* (Cun cun) presenta efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

## 2.4 Variables

- **Variable independiente:** extracto etanólico de las hojas de *Vallesia glabra* (Cun cun).
- **Variable dependiente:** Actividad antibacteriana

### 2.4.1 Tabla de Operacionalización de variables

La variable actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Vallesia glabra* (Cun cun) se ha operacionalizado en la búsqueda de inhibición del crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en cultivos de Agar Mueller Hinton.

**TABLA N° 1: OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	METODOLÓGIA	INSTRUMENTO
V.I Extracto etanólico de las hojas de <i>Vallesia glabra</i> (Cun cun).	Fitoquímica	Metabolitos secundarios.	Marcha fitoquímica.	Ficha de observación Ad-hoc.
V.D Actividad antibacteriana	Microbiología	Halos de inhibición.	Método de difusión de disco.	Ficha de observación Ad-hoc.

## 2.5 MARCO CONCEPTUAL

***In vitro***: Es una técnica que consiste en realizar un experimento ya sea en un tubo de ensayo o en un ambiente controlado (laboratorio).

**Patógeno**: Microorganismo que daña a un huésped por invasión, lesión o porque producen sustancias tóxicas.

**Actividad Antibacteriana**: Es la capacidad de eliminar y/o inactivar microorganismos, impidiendo su desarrollo y/o impedir su actividad patógena.

**Halos de inhibición**: Es la zona donde alrededor de un disco de antibiótico, en el que no hay desarrollo bacteriano en una placa de agar inoculado con bacterias.<sup>26</sup>

**Mueller Hinton Agar**: Es un medio que carece de inhibidores, sustancia gelatinosa que se usa como medio de cultivo para el crecimiento de una gran cantidad de microorganismos tanto Gram positivos como Gram negativos y hongos. Recomendado universalmente para la realización de la prueba de sensibilidad. Medio de cultivo nutritivo no selectivo que promueve el desarrollo microbiano.<sup>26</sup>

**Maceración**: Es el modo de extraer los principios activos de una planta, usando un solvente como agua, alcohol, éter, etc. Dejándolo reposar por un tiempo determinado, esto podría ser horas o días.

**Anova**: La técnica del Análisis de la Varianza (ANOVA o AVAR) es una de las técnicas más utilizadas en los análisis de los datos de los diseños experimentales. Se utiliza cuando queremos contrastar más de dos medias, por lo que puede verse como una extensión de la prueba, para diferencias de dos medias. El ANOVA es un método muy flexible que permite construir modelos estadísticos para el análisis de los datos experimentales cuyo valor ha sido constatado en muy diversas circunstancias. Básicamente es un

procedimiento que permite dividir la varianza de la variable dependiente en dos o más componentes.<sup>26</sup>

**Metabolito Secundario:** Las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios.

**Screening 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.

**Solvente Orgánico:** Son compuestos orgánicos volátiles basados en el elemento químico Carbono. Se utilizan solos o en combinación con otros agentes para disolver materias primas, productos o materiales residuales, utilizándose para la limpieza, para modificar la viscosidad, como agente tenso activo, como plastificante, como conservante o como portador de otras sustancias que una vez depositadas, quedan fijadas evaporándose el disolvente.

## **CAPITULO III**

### **METODOLOGÍA**

#### **3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN**

##### **3.1.1 Tipo**

La investigación es de tipo “experimental”, ya que se analiza la causa y efecto que generarán las variables propuestas en el presente estudio. Para ello, se manipula de manera intencionada la variable independiente extracto etanólico de las hojas del *Vallesia glabra* (Cun cun) para luego analizar las consecuencias de manipulación que se genera en la variable dependiente (Efecto antibacteriano).

##### **3.1.2 Nivel**

La presente investigación será de nivel “aplicado”, puesto que se emplea una serie de instrumentos de medición para registrar los procesos que se generen al manipular una de las variables.

##### **3.1.3 Diseño de investigación**

La investigación tiene un diseño experimental. Donde se tendrá un grupo control y uno experimental. Los mismos que se medirán a través de pruebas de pretest y postest y fichas de observación para el registro de los hallazgos.

## **3.2. Población y muestra**

### **3.2.1 Población y muestra vegetal**

La población vegetal de este estudio está constituida por arbustos de *Vallesia glabra*, de la provincia de Nazca en el departamento de Ica y la muestra vegetal es dos kilogramos de hojas frescas de *Vallesia glabra*.

### **3.2.2 Población y muestra microbiológica**

La población microbiológica de este estudio está constituida por cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y la muestra microbiológica por cepas específicas de *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

## **3.3 Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

### **3.3.1. Técnicas.**

La recolección de datos de la investigación se realizó mediante la técnica de observación por la cual se registraron datos que nos permitieron desarrollar la presente investigación.

### **3.3.2. Instrumentos de Recolección de Datos**

El instrumento de recolección de datos que se utilizó en la presente investigación fueron fichas de observación ad-hoc elaboradas para fines específicos de la investigación.

El instrumento que se utilizó para la recolección de datos del estudio fitoquímico fue una Ficha de Observación ad-hoc. (Anexo 2)

El instrumento que se utilizó para la recolección de datos del estudio microbiológico fue una ficha de observación ad-hoc. (anexo 3)

### 3.3.3. Validación de Instrumentos

El instrumento que se realizó para la recolección de datos son fichas de observación Ad-hoc, éstos fueron viables debido a su sencillez y económicas para la aplicación del investigador. Asimismo requirieron de validación previa a su aplicación final, la cual se estableció en base a la determinación de su viabilidad, confiabilidad y validez.

La validez del contenido de las fichas de observación Ad-hoc de recolección de datos se realizó mediante la evaluación por juicio de expertos.

- Q.F. Pineda Pérez, Newman Mario
- Q.F. Flores López, Óscar Bernuy

### 3.4 Materiales, insumos y equipos

- **Materiales**

- Vernier
- Pinza punta plana
- Placas Petri de vidrio estériles
- Asa de Drigalsky
- Tubos estériles con tapa rosca
- Tubos de ensayo
- Viales de vidrio de 5mL de capacidad
- Puntas para micropipeta de 20-200  $\mu$ L y 0.5-5mL
- Micropipetas calibradas de 20-200  $\mu$ L y 0.5-5mL
- Discos vacíos para difusión en placa
- Fracos de vidrio de 500mL de capacidad con tapa rosca

- **Insumos**

**Medios de cultivo:**

- Agar nutritivo (Agar Mueller Hinton<sup>4</sup> marca Scharlau)
- Suero fisiológico estéril (NaCl 0.9%)

**Inóculo:**

- Escherichia coli* ATCC 8739
- Staphylococcus aureus* ATCC 6538

**Muestra:**

- Extracto alcohólico de hojas de Perillo al 100%, 50%, 30%, 20% y 10%

**Reactivos:**

- Etanol 96°

**Equipos:**

- Incubadora 35°C
- Autoclave Vertical Digital
- Potenciómetro
- Baño María
- Balanza analítica
- Mechero Bunsen
- Estufa 40°C

### 3.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

La investigación experimental se realizó en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### 3.5.1. Recolección de la Muestra Vegetal

Se recolectó dos kilos de hojas frescas de *Vallesia glabra* (Cun cun), de tres arbustos, en la provincia de nazca del departamento de Ica, durante el mes de octubre de 2017. El Botánico José Ricardo Campos De La Cruz autenticó la muestra según Certificado de Identidad Botánica (anexo 4), en el Herbario del Museo de Historia Natural.

### **3.5.2. Preparación de la Muestra**

Se seleccionó las mejores hojas y se procedió a limpiar con alcohol de 96°, brocha y algodón para eliminar residuos que podrían contaminar la muestra. Se pesó la cantidad exacta de dos kilogramos de hojas y se llevó a secar a la estufa a una temperatura no mayor de 40 °C, para luego ser trituradas.

### **3.5.3. Obtención del extracto etanólico**

A los dos kilos de hojas molidas se le añadió tres litros de etanol al 96% y se dejó en maceración protegido de la luz por un periodo de siete días. Dos veces al día se agitaba la muestra para mejorar el proceso de extracción.

Al finalizar el periodo de maceración, el líquido obtenido se llevó a una estufa a 40° C para concentrar el extracto y se obtuvo un volumen final de 700 mL.

### **3.5.4. Estudio Microbiológico**

Para realizar el estudio microbiológico se trabajó con cinco concentraciones: 100%, 50%, 30%, 20% y 10%.

Para realizar las diluciones a partir del extracto alcohólico se usó alcohol 96° y dichas diluciones se realizaron de la siguiente forma:

100%: se colocó 5mL del extracto en un tubo de ensayo.

