

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

**“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
LAS HOJAS DE *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl.
(MULLACA) EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *IN
VITRO*”**

**Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico y
Bioquímico**

TESISTAS:

Bach. DANIEL, LAGOS TALAVERANO

Bach. ROCIO ELENA, QUINTO ANCIETA

ASESOR:

Mg. Q. F. TEÓFILO CHIRE MURILLO

LIMA – PERÚ

2018

TÍTULO:

**“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
LAS HOJAS DE *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl.
(MULLACA) EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, IN
VITRO”**

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos, en especial a mi hermana Martha Lagos, por su amor, su apoyo incondicional y ánimo constante, que siempre me ofrecen y así he podido lograr uno de mis objetivos, que es culminar mi carrera profesional. **Daniel.**

A mi padre Gregorio Quinto Damián y a mi madre Fortunata Ancieta Huamán, que siempre estuvieron apoyándome incondicionalmente dándome su apoyo en cada momento. A mi hija Abigail quien es el motor y motivo de mi vida para seguir luchando y a mi familia por estar siempre en los buenos y en los malos momentos. **Rocio.**

AGRADECIMIENTO

A nuestro asesor Mg. Químico Farmacéutico Teófilo Chire Murillo, por su permanente disposición e incondicional apoyo, y por compartir sus conocimientos, tiempo y dedicación a esta investigación.

A todos los docentes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, por guiarnos con sus conocimientos, a lo largo de nuestra carrera profesional.

ÍNDICE GENERAL

Dedicatoria

Agradecimientos

Índice de Tablas

Índice de Figuras

Índice de Anexos

Resumen

Abstract

Introducción	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	3
1.1. Descripción de la realidad problemática	3
1.2. Identificación y formulación del problema	5
1.2.1. Problema general.....	5
1.2.2. Problemas específicos	5
1.3. Objetivos de la investigación	5
1.3.1. Objetivo general	5
1.3.2. Objetivos específicos	5
1.4. Justificación de la investigación	6
1.5. Limitaciones de la investigación.....	7
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	8
2.1. Antecedentes de la Investigación	8
2.1.1. Nacionales	8
2.1.2. Internacionales.....	9
2.2. Bases teóricas	12
2.2.1. Descripción general de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) <i>Endl.</i> (mullaca).....	12
2.2.2. Características	12
2.2.3. Clasificación taxonómica.....	12
2.2.4. Propiedades curativas	13
2.2.5. Metabolitos secundarios.	13
2.2.6. Tipos de metabolitos secundarios básicos	14

2.2.7. Métodos de extracción.....	16
2.2.8. Concentración de extractos.....	16
2.2.9. Tamizaje fitoquímico.....	16
2.2.10. Generalidades de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.2.11. Antimicrobianos.....	18
2.3. Formulación de hipótesis.....	19
2.3.1. Hipótesis general.....	19
2.3.2. Hipótesis específicas.....	19
2.4. Variables e indicadores.....	20
2.4.1. Tabla de operacionalización de variables.....	20
2.5. Definición de términos básicos.....	20
CAPITULO III: METODOLOGÍA.....	22
3.1. Tipo y diseño de investigación.....	22
3.1.1. Tipo de la investigación.....	22
3.1.2. Diseño de la investigación.....	22
3.2. Población y muestra de la investigación.....	23
3.2.1. Población.....	23
3.2.2. Muestra.....	23
3.3. Técnicas e Instrumentos de recolección de datos.....	23
3.3.1. Técnicas.....	23
3.3.2. Instrumentos.....	24
3.4. Actividad antimicrobiana del extracto.....	25
3.4.1. Fórmula para determinar el porcentaje de inhibición.....	25
3.4.2. Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición.....	25
3.5. Materiales, equipos y reactivos.....	25
3.5.1. Materiales.....	25
3.5.2. Equipos.....	26
3.5.3. Reactivos.....	26
3.6. Procedimiento experimental.....	27
3.7. Técnicas estadísticas de análisis de datos.....	34