50%: se colocó 2.5mL del extracto en un tubo de ensayo y se completó con 2.5mL de etanol.

30%: se colocó 1.5mL del extracto en un tubo de ensayo y se completó con 3.5mL de etanol.

20%: se colocó 1mL del extracto en un tubo de ensayo y se completó con 4mL de etanol.

10%: se colocó 0.5mL del extracto en un tubo de ensayo y se completó con 4.5mL de etanol.

Se utilizó discos vacíos para difusión en placa, los cuales se embebieron con la muestra a analizar, la cantidad de muestra agregada a los discos fue de 40µL. La preparación de los discos se realizó por triplicado.

También se agregó el diluyente (etanol 96%) en respectivos discos para utilizarlos como control negativo y la cantidad de diluyente agregada a los discos también fue de 40 µL.

#### **3.5.4.1 Desarrollo del método:**

##### **Preparación del Agar Mueller Hinton:**

El agar Mueller - Hinton se preparó con agua destilada de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Autoclavar el agar a 121°C y 15 lb/pg<sup>2</sup> durante 15 minutos. Inmediatamente después de autoclavar dejar enfriar en Baño María a 45 - 50°C. Una vez temperado verter el preparado fresco y tibio a placas petri de vidrio estériles, para dar un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm. Esto corresponde a 25- 30 ml para placas de 100 mm de diámetro. El medio de agar se dejó enfriar a temperatura ambiente. El pH de cada lote de agar Mueller Hinton debe tener un pH entre 7,2 - 7,4. Esta medición se realizó sumergiendo el bulbo del electrodo del potenciómetro en el agar antes de autoclavar.

##### **Preparación de los inóculos bacterianos:**

A partir de colonias puras de los microorganismos *Escherichia coli* ATCC 8739 y *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 se tomó una cierta cantidad de colonias y se diluyó en los respectivos tubos de ensayo conteniendo 10 mL de suero fisiológico (cloruro de sodio 0.9%) de tal manera que la solución resultante tenga una turbidez muy similar al tubo N°1 de la escala de MacFarland (escala turbidimétrica que consiste en una serie de tubos con turbidez creciente que permite hallar la concentración aproximada de una solución bacteriana) el cual corresponde a una concentración de  $3 \times 10^8$  ufc/mL.

A partir de esta última solución se realizó una dilución de 1 en 3, para ello de esta solución preparada se tomó 3 mL y se diluyó a un volumen total de 9 mL con suero fisiológico en un tubo con tapa rosca. Todos los materiales usados deben ser estériles y también el área de trabajo. La solución resultante tiene una concentración de  $1 \times 10^8$  ufc/mL.

Bajo las mismas condiciones se realizó una dilución de 1 en 100 añadiendo 0.1 mL de la solución anterior a un tubo con 9.9 mL de suero fisiológico. La solución resultante tendrá una concentración de  $1 \times 10^6$  ufc/mL. Por lo tanto al final tendremos dos tubos de ensayo con soluciones de  $1 \times 10^6$  ufc/mL de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

### **Inoculación de las placas:**

Agregar 100 uL del inóculo bacteriano preparado ( $1 \times 10^6$  ufc/mL) a cada una de las placas y con la ayuda de una espátula de Drigalsky esparcir el inóculo por toda la placa de tal manera que se obtenga un crecimiento homogéneo, para lo cual se desliza el asa en la placa en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie de la misma. Luego se repite el procedimiento rotando la placa  $60^\circ$  en dos oportunidades más. Deben extremarse los cuidados en sembrar las placas de borde a borde, porque de lo contrario puede haber problemas en la realización de las lecturas. Dejar secar 3 a 5 minutos antes de colocar los discos.

### **Preparación de los discos de antibióticos:**

Los discos de antibióticos fueron discos comerciales de la marca OXOID Gentamicina  $10 \mu\text{g}$ .

### **Aplicación de los discos a las placas inoculadas:**

Estos deben ser colocados con pinza estéril. Luego de estar sobre el agar se debe presionar los discos levemente para que queden adheridos al mismo. Deben estar a más de 15 mm del borde de la placa y deben distribuirse de tal manera que no haya superposición de los halos de inhibición. Los discos de antibióticos fueron colocados de la siguiente manera:

Tres discos del antibiótico en una placa inoculada con un microorganismo de tal manera que se obtengan resultados por triplicado.

Luego de colocados los discos la placa debe incubarse a 35-37°C durante 18-24 horas. La placa debe colocarse en forma invertida.

Los discos con la muestra fueron colocados de manera similar, tres discos por cada placa y estos también se incubaron a 35-37°C durante 18-24 horas.

### **Interpretación de los resultados**

Luego de 18 a 24 horas de incubación, cada placa es revisada. Los halos de inhibición resultantes deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento bacteriano. Los diámetros de la zona de inhibición completa son medidos en milímetros pasando por el centro del disco. La medición se realiza con un vernier digital. Los valores de las mediciones por triplicado deben promediarse y compararse con las medidas de los halos de inhibición producidos por los antibióticos.

#### **3.5.5. Marcha Fitoquímica.**

La marcha fitoquímica se realizó en el laboratorio de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega con la finalidad de determinar la presencia de metabolitos secundarios en el extracto etanólico de hojas de *Vallesia glabra* (Cun cun).

##### **a) Identificación de compuestos fenólicos:**

- **Reactivo de FeCl<sub>3</sub>.**- (Cloruro Ferrico disuelto en agua).- 2 ml del extracto etanólico, se agrega 5 gotas de reactivo a, será positivo al cambio de coloración de pardo a azul.

##### **b) Identificación de Cumarinas.**

- **Reactivo de NaOH 10%.**- A 2ml extracto etanólico, se añade 2 gotas de reactivo a y observamos un color Amarillo intenso.

### c) Identificación de Taninos.

- **Reactivo de Gelatina + NaCl.-** A 2 ml de extracto etanólico se agrega 5 gotas de reactivo gelatina y se añade 3 gotas de NaCl 10% será positivo si se forma un coloide.

### d) Identificación de Saponinas.

- **Prueba de la Espuma.-** A 2ml de extracto etanólico se añade 1ml de H<sub>2</sub>O destilada, se somete a una agitación por 2 minutos. La presencia de saponina se manifiesta por la formación de una espuma.

### e) Identificación de Flavonoides.

- **Limaduras de Mg + HCl.-** A 2ml de extracto etanólico se agrega un pedacito de cinta de Mg<sup>o</sup> se agita y después de 5 minutos se añade 1 gota de HCL. Se considera positivo cuando se colorea naranja o rojo.

### f) Identificación de Alcaloides.

- **Reactivo Dragendorff.-** A 2ml extracto etanólico agregamos 3 gotas del reactivo y observamos la formación de un precipitado color anaranjado el cual indica la presencia de alcaloides.
- **Reacción de Mayer.-** A 2 ml del extracto etanólico añadimos 3 gotas del reactivo, la cual nos indica la formación de un precipitado blanco lechoso.
- **Reactivo de Wagner.-** A 2ml del extracto etanólico se agregó 3 gotas del reactivo, vamos a observar un precipitado color marrón.

## CAPITULO IV

### PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

#### 4.1 Presentación de resultados

**TABLA 2.-** Actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* por el método de Kirby Bauerel.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> POR EL METODO DE KIRBY BAUEREL							
N° DE PLACA	CONCENTRACION (%) DEL EXTRACTO ETANOLICO DE <i>Vallesia glabra</i> ( <i>Cun cun</i> )					CONTROLES	
						GENTAMICINA ug	ETANOL 96°
	LONGITUD DEL HALO DE INHIBICION (mm)						
	10%	20%	30%	50%	100%	10 ug	100 ul
PLACA 1	6						
	6						
	6						
PLACA 2		10					
		11					
		11					
PLACA 3			13				
			13				
			14				
PLACA 4				18			
				19			
				17			
PLACA 5					21		
					21		
					22		
PLACA 6						15	
						16	
						15	
PLACA 7							6
							6
							6

En la tabla 2, podemos observar que si hay una acción antibacteriana del extracto de *Vallesia glabra* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, siendo el de 50% y 100% la de mayor concentración frente a la gentamicina (control positivo). Asimismo, la medida de cada disco es de 6 mm por lo tanto si una muestra presenta esta medida se considera como un resultado negativo, los resultados que tienen un valor mayor de 6 incluyen la medida del disco.

**TABLA 3.-** Actividad antibacteriana contra *Escherichia Coli* por el método de Kirby Bauerel.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA <i>ESCHERICHIA COLI</i> POR EL METODO DE KIRBY BAUEREL							
N° DE PLACA	CONCENTRACION (%) DEL EXTRACTO ETANOLICO DE <i>Vallesia glabra</i> ( <i>Cun cun</i> )					CONTROLES	
						GENTAMICINA ug	ETANOL 96°
	LONGITUD DEL HALO DE INHIBICION (mm)						
	10%	20%	30%	50%	100%	10 ug	100 ul
PLACA 1	6						
	6						
	6						
PLACA 2		6					
		6					
		6					
PLACA 3			6				
			6				
			6				
PLACA 4				6			
				6			
				6			
PLACA 5					6		
					6		
					6		
PLACA 6						15	
						16	
						15	
PLACA 7							6
							6
							6

En la tabla 3, podemos observar que el extracto etanólico del *Vallesia glabra* no tiene una acción antibacteriana frente a cepas de *Escherichia Coli* en ningún porcentaje. Asimismo la medida de cada disco es de 6 mm por lo tanto si una muestra presenta esta medida se considera como un resultado negativo, los resultados que tienen un valor mayor de 6 incluyen la medida del disco.

**TABLA 4.-** Resultados de la Marcha fitoquímica del extracto alcohólico de hojas *Vallesia glabra*.

<b>SCREENING FITOQUIMICO</b>				
	<b>REACTIVO</b>	<b>DEMOSTRACION</b>	<b>IDENTIFICACION</b>	<b>RESULTADOS</b>
<b>IDENTIFICACION DE COMPUESTOS FENOLICOS</b>	FeCl <sub>3</sub>	2ml extracto + 5 gotas del reactivo	Cambio de coloración pardo a azul	-
<b>IDENTIFICACION DE CUMARINAS</b>	NaOH 10%	2ml extracto + 2 gotas del reactivo	Amarillo intenso	++
<b>IDENTIFICACION DE TANINOS</b>	Rvo Gelatina + NaCl	2ml extracto + 5 gotas de reactivo + 3 gotas de NaCl 10%	Coloide	-
<b>IDENTIFICACION DE SAPONINAS</b>	H <sub>2</sub> O	2ml extracto + 1ml de H <sub>2</sub> O destilada, agitación por 2 minutos	Forma espuma	++
<b>IDENTIFICACION DE FLAVONOIDES</b>	Limaduras de Mg	2ml extracto + 7 gotas del reactivo (agitar) colocar 1 gota de HCl	Cambio de coloración a naranja o rojo.	-
<b>IDENTIFICACION DE ALCALOIDES</b>	Reactivo Dragendor	2ml extracto + 3 gotas del reactivo	Precipitado color anaranjado	+++
	Reactivo mayer	2ml extracto + 3 gotas del reactivo	Precipitado color blanco lechoso	+++
	Reactivo Wagner	2ml extracto + 3 gotas del reactivo	Precipitado color marron	++

Leyenda:

(+ + +): Reacción muy evidente

(++) : Reacción evidente

(+): Reacción poco evidente

(-): No hubo reacción

En la tabla 4, podemos observar que el extracto etanólico de *Vallesia glabra*, presenta cumarinas, saponinas y alcaloides.

## 4.2. Análisis Estadístico

Tabla 5. Estadística Descriptiva de los Halos de Inhibición encontrados del Extratos etanólicos de las Hojas de *Vallesia glabra* “Cun cun” frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

N° Placa	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	<b>6,0000</b>	,00000	,00000	<b>6,0000</b>	<b>6,0000</b>	6,00	6,00
2	3	<b>15,3333</b>	,57735	,33333	<b>13,8991</b>	<b>16,7676</b>	15,00	16,00
3	3	<b>6,0000</b>	,00000	,00000	<b>6,0000</b>	<b>6,0000</b>	6,00	6,00
4	3	<b>10,6667</b>	,57735	,33333	<b>9,2324</b>	<b>12,1009</b>	10,00	11,00
5	3	<b>13,3333</b>	,57735	,33333	<b>11,8991</b>	<b>14,7676</b>	13,00	14,00
6	3	<b>18,0000</b>	1,00000	,57735	<b>15,5159</b>	<b>20,4841</b>	17,00	19,00
7	3	<b>21,3333</b>	,57735	,33333	<b>19,8991</b>	<b>22,7676</b>	21,00	22,00
Tot al	21	<b>12,9524</b>	5,54505	1,21003	<b>10,4283</b>	<b>15,4765</b>	6,00	22,00

### Leyenda:

1 = Control Negativo (Alcohol Etilico 96°)

2 = Control Positivo (Gentamicina 10ug)

3 = Extracto Alcohólico Al 10%

4 = Extracto Alcohólico Al 20%

5 = Extracto Alcohólico Al 30%

6 = Extracto Alcohólico Al 50%

7 = Extracto Alcohólico Al 100%

En la tabla 5. Podemos observar que todas las medias se encuentran dentro de los límites establecidos a un intervalo de confianza del 95% y un error relativo del 5%. Además ningún dato se excluye y por ende se aplicará estadística inferencial para determinar si existen diferencias significativas de las medias de cada tratamiento aplicado.

**Tabla 6. Prueba de homogeneidad de varianzas de los halos de inhibición del extracto etanólico de las Hojas de *Vallesia glabra* “Cun cun” frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.**

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
2,769	6	14	,055

Donde:

$H_0$  = Las varianzas de los tratamientos aplicados son homogéneos ( $P < 0.05$ )

$H_1$  = Las varianzas de los tratamientos aplicados no son homogéneos ( $P > 0.05$ )

La prueba de homogeneidad de varianzas nos permite determinar si las varianzas de cada tratamiento aplicado son iguales o diferentes estadísticamente, depende de ello para determinar el tipo de prueba estadística inferencial a ser aplicado. En la **Tabla 6** observamos que  $P > 0.05$ , por lo tanto se concluye que las varianzas de los tratamientos aplicados no son homogéneas, rechazando la hipótesis nula. Es importante el resultado ya que esto nos permite elegir la prueba estadística inferencial correspondiente que en este caso será la prueba ANNOVA ONE WAY o de un factor.

**Tabla 7. Prueba de ANOVA de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico de las Hojas de *Vallesia glabra* “Cun cun” frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.**

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	610,286	6	101,714	305,143	,000
Dentro de grupos	4,667	14	,333		
Total	614,952	20			

DONDE:

$H_0$  = No existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ( $P > 0.05$ )

$H_1$  = Existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ( $P < 0.05$ )

La prueba ANNOVA One Way nos permite descifrar si existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados comparando la media de cada uno de ellos. En la Tabla 7 al observar el resultado ( $P < 0.05$ ) se afirma la hipótesis alternativa, es decir, existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados. Si deseamos determinar que medias son estadísticamente diferentes se debe aplicar pruebas POST HOC, en este caso se aplicará la prueba de TUKEY.

**Tabla 8. Comparaciones múltiples de la prueba de Tukey de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico de las Hojas de *Vallesia glabra* “Cun cun” frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.**