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUCIONES	35
4.1. Resultados de la investigación.....	35
4.1.1. Resultados de la prueba de solubilidad.....	35
4.1.2. Resultados del screening fitoquímico.....	36
4.1.3. Resultados del ensayo microbiológico	37
4.2. Discusión de resultados.....	41
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	45
5.1. Conclusiones	45
5.2. Recomendaciones	46
Referencias bibliográficas	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 01: Operacionalización de variables e indicadores	20
Tabla N° 02: Resumen de resultados de juicio de expertos	24
Tabla N° 03: Actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición.	25
Tabla N° 04: Resultados del ensayo de solubilidad.....	35
Tabla N° 05: Resultados del screening fitoquímico	36
Tabla N° 06: Cuadro de valores normales globales de las 3 concentraciones 100%, 50% y 25% del extracto etanólico, control positivo (Gentamicina 10ug) y el control negativo (alcohol etílico 96°).	37
Tabla N° 7: Cuadro de valores promedios globales de las 3 concentraciones 100%, 50% y 25% del extracto etanólico, control positivo (Gentamicina 10ug) y el control negativo (alcohol etílico 96°)	38
Tabla N° 8: Actividad antibacteriana del extracto etanólico, según diámetro de la zona de inhibición y porcentaje de inhibición.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1: Cronograma del proceso de preparación del extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. (mullaca)..	28
Figura N° 2: Gráfico de barras de los valores promedios globales de las 3 concentraciones 100%, 50% y 25% del extracto etanólico, control positivo (Gentamicina 10ug) y el control negativo (alcohol etílico 96°)..	38
Figura N° 3: Gráfico de barras de la categorización del extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. (mullaca), según diámetro de la zona de inhibición..	40
Figura N° 4: Gráfico de barras de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. (mullaca), según porcentaje de inhibición..	41
Figura N° 5: A) Recolección de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. B) Selección de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. C) Limpieza de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. D) Secado de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl.	62
Figura N° 6: A) Trituración de las hojas secas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. B) Pesado de las hojas trituradas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. C) Preparación del extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. D) Filtración de la solución macerada de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl.	63
Figura N° 7: A) Marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. B) Resultados de la marcha fitoquímica de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. C) Resultado de la identificación de alcaloides. D) Resultado de la identificación de saponinas.	64
Figura N° 8: A) Pesado de agar Muller Hinton para la preparación de medio de cultivo. B) Preparación de las diluciones al 25%, 50% y 100% del extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl.	65
Figura N° 9: A) Preparación de los discos con las muestras y controles. B) Aplicaciones de los discos a las placas inoculadas con <i>Staphylococcus aureus</i> .	65

Figura N° 10: A) Resultados del control negativo (alcohol etílico 96°). No presentó inhibición. Crecimiento total. B) Resultados del control positivo (Gentamicina 10ug). Presentó inhibición.....	66
Figura N° 11. A y B) Resultados de la dilución al 100% del extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica (Benth.) Endl.</i> (mullaca). Presento inhibición.....	66
Figura N° 12. A y B) Resultados de la dilución al 50% del extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica (Benth.) Endl.</i> (mullaca). Presento inhibición.....	67
Figura N° 13. A y B) Resultados de la dilución al 25% del extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica (Benth.) Endl.</i> (mullaca). Presento inhibición.....	67
Figura N° 14. A) Resultados del control negativo (alcohol etílico 96°); control positivo (Gentamicina 10ug) y del extracto etanólico al 25%, 50% Y 100% de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica (Benth.) Endl.</i> B) Medición de halo de inhibición con el vernier.....	68
Figura N° 15. Culminación del proceso.....	68

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1	Matriz de consistencia.....	52
Anexo N° 2	Certificado botánico.....	54
Anexo N° 3	Instrumento de recolección de datos microbiológico	55
Anexo N° 4	Ficha de validación microbiológico	56
Anexo N° 5	Ficha de observación de prueba de solubilidad.....	57
Anexo N° 6	Ficha de validación prueba de solubilidad	58
Anexo N° 7	Instrumento de recolección screening fitoquímico	59
Anexo N° 8	Ficha de validación screening fitoquímico	61
Anexo N° 9	Testimonios fotográficos	62