(I) CONCENTRACION	(J) CONCENTRACION	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1,00	2,00	-9,33333*	,47140	,000	-10,9430	-7,7237
	3,00	,00000	,47140	1,000	-1,6097	1,6097
	4,00	-4,66667*	,47140	,000	-6,2763	-3,0570
	5,00	-7,33333*	,47140	,000	-8,9430	-5,7237
	6,00	-12,00000*	,47140	,000	-13,6097	-10,3903
	7,00	-15,33333*	,47140	,000	-16,9430	-13,7237
2,00	1,00	9,33333*	,47140	,000	7,7237	10,9430
	3,00	9,33333*	,47140	,000	7,7237	10,9430
	4,00	4,66667*	,47140	,000	3,0570	6,2763
	5,00	2,00000*	,47140	,011	,3903	3,6097
	6,00	-2,66667*	,47140	,001	-4,2763	-1,0570
	7,00	-6,00000*	,47140	,000	-7,6097	-4,3903
3,00	1,00	,00000	,47140	1,000	-1,6097	1,6097
	2,00	-9,33333*	,47140	,000	-10,9430	-7,7237
	4,00	-4,66667*	,47140	,000	-6,2763	-3,0570
	5,00	-7,33333*	,47140	,000	-8,9430	-5,7237
	6,00	-12,00000*	,47140	,000	-13,6097	-10,3903
	7,00	-15,33333*	,47140	,000	-16,9430	-13,7237
4,00	1,00	4,66667*	,47140	,000	3,0570	6,2763
	2,00	-4,66667*	,47140	,000	-6,2763	-3,0570
	3,00	4,66667*	,47140	,000	3,0570	6,2763
	5,00	-2,66667*	,47140	,001	-4,2763	-1,0570
	6,00	-7,33333*	,47140	,000	-8,9430	-5,7237
	7,00	-10,66667*	,47140	,000	-12,2763	-9,0570
5,00	1,00	7,33333*	,47140	,000	5,7237	8,9430
	2,00	-2,00000*	,47140	,011	-3,6097	-,3903
	3,00	7,33333*	,47140	,000	5,7237	8,9430
	4,00	2,66667*	,47140	,001	1,0570	4,2763
	6,00	-4,66667*	,47140	,000	-6,2763	-3,0570
	7,00	-8,00000*	,47140	,000	-9,6097	-6,3903
6,00	1,00	12,00000*	,47140	,000	10,3903	13,6097
	2,00	2,66667*	,47140	,001	1,0570	4,2763
	3,00	12,00000*	,47140	,000	10,3903	13,6097
	4,00	7,33333*	,47140	,000	5,7237	8,9430
	5,00	4,66667*	,47140	,000	3,0570	6,2763
	7,00	-3,33333*	,47140	,000	-4,9430	-1,7237
7,00	1,00	15,33333*	,47140	,000	13,7237	16,9430
	2,00	6,00000*	,47140	,000	4,3903	7,6097
	3,00	15,33333*	,47140	,000	13,7237	16,9430
	4,00	10,66667*	,47140	,000	9,0570	12,2763
	5,00	8,00000*	,47140	,000	6,3903	9,6097
	6,00	3,33333*	,47140	,000	1,7237	4,9430

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

**Leyenda:**

- 1 = Control Negativo (Alcohol Etilico 96°)
- 2 = Control Positivo (Gentamicina 10ug)
- 3 = Extracto Alcohólico Al 10%
- 4 = Extracto Alcohólico Al 20%
- 5 = Extracto Alcohólico Al 30%
- 6 = Extracto Alcohólico Al 50%
- 7 = Extracto Alcohólico Al 100%

La prueba de TUKEY es una prueba estadística que nos permite realizar comparaciones múltiples y además determina que medias son estadísticamente homogéneas. En la Tabla 8 observamos que existen diferencias significativas entre todos los extractos y controles tanto negativo y positivo a excepción de 1 y 3.

**Tabla 9. Prueba de Subconjuntos de datos de Tukey de los halos de inhibición encontrados del extracto etanólico de las Hojas de *Vallesia glabra* “Cun cun” frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.**

**HSD Tukey**

CONCENTRACION	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
1	3	6,0000					
3	3	6,0000					
4	3		10,6667				
5	3			13,3333			
2	3				15,3333		
6	3					18,0000	
7	3						21,3333
<b>Sig.</b>		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 3,000.

**Leyenda:**

- 1 = Control Negativo (Alcohol Etilico 96°)
- 2 = Control Positivo (Gentamicina 10ug)
- 3 = Extracto Alcohólico Al 10%
- 4 = Extracto Alcohólico Al 20%
- 5 = Extracto Alcohólico Al 30%
- 6 = Extracto Alcohólico Al 50%
- 7 = Extracto Alcohólico Al 100%

La prueba de TUKEY determina también la homogeneidad de cada concentración. En el Tabla 9 se observa que todos los extractos y tanto el control negativo como positivo presentan medias heterogéneas, por ello se deduce que el extracto etanólico de las hojas de *Vallesia glabra* “Cun cun” al 100% presenta el mejor efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*.

### 4.3 Discusión de los Resultados

En la evaluación fitoquímica de la especie *Vallesia glabra* de este estudio, se evidenció la presencia de los siguientes metabolitos secundarios; cumarinas, saponinas y alcaloides. Estos resultados se pueden comparar con el estudio de Pérez et al. (2014), como resultado de la marcha fitoquímica de la planta Cun cun, se evidenció presencia de los siguientes metabolitos; esteroides, flavonoides, cardiotónicos, taninos, saponinas y alcaloides.

La investigación demostró la efectividad antimicrobiana del extracto etanólico de las Hojas del *Vallesia glabra* frente a la cepa de *Staphylococcus aureus*; quién es responsable de infecciones de la piel. Según el estudio de Raymundo S. (Piura 2015), la especie *Vallesia glabra* tiene un uso tradicional por familias de Sullana; como medicinal por que lo utilizan para infecciones dermatológicas (varicela, acné y sarpullido)...

## CAPITULO V

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de las Hojas del *Vallesia glabra* (Cun cun) tiene los siguientes tipos de metabolitos secundarios; cumarinas, saponinas y alcaloides.
2. El extracto etanólico de de las Hojas del *Vallesia glabra* presenta actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* en concentracion de 100%. Asimismo no se observó actividad antibacteriana frente a la cepa *Escherichia coli*. El extracto en concentraciones de 50% y 100% presentó mayor actividad antibacteriana que el control positivo (gentamicina) y no presentó ninguna actividad antibacteriana en el control negativo (alcohol etílico de 96°).

#### 5.2 RECOMENDACIONES

1. En la evaluación de la actividad antibacteriana hay factores que influyen en los resultados como: el tamaño del inóculo, temperatura, y tiempo de incubación, por ello se debe controlar adecuadamente durante el procedimiento microbiológico y evitar las posibles contaminaciones de otras bacterias ambientales que puedan interferir en el ensayo.
2. Se desarrollen más estudios con otros tipos de extractos de la planta *Vallesia glabra* (Cun cun), y realizar los estudios farmacológicos. Asimismo que se realicen investigaciones adicionales a fin de identificar y aislar el metabolito secundario que es responsable de la actividad antibacteriano.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Azuero A, Jaramillo C, San Martín D. et al. Análisis del efecto antimicrobiano de doce plantas medicinales de uso ancestral en Ecuador. [Revista on-line]. 2016. [Acceso 20 mayo 2017]. 9(20): 11-18. Disponible en: <http://ojs.unemi.edu.ec/index.php/cienciaunemi/article/view/342>
2. Raymundo S. Etnobotánica de las especies del Monte Ribereño en el río Chira, Sullana. Universidad Nacional de Piura. Escuela Profesional de Ciencias Biológicas. Perú 2015.
3. 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. Universidad Nacional de Piura. Escuela Profesional de Ciencias Biológicas. Perú 2014.
4. Pérez F, León G, Rodríguez F, et al. Estudio fitoquímico preliminar de plantas medicinales del norte del Perú. (2011).
5. Medrano A, et al. Actividad antimalárica in vitro por citometría de flujo de extractos de especies vegetales de la familia Apocynaceae de la región Loreto, LIPNAA. (Iquitos 2017).
6. Arce W. Aislamiento e identificación estructural e los alcaloides de la corteza de la especie vegetal *Aspidosperma camporum* Mull Arg (Quillobordon) utilizado como antimalárico. (Iquitos 2014).
7. Zeches M, Mesbah K, Richard B, et al. Alcaloides de hojas y tallos de *Vallesia glabra*. Artículo en Planta Medica. Bolivia 1995.
8. Giménez G, Albornoz P. Anatomía foliar de *Vallesia glabra* (Apocynaceae), especie de importancia medicinal y en frugivoría. Facultad de Ciencias

Naturales e Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán (Argentina 2013).

9. Morán E, Zamora L, Camacho S, et al. Capacidad antioxidante, cinética de barrido de radicales y perfil fenólico de extractos de metanol de plantas silvestres del sur de Sonora, México. Universidad Sonora (México 2014).
10. Abad A, Bahsas A, Delgado P, et al. Actividad antimicrobiana y estudio fitoquímico preliminar de *Mandevilla veraguasensis* (Seem.) Helms. (Apocynaceae). Universidad los Andes, Mérida. (Venezuela 2007).
11. Edwin E. et, al. Efecto antimicrobiano, antiulceroso y antidiarreico de las hojas de buganvillavillea (India 2007).
12. Rojas N. "Estudio de las propiedades antimicrobianas de los alcaloides de *Vallesia antillana* Wood".
13. Barbosa I, et al. Actividad antibacteriana de extractos de Apocynaceae y CIM de extracto orgánico de la raíz de *Tabernaemontana angulata*. Revista cielo. (Brasil 2002).
14. Ciccio J, et al. Estudio Fitoquímico de *Stemmadenia glabra* Benth. (Apocynaceae) II. Aislamiento e identificación de alcaloides. (Costa Rica).
15. Luz H, et al. Prospección fitoquímica de *Himatanthus drasticus* Plumel (Apocynaceae), de la mesorregión oriental maranhense. (Brasil 2014).
16. MOSQUERA O, et al. Evaluación de la actividad insecticida in vitro de extractos vegetales contra la broca del café. (Colombia)
17. Castañeda N. *Vallesia glabra* (Cav.) Link. Universidad Nacional Agraria La Molina. Facultad de ciencias forestales. (Lima 2018).
18. Análisis de Extractos. Temas de Farmacognosia- Plantas medicinales. [En línea] 2012. [Acceso 11 diciembre 2017]. Disponible en: <https://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/extractos/>

- 19.** González A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. [En línea]. 2004. [Acceso 14 diciembre 2017]. Disponible en: <http://www.bdigital.unal.edu.co/1173/1/angelaandreaconzalezvilla.2004.pdf>
- 20.** Brooks G. Microbiología médica. España: Mc. Graw Hill. 2001
- 21.** Murray P. Microbiología Médica. España: Elsevier. 2014
- 22.** Cervantes E. Características generales del *Staphylococcus aureus*. Rev Latinoam Patol Clin MedLab. [En línea]. 2014. [Acceso 04 diciembre 2017]. 61 (1): 28-40. Disponible en: <http://www.medigraphic.com>
- 23.** Cavalieri, Stephen, y col. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. [En Línea]. Seattle, Washington; 2005 [citado el 27 enero 2017]. 242 p. Disponible en: [http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_view&gid=22691&Itemid=270](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22691&Itemid=270)
- 24.** *E. Coli*. Organización Mundial de la Salud. [En Línea]. 2017. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
- 25.** Davis y col. Effects of Commonl y Used Topical Antimicrobial Agentson *Acinetobacter baumannii*:
- 26.** An In Vitro Study. Military Medicine, [Internet] 2008 [citado el 30 de enero 2017] 173, 1:74–78, disponible en: <http://militarymedicine.amsus.org/doi/pdf/10.7205/MILMED.173.1.74>
- 27.** Ostrosky, E y col. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas

medicinais. Revista Brasileira de Farmacognosia [En línea]. 2008 [citado el 03 de Enero de 2017]. 18(2): 301-307. Disponible en URL: <http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v18n2/26.pdf>

## ANEXOS

### ANEXO 1: MATRIZ DE CONSISTENCIA

“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LA HOJAS DE <i>VALLESIA GLABRA</i> (CUN CUN) FRENTE CEPAS DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> Y <i>ESCHERICHIA COLI</i> ESTUDIO IN VITRO”						
PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES		METODOLOGÍA	INTRUMENTOS
			VARIABLE INDEPENDIENTE	INDICADORES	ENFOQUE	
¿El extracto etanólico de las hojas del <i>Vallesia glabra</i> (Cun cun) presenta efecto antibacteriano frente cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> ?	Determinar si el extracto etanólico de las hojas del <i>Vallesia glabra</i> (Cun cun) presenta efecto antibacteriano frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> .	El extracto etanólico de las hojas del <i>Vallesia glabra</i> (Cun cun) presenta efecto antibacteriano frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> .	Extracto etanólico de las hojas del <i>Vallesia glabra</i> (Cun cun).	Presencia de metabolitos secundarios.	Cuantitativo	Ficha de observación Ad-hoc del estudio fitoquímico.  Ficha de observación Ad-hoc del estudio microbiológico.

PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPÓTESIS ESPECÍFICAS	VARIABLE DEPENDIENTE	INDICADORES	NIVEL	INTRUMENTOS
<p>¿Qué tipo de metabolitos secundarios estarán presentes en el extracto etanólico de las hojas del <i>Vallesia glabra</i> (Cun cun)?</p> <p>¿La concentración al 10%, 20%, 30%, 50% y al 100% del extracto etanólico de las hojas del <i>Vallesia glabra</i> (Cun cun) presentará efecto antibacteriano frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>?</p>	<p>Hallar los tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas del <i>Vallesia glabra</i> (Cun cun)?</p> <p>Determinar si la concentración al 10 %, 20%, 30%, 50% y al 100% del extracto etanólico de las hojas del <i>Vallesia glabra</i> (Cun cun) presentan efecto antibacteriano frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>.</p>	<p>El extracto etanólico de las hojas del <i>Vallesia glabra</i> (Cun cun) presenta varios tipos de metabolitos secundarios.</p> <p>La concentración al 10%, 20%, 30%, 50% y al 100% del extracto etanólico de las hojas del <i>Vallesia glabra</i> (Cun cun) presenta efecto antibacteriano frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>.</p>	Actividad antibacteriana.	Diferencia de los halos de las concentraciones .	<p>Aplicado</p> <p><b>DISEÑO</b></p> <p>Experimental</p>	

## ANEXO 2: FICHA DE VALIDACIÓN POR JUICIO DE EXPERTO



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA  
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

### FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE SCREENING FITOQUÍMICO

#### “EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DEL VALLESIA GLABRA (CUN CUN) FRENTE A CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y ESCHERICHIA COLI ESTUDIO IN VITRO”

#### INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.

Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea.

SCREENING FITOQUÍMICO			
	REACTIVO	DEMOSTRACIÓN	IDENTIFICACIÓN
IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	FeCl <sub>3</sub>	2ml extracto + 5 gotas del reactivo	Cambio de coloración pardo a azul
IDENTIFICACIÓN DE CUMARINAS	NaoH 10%	2ml extracto + 2 gotas del reactivo	Amarillo intenso
IDENTIFICACIÓN DE TANINOS	Rvo Gelatina + NaCl	2ml extracto + 5 gotas de reactivo + 3 gotas de NaCl 10%	Coloide
IDENTIFICACIÓN DE SAPONINAS	H <sub>2</sub> O	2ml extracto + 1ml de H <sub>2</sub> O destilada agitación por 2 minutos	Forma espuma
IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES	Linaduras de Mg <sub>2</sub>	2ml extracto + 7 gotas del reactivo (agitar) colocar 1° gtas de HCl	Cambio de coloración a verde petróleo tenue
IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES	Reactivo Dragendor	2ml extracto + 3 gotas del reactivo	Precipitado color anaranjado
	Reactivo maver	2ml + 3 gotas del reactivo	Precipitado color blanco lechoso
	Reactivo wagner	2ml + 3 gotas del reactivo	Precipitado color marrón

Leyenda:

(+ + +): Reacción muy evidente

(++) : Reacción evidente

(+): Reacción poco evidente

(-): No hubo reacción



Ficha de Validación por Juicio de Experto.  
**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA**

**HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO**  
**CUESTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

N°

**“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DEL VALLESIA GLABRA (CUN CUN) FRENTE A CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y ESCHERICHIA COLI ESTUDIO IN VITRO”**

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

**MENOS DE**

**50 – 60 – 70 – 80 – 90 – 100**

1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?..... ( ) ( ) ( ) ( ) (→) ( )

---

2. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?..... ( ) ( ) ( ) ( ) (→)

---

3. ¿Qué porcentaje de un ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?..... ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) (→)

---

4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?..... ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) (→)

---

5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia logica?..... ( ) ( ) ( ) ( ) (→) ( )

---

6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrán datos similares si se explicara en otras muestras?..... ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) (→)

**SUGERENCIAS**

1. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?

.....  
 .....

- ¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?

.....  
 .....

- ¿Qué ítems considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

.....  
 .....

Fecha: 23-07-18

Validado por: O.F. OSCAR FLORES Lopez Flores  
 C.Q.F.P. 19190

### ANEXO 3: FICHA DE VALIDACIÓN POR JUICIO DE EXPERT



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA  
 FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS  
 Y BIOQUÍMICA

#### FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

#### "EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DEL VALLESIA GLABRA (CUN CUN) FRENTE A CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y ESCHERICHIA COLI ESTUDIO IN VITRO"

##### INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.  
 Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.  
 Procure realizar todas las mediciones bajo las mismas condiciones de comodidad.  
 En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.  
 Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.  
 Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA STAPHYLOCOCCUS AUREUS POR EL METODO DE KIRBY BAUEREL							
N° DE PLACA	CONCENTRACIÓN (%) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE VALLESIA GLABRA (CUN CUN)					CONTROLES	
						GENTAMICINA ug	ETANOL 96°
	LONGITUD DEL HALÓ DE INHIBICIÓN (mm)						
	10%	20%	30%	50%	100%	10 ug	100 ul
PLACA 1							
PLACA 2							
PLACA 3							
PLACA 4							
PLACA 5							
PLACA 6							
PLACA 7							



Ficha de Validación por Juicio de Experto.  
**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA**

**HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO**  
**CUESTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

N°

**“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DEL VALLESIA GLABRA (CUN CUN) FRENTE A CEPAS DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS Y ESCHERICHIA COLI ESTUDIO IN VITRO”**

Después de revisado el instrumento, es valiosa su opinión acerca de lo siguiente:

**MENOS DE**  
**50 – 60 – 70 – 80 – 90 – 100**

1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?..... ( ) ( ) ( ) ( ) (X) ( )

---

2. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidas a los conceptos del tema?..... ( ) ( ) ( ) ( ) (X)

---

3. ¿Qué porcentaje de un ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?..... ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) (X)

---

4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de fácil comprensión?..... ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) (X)

---

5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia logica?..... ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) (X)

---

6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrán datos similares si se explicara en otras muestras?..... ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) (X)

**SUGERENCIAS**

1. ¿Qué ítems considera usted que deberían agregarse?