RESUMEN

La presente investigación se realizó para determinar si el extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) posee efecto antibacteriano en cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *in vitro* a diferentes concentraciones: 25 %, 50 % y 100 %. Se comparó con el control positivo (Gentamicina 10ug). La investigación es experimental y el tipo de estudio básica y transversal. Las muestras fueron hojas frescas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) provenientes de la provincia de Yauyos, Lima. La preparación del extracto se realizó mediante el método de maceración etanólica. La marcha fitoquímica determinó la presencia de metabolitos como alcaloides, aminoácidos, saponinas, taninos, quinonas y fenoles. La evaluación de la inhibición del crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 se hizo en cultivos de agar Mueller Hinton, según el manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Difusión en disco (Kirby-Bauer) del Instituto Nacional de Salud (INS) donde se determinaron los halos de inhibición. En el extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) al 25% frente a cepas de *Staphylococcus aureus* se observó una actividad antibacteriana del 32.98% (es inactivo comparado con gentamicina 10ug); en el extracto etanólico al 50% se observó una actividad antibacteriana de 41.02% (es poco activo comparado con gentamicina 10ug) y en el extracto etanólico al 100% se observó una actividad antibacteriana de 52.53% (es moderadamente activo comparado con gentamicina 10ug). Por lo tanto el extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) al 100% frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 posee mejor efecto antibacteriano.

Palabras clave: Extracto etanólico, mullaca, antibacteriano, gentamicina.

ABSTRAC

The present investigation was carried out to determine if the ethanolic extract of the leaves of *Muehlenbeckia volcanica* (Benth.) Endl. (mullaca) has an antibacterial effect on strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *in vitro* at different concentrations: 25%, 50% and 100%. It was compared with the positive control (Gentamicin 10ug). The research is experimental and the type of explanatory and cross-sectional study. The samples were fresh leaves of *Muehlenbeckia volcanica* (Benth.) Endl. (mullaca) from the province of Yauyos, Lima. The preparation of the extract was made by the ethanolic maceration method. The phytochemical march determined the presence of metabolites such as alkaloids, amino acids, saponins, tannins, quinones and phenols. The evaluation of growth inhibition of strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 was made in Mueller Hinton agar cultures, according to the procedures manual for the antimicrobial susceptibility test by the disc diffusion method (Kirby-Bauer) of the National Institute of Health (INS) where inhibition zones were determined. In the ethanolic extract of the leaves of *Muehlenbeckia volcanica* (Benth.) Endl. (mullaca) at 25% against strains of *Staphylococcus aureus* an antibacterial activity of 32.98% was observed (it is inactive compared to 10ug gentamicin); in the 50% ethanolic extract an antibacterial activity of 41.02% was observed (it is not very active compared to 10ug gentamicin) and in the 100% ethanolic extract an antibacterial activity of 52.53% was observed (it is moderately active compared to 10ug gentamicin). Therefore the ethanolic extract of the leaves of *Muehlenbeckia volcanica* (Benth.) Endl. (mullaca) 100% against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 has better antibacterial effect.

Keywords: Ethanolic extract, mullaca, antibacterial, gentamicin.

INTRODUCCIÓN

La bacteria "*Staphylococcus aureus*" está involucrada en las infecciones patógenas y dérmicas, la cual es uno de los causantes principales de morbimortalidad; afectando en su mayoría a la población infantil, nos permite conocer la importancia de este microorganismo en la resistencia a antimicrobianos de uso común en el tratamiento de las afecciones respiratorias y de la piel.⁽¹⁾

La existencia de variedades de bacterias patógenas que afectan al ser humano y son a la vez causantes de diferentes enfermedades infecciosas que en la actualidad, son las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo.⁽⁵⁾

Las consecuencias de no acceder a tratamientos completos y confiables en un proceso antibacteriano son diversas, una infección mal tratada puede repercutir afectando el organismo, expandiendo la infección a otras zonas del cuerpo y generando resistencia bacteriana a largo plazo.