.....  
 .....

¿Qué ítems estima que deberían eliminarse?

.....  
 .....

¿Qué ítems considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

.....  
 .....

Fecha: 23-07-18

Validado por: [Signature]

COFP 18/20

## ANEXO 4: CERTIFICADO BOTÁNICO.

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ

CONSULTOR BOTÁNICO

C. B. P. N° 3796

Tel: 017512863 - RPM 963689079



### CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

#### Certifica:

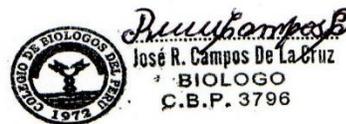
Que, CHRISTIAN QUINTANILLA CARHUAMACA y JACQUELÍN GUERRERO LEZAMA, han solicitado la identificación y certificación botánica de una planta colectada en el Provincia de Nazca. Departamento de Ica, donde es conocida con el nombre común de “cun cun” o “perlillo”, la muestra ha sido identificada como *Vallesia glabra* (Cav.) Link. Y según el Sistema Integrado de Clasificación de las Angiospermas de Arthur Cronquist. (1981), ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO : Plantae  
DIVISIÓN : Magnoliophyta  
CLASE : Magnolopsida  
SUBCLASE : Asteridae  
ORDEN : Gentianales  
FAMILIA : Apocynaceae  
GENERO : *Vallesia*  
ESPECIE : *Vallesia glabra* (Cav.) Link

**Nombres vulgares: “cun cun”, “perlillo”**

Se expide la certificación a solicitud de los interesados con fines de investigación científica.

Lima, 05 de julio del 2018



Jr. Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07 / e-mail: joricampos@yahoo.es

**ANEXO 5: TESTIMONIOS FOTOGRÁFICOS**

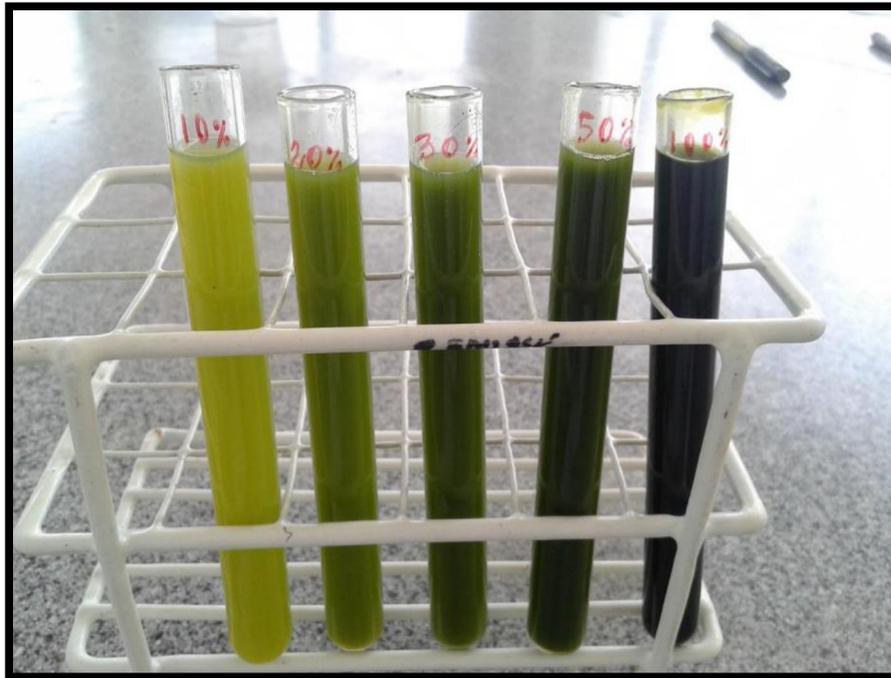
**MACERACIÓN DE HOJAS SECAS DE CUN CUN**



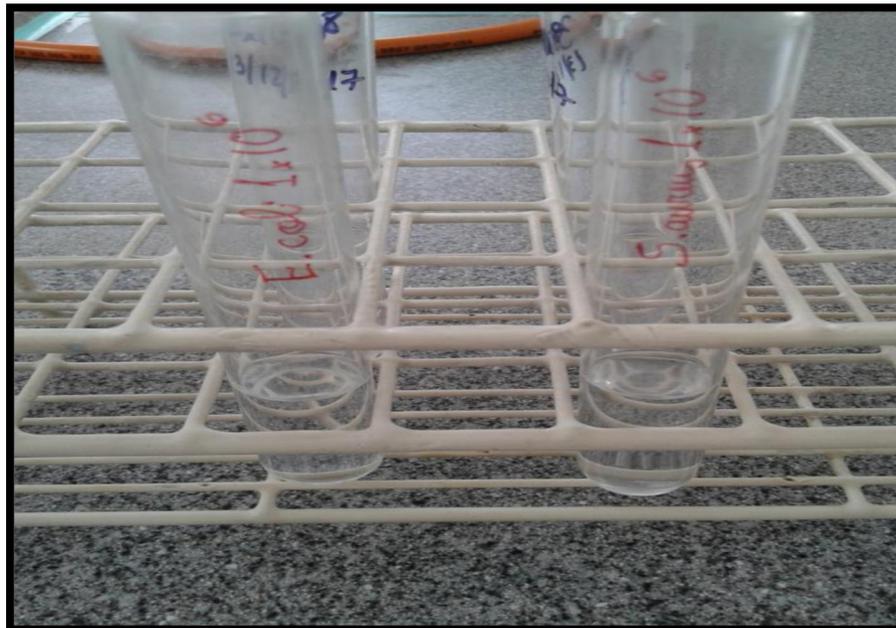
**EXTRACTO ETANÓLICO CONCENTRADO DE HOJAS DE CUN CUN**



## CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO DILUIDAS CON ETANOL



## INÓCULOS BACTERIANOS



**SE TOMO EL TUBO N° 1 DE LA ESCALA DE MACFARLAND**



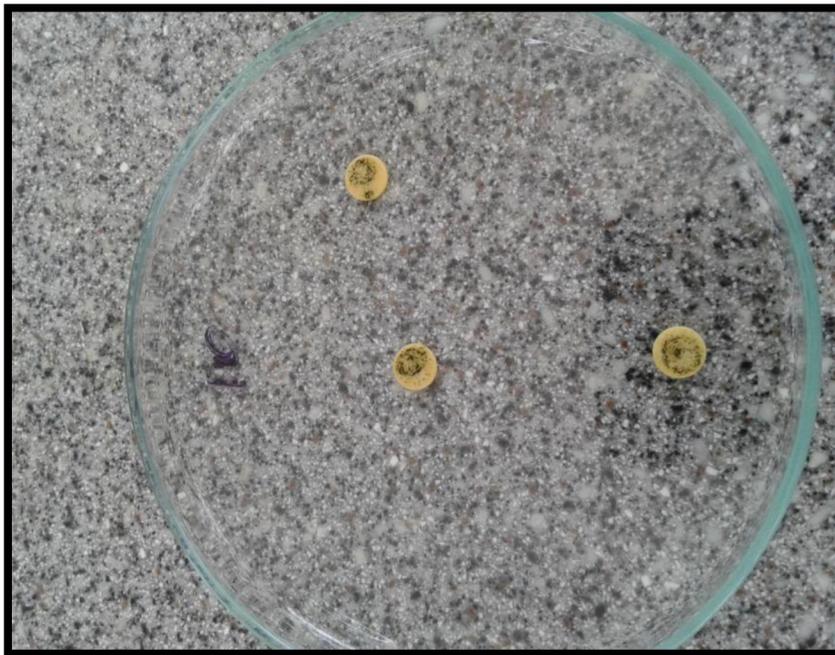
**OBSERVACIÓN DE LA TURBIDEZ BASADO EN ESCALA DE MACFARLAND**



## INOCULACIÓN DE LAS PLACAS DE LAS BACTERIAS E. COLI Y S. AUREUS



## APLICACIÓN DEL EXTRACTO AL 10% EN LOS DISCOS



**APLICACIÓN DEL EXTRACTO AL 20% EN LOS DISCOS**



**APLICACIÓN DEL EXTRACTO AL 30% EN LOS DISCOS**



**APLICACIÓN DEL EXTRACTO AL 50% EN LOS DISCOS**



**APLICACIÓN DEL EXTRACTO AL 100% EN LOS DISCOS**



## COLOCACIÓN DE LOS DISCOS EN LAS PLACAS



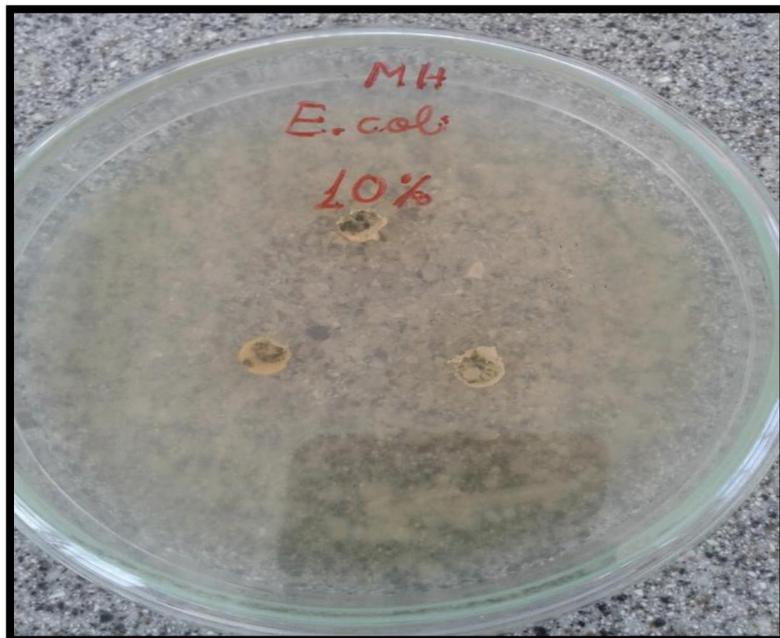
## MEDICIÓN DEL HALO INHIBITORIO



LA MEDICIÓN SE REALIZA CON EL VERNIER DIGITAL



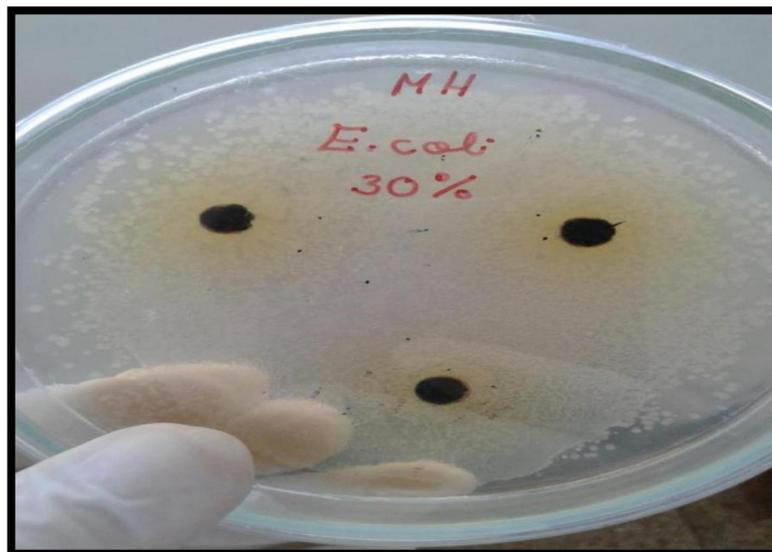
SE OBSERVÓ QUE NO CRECIÓ HALO INHIBITORIO AL 10% DEL EXTRACTO  
FRENTE A CEPAS DE E. COLI



SE OBSERVÓ QUE NO CRECIÓ HALO INHIBITORIO AL 20% DEL EXTRACTO FRENTE A  
CEPAS DE E. COLI



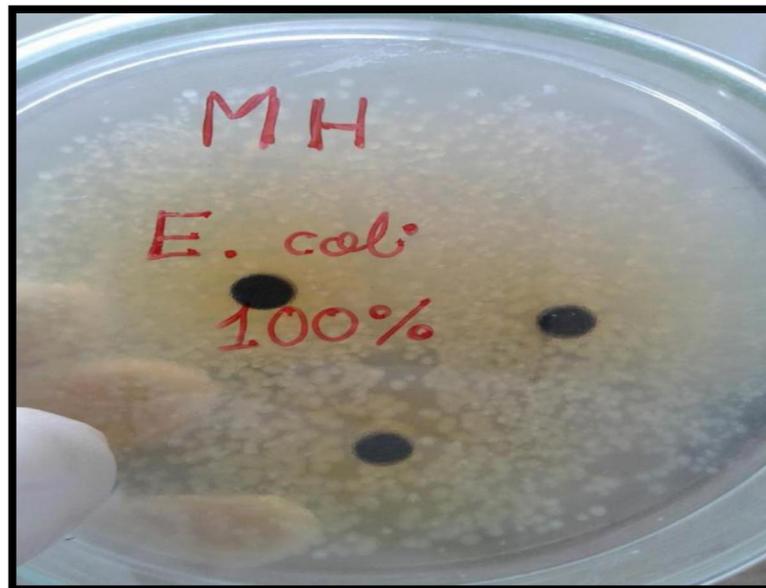
SE OBSERVÓ QUE NO CRECIÓ HALO INHIBITORIO AL 30% DEL EXTRACTO FRENTE A  
CEPAS DE E. COLI



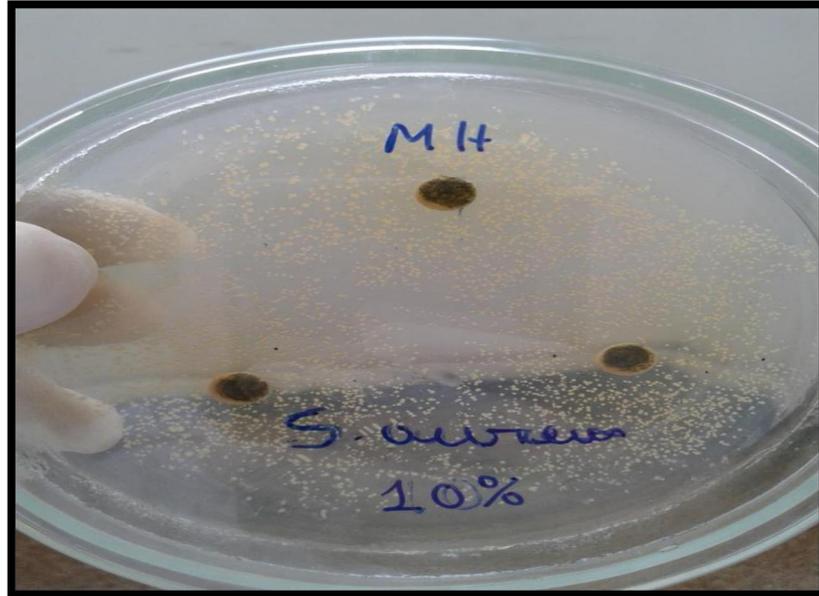
SE OBSERVÓ QUE NO CRECIÓ HALO INHIBITORIO AL 50% DEL EXTRACTO FRENTE A  
CEPAS DE E. COLI