Con el transcurso del tiempo las plantas con propiedades terapéuticas naturales favorables han logrado ser una buena alternativa para la prevención y tratamiento de enfermedades.⁽²⁾ Donde los metabolitos activos tienen actividades biológicas muy importantes y de gran aporte en la salud.⁽³⁾ En la actualidad existen muchas investigaciones sobre el uso de las plantas medicinales que contienen principios activos de suma importancia para tratar diversas enfermedades como infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*.⁽⁴⁾

Teniendo en cuenta la problemática existente sobre las infecciones bacterianas se ha propuesto evaluar el efecto antibacteriano de la especie *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) en cepas activas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538. Esta actividad se demuestra mediante el método de disco difusión frente al dicho microorganismo patógeno, tomando como referencia el Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de disco Difusión, utilizando el antibiótico Gentamicina como control (sensible (S) > 15 mm, intermedio (I) 13-14 mm y resistente (R) < 12 mm)⁽⁶⁾ y el protocolo de estudio del Instituto de Medicina tradicional donde clasifica la actividad antimicrobiana por porcentaje de inhibición (Inactivo < 40%, Poco activo 40 – 50%, Moderadamente activo 51 – 75%, Buena actividad > 76%);⁽³⁶⁾ de esta manera se contribuye al

aprovechamiento de nuestra flora siendo una evidencia más para que esta planta pueda ser aprovechada por nuestro país.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la realidad problemática

La Organización Mundial de la Salud (OMS) enfatiza sobre el aumento de resistencia bacteriana a los antibacterianos en todo el planeta a niveles alarmantes, cada día está manifestándose progresivamente en el mundo nuevos mecanismos de resistencia al medicamento que ponen en riesgo la eficacia del fármaco para tratar enfermedades de origen bacteriano como la tuberculosis, septicemia, neumonía o las enfermedades de transmisión alimentaria, son cada vez más complicados y en algunas ocasiones son imposibles de tratar la infección, a medida que los fármacos antibacterianos van perdiendo su efectividad.⁽⁷⁾

Debido a que la susceptibilidad de los microorganismos frente a un agente antimicrobiano puede generar resistencia bacteriana, los métodos microbiológicos deben ser redefinidos para asegurar mayor precisión y una mejor performance de los productos obtenidos destinados a ser utilizados como tratamientos antibacterianos. La ciencia y la medicina están cambiando y evolucionando constantemente, es por ello que los estándares y guías adecuadas se han implementado en conjunto con criterios clínicos, conocimiento y análisis correspondiente para guiar los tratamientos de los pacientes.⁽⁸⁾

Basándose en la medicina tradicional es necesario rescatar las virtudes terapéuticas de algunas plantas y en especial de la *Muehlenbeckia volcánica* (*Benth.*) *Endl.* (mullaca).⁽⁹⁾ El Perú es un país biodiverso, cuenta con una gama de especies nativas con propiedades terapéuticas de una gran significancia para combatir las patologías microbianas, sin embargo estas no han sido investigadas en su totalidad, la mayoría de estas especies están ubicadas en la sierra del país y por años se han utilizado como tratamientos antibacterianos

y antiinflamatorios sin el sustento científico respectivo.⁽¹⁰⁾ Allí donde los antibióticos son mal usados porque se adquiere sin prescripción médica para el uso en personas o animales, la aparición y propagación de la farmacoresistencia va empeorando cada día a niveles alarmantes. En los países que no cuentan con instrucciones terapéuticas normalizadas, el personal de salud tiene tendencia a recomendar y los pacientes a consumir antibióticos en abundancia. Si no se plantean soluciones inmediatas, el mundo está abocado a una “era post-antibióticos” en la que muchas enfermedades de tipo infecciosa y lesiones comunes volverán a ser potencialmente mortíferos.⁽⁷⁾

El problema de la resistencia a los antibióticos es universal, complejo, engloba a muchas bacterias de significancia médica y es difícil el control por su multicausalidad. El consumo masivo de antibióticos en los últimos 50 años ha creado un ambiente beneficioso donde las bacterias resisten la acción de los antimicrobianos; ⁽¹¹⁾ tal es caso de *Staphylococcus aureus* que está involucrada en infecciones de la piel y del tracto respiratorio y son las principales causas de morbilidad infantil. ⁽¹²⁾

En este sentido la presente investigación tiene como propósito demostrar si esta especie tiene efecto antibacteriano para ser utilizado como tratamiento alternativo a los antibióticos prescritos por el médico.

La realidad problemática descrita anteriormente, motiva a encontrar nuevos tratamientos mediante la utilización de las plantas para determinar sus efectos curativos para hacer frente a las infecciones bacterianas que tanto aquejan a la población, y que al no ser tratadas adecuadamente pueden causar complicaciones como riesgos de llegar a la muerte.

1.2. Identificación y formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿El extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) poseerá efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *in vitro*?

1.2.2 Problemas específicos

1. ¿Qué tipos de metabolitos secundarios poseerán el extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca)?
2. ¿El extracto etanólico al 25%, 50% y 100% de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) poseerán efecto antibacteriano en cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *in vitro*?
3. ¿El extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) tendrá mayor efecto antibacteriano frente a la Gentamicina en cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *in vitro*?

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Determinar los tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) que se relacionan con el efecto antibacteriano.

2. Evaluar si la concentración al 25%, 50% y 100% del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) poseen efecto antibacteriano en cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *in vitro*.
3. Comparar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) frente a la Gentamicina en cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *in vitro*.

1.4. Justificación de la investigación

En nuestro país las plantas medicinales fueron usadas desde hace varios siglos debido al poder curativo que presenta, la cual se convirtió en una opción de solución a diversos problemas de salud que afecta a la población. Actualmente el gran reto de nuestro país, que es poseedor de diversas plantas medicinales, es la transformación de conocimientos empíricos a conocimientos científicos por medio de estudios de investigación. Es por ello que tenemos la necesidad de conocer las propiedades medicinales de las plantas y existiendo poca información sobre los efectos antibacterianos que tiene *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) sobre el microorganismo *Staphylococcus aureus* causantes de diferentes enfermedades, una de ellas la enfermedad de infección en tracto respiratorio, se consideró valioso la realización de este estudio de investigación para el beneficio de la población y la comunidad científica.

La presente investigación es importante porque demuestra el efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) en cepas de *Staphylococcus aureus*. Contribuye para el tratamiento natural de diversas afecciones que aqueja a la comunidad, nos da la posibilidad de brindar tratamientos fitoterapéuticos con la finalidad de reducir algunas desventajas de los tratamientos actuales como es el caso de resistencia de la bacteria a fármacos antibacterianos,

reacciones adversas, es por ello, que se está recurriendo a investigaciones de diferentes plantas medicinales. Esta investigación nos permite disponer de alternativas para el tratamiento de infecciones y aportar al conocimiento científico.

El presente estudio se justifica de forma teórica y experimental, ya que la discusión de resultados da un gran aporte en la información existente sobre los efectos terapéuticos de la planta mencionada. Así mismo se realiza una comparación de efecto en diferentes concentraciones de extracto para justificar el efecto frente al antibiótico Gentamicina.

1.5. Limitaciones de la investigación

- El investigador sólo tuvo acceso al laboratorio en los horarios establecidos según la política de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.
- La investigación se limitó a la realización de un estudio experimental in-vitro, no se utilizaron animales de experimentación.
- El desarrollo del proceso microbiológico se llevó a cabo en los Laboratorios de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, previa coordinación con el área encargada.

CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

2.1.1. Nacionales

Gómez S; et al. (2016). Realizaron un trabajo titulado: “Evaluación de la actividad anti-*Staphylococcus aureus* del extracto alcohólico de hojas de *Anacardium occidentale linn.* “Casho” mediante el método de Difusión en disco (Kirby-Bauer)”. El objetivo fue determinar la actividad antimicrobiana in vitro utilizando el método de Difusión en disco, que determina la formación de halos de inhibición alrededor de los discos de pruebas. Utilizaron un control positivo (Gentamicina 10ug), el cual adquirió un promedio de diámetro de la zona de inhibición (DZI) de 17.5 mm, hallándose como producto sensible según parámetros del método de Kirby – Bauer (>15 mm = Sensible). El extracto etanólico obtenido se evaluó en tres concentraciones de 75, 150 y 300 mg/ml. Llegando a encontrar DZI de 6.0mm; 6.7mm; 8.0 mm. En cada uno de ellos, obteniéndose por lo tanto un rendimiento resistente en las tres evaluaciones, por ubicarse en la zona inferior de la escala de comparación según el control positivo. ⁽¹³⁾

Arauco k. (2016). Realizó un estudio en el cual tuvo como objetivo evaluar el efecto antiinflamatorio y analgésico del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica (Benth) endlicher* (mullaca). Evaluó la presencia de metabolitos secundarios del extracto alcohólico de la planta mencionada mediante la marcha fitoquímica. Se demostró la presencia de taninos, quinonas, compuestos fenólicos, grupos aminos libres, flavonoides, terpenos y/o esteroides. La actividad antiinflamatoria se evaluó *in vivo* empleando el método de granuloma según Sedwicks, inducido por carragenina y en sangre, fue evaluado por histopatología. Trabajaron con cuatro concentraciones 50 mg/kg, 250 mg/kg, 750 mg/kg y 2,000 mg/kg llegando a

obtener resultados sin efectos tóxicos y adversos al ser comparados con el control, concluye que se ha evidenciado que el extracto etanólico si posee efecto antiinflamatorio y analgésico en ratas y no presenta efectos tóxicos en ratones. ⁽¹⁴⁾

Saldaña D; et al. (2016). Realizaron una investigación titulada: “Evaluación fitoquímica y actividad antibacteriana *in vitro* de *Clidemia hirta* L don “Mullaca morada” por el método de Disco difusión, frente a microorganismos patógenos”. Menciona que para la evaluación de la presencia de metabolitos secundarios utilizo el método modificado de Schabra y Cols donde encontraron los siguientes metabolitos: Flavonoides en forma abundante, agrupamientos lactónicos, carotenos, triterpenos, esteroides, compuestos reductores, aceites esenciales, Fenoles y saponinas. La actividad antimicrobiana fue evaluada usando el método de disco difusión, en tres microorganismos: Para *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 19 y 12 mg/ml se encontró porcentajes de inhibición de 66.67% y 58.33%; respectivamente donde se evidencia como resultado moderada actividad. Para *Escherichia coli* a concentraciones de 19, 12 y 6 mg/ml se encontró porcentajes de inhibición de 85.19%, 74.07% y 62.96%; respectivamente encontrándose para la primera buena actividad y los dos restantes moderada actividad. Para *Pseudomonas aeruginosa*, no presentó inhibición, siendo considerado inactivo. Concluye que presenta ligera actividad antimicrobiana para *S. aureus* y *E. coli* a concentraciones de 12 y 19mg/ml. ⁽¹⁵⁾

2.1.2. Internacionales

Lozada M. (2016). Realizó un trabajo titulado: “Estudio fitoquímico y evaluación de actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Streptococcus mutans* ATCC: 25175, *Streptococcus pneumoniae* ATCC: 49619, *Streptococcus pyogenes* ATCC: 19615 de extractos apolares (Cloroformo –Hexano) de *Croton elegans* Kunth (Mosquera)”. En su investigación utilizó extractos clorofórmicos y hexánicos de las hojas de *Croton elegans* Kunth (Mosquera), obtenidos por método Soxhlet en

concentraciones de 25% y 50 %. La identificación se realizó de forma cualitativa de los grupos fitoquímicos presentes, encontrándose la presencia de metabolitos secundarios: resinas, aminoácidos, quinonas, alcaloides, flavonoides y catequinas. La actividad antimicrobiana se evaluó por el método de Difusión en agar (Kirby –Bauer) y el método en dilución en medio líquido, sin evidenciar resultados de inhibición en ninguna de las concentraciones sobre los patógenos probados, por lo cual la investigación concluye aceptando la hipótesis nula, no se evidencia actividad antimicrobiana de los extractos sobre los microorganismos de estudio. ⁽¹⁶⁾