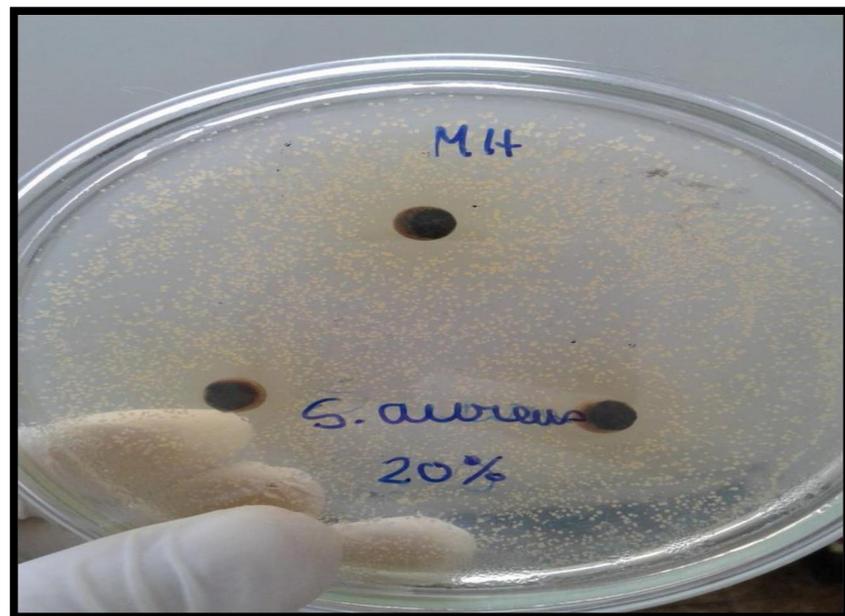
SE OBSERVÓ QUE NO CRECIÓ HALO INHIBITORIO AL 100% DE LA MUESTRA  
FRENTE A CEPAS DE E. COLI



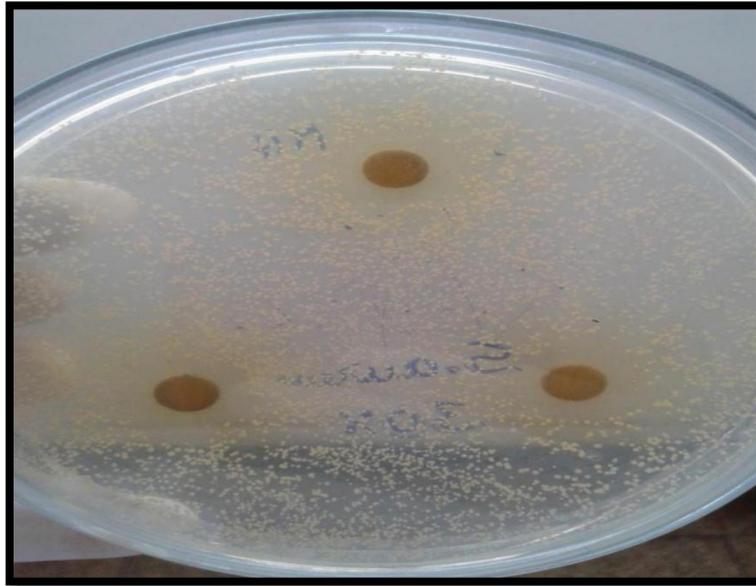
SE OBSERVÓ QUE NO CRECIÓ HALO INHIBITORIO AL 10% DEL EXTRACTO  
FRENTE A CEPAS DE S. AUREUS



SE OBSERVÓ CRECIMIENTO DE HALO INHIBITORIO AL 20% DEL EXTRACTO  
FRENTE A CEPAS DE S. AUREUS



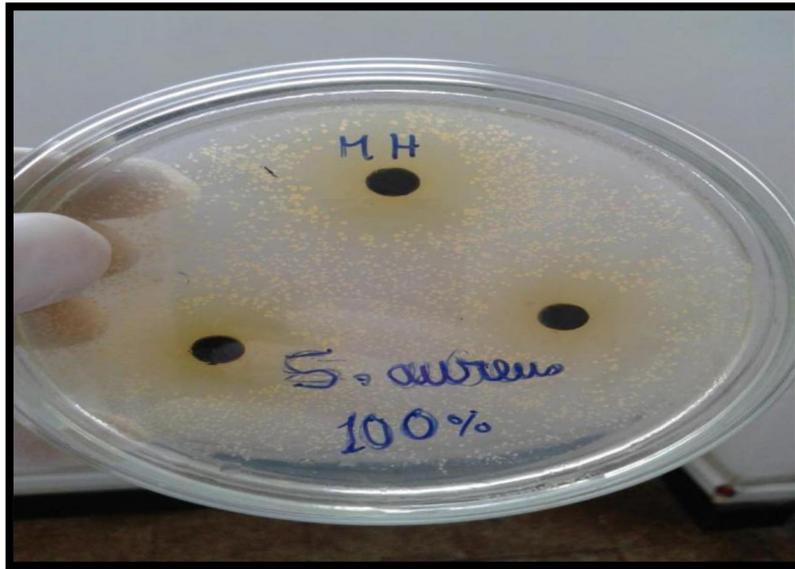
SE OBSERVÓ CRECIMIENTO DE HALO INHIBITORIO AL 30% DEL EXTRACTO FRENTE A  
CEPAS DE S. AUREUS



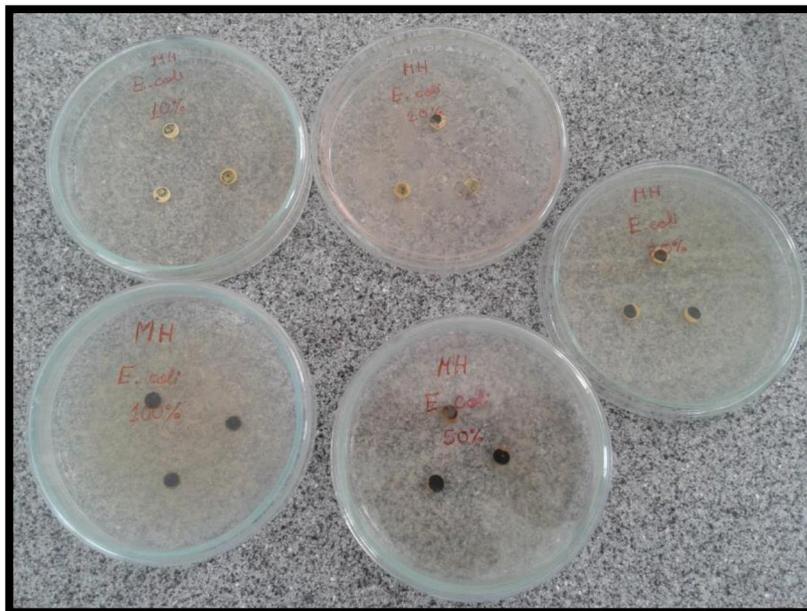
SE OBSERVÓ CRECIMIENTO DE HALO INHIBITORIO AL 50% DEL EXTRACTO FRENTE A  
CEPAS DE S. AUREUS



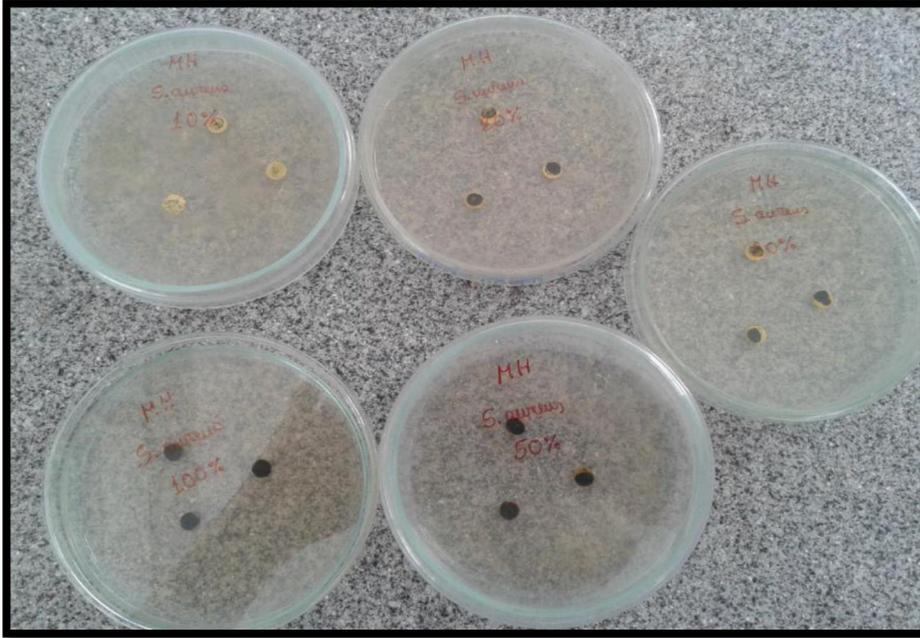
SE OBSERVÓ CRECIMIENTO DE HALO INHIBITORIO AL 100% DEL EXTRACTO  
FRENTE A CEPAS DE S. AUREUS



PLACAS DE E. COLI LISTAS PARA SER INCUBADAS



**PLACAS DE S. AUREUS LISTAS PARA SER INCUBADAS**



**LABORATORIO DE MICROBIOLOGIA**