Flores G. (2017). En el trabajo titulado: “Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de *Pleurotus ostreatus* ante cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.”. Realizó un extracto alcohólico mediante proceso de maceración, luego fue evaluado realizando el tamizaje fitoquímico. Utilizó el extracto en tres concentraciones: 30, 70 y 100%, para la evaluación antimicrobiana por el método de Difusión en discos sobre dos bacterias: *Escherichia coli* (American Type Culture Collection ATCC 9637) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). La actividad del extracto fue comparada con sus controles positivos: Ampicilina (10 µg.) y Amikacina (30 µg.). Se trabajó bajo un estándar de 0,5 Mc Farland y las placas inoculadas se incubaron a 35° por 18 a 24 horas. La actividad antimicrobiana se determinó por la presencia o ausencia de halos de inhibición y la potencia del extracto se estimó midiendo diámetros de halos. El extracto del hongo a una concentración del 100% presentó un halo superior con respecto a las otras. El *Staphylococcus aureus* con respecto a la *Escherichia coli* mostró también un halo de inhibición más grande. El autor concluyó que mediante la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de *Pleurotus ostreatus* observó que no presenta un halo de diámetro que justifique dicha actividad y a la vez que el diámetro del halo es muy debajo del mínimo comparado con el rango presente en bibliografía. ⁽¹⁷⁾

Tello P. et al. (2015). Realizaron una investigación titulada: “Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de la hoja, tallo y raíz de *Petiveria alliacea* L. sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*”. El autor utilizó el método de maceración y concentración en rotavapor en la cual utilizó como disolvente una mezcla hidroalcohólica etanol: agua (50:50) y (70:30); las partes de la planta utilizadas fueron las hojas, raíz y tallo. A los extractos obtenidos se realizó un tamizaje fitoquímico para determinar en forma cualitativa los principales metabolitos secundarios presentes en cada uno de ellos. Para la evaluación de la actividad antimicrobiana utilizó una adaptación del método Kirby-Bauer. Los resultados obtenidos de los seis extractos preparados presentaron actividad antimicótica frente a *Candida albicans* y carecen de actividad antibacteriana. ⁽¹⁸⁾

Sisalema D. (2013). Investigó: “Separación de metabolitos secundarios de *Martin Galvis (Senna multijuga)* con actividad antibacteriana”. El estudio tiene como objetivo extraer, purificar e identificar los metabolitos secundarios en el extracto etanólico y sub extractos. El tamizaje fitoquímico realizado a (*Senna multijuga*) indica presencia de triterpenos, monoterpenos, lactonas, cumarinas, antraquinonas, esteroides, sesquiterpeno y flavonoides. Para la separación de estos metabolitos se utilizó métodos cromatográficos como: cromatografía en columna, microcolumna y para la purificación placa preparativa realizando corte de bandas para posteriormente concentrar y comprobar en cromatografía en capa fina corrido en sistemas de solventes el más apropiado en el que pueda evidenciar los 3 parámetros cromatográficos: eficacia, eficiencia y resolución posteriormente determinar en el espectrofotómetro ultravioleta. ⁽¹⁹⁾

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Descripción general de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca)

Árbol silvestre de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) es una especie de género *Muehlenbeckia*, llega a expandirse en la región sierra del Perú principalmente en los departamentos de Ancash, Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huánuco, Junín, Lima, La Libertad y Puno. Se encuentra distribuido en lugares de clima templado, terrenos secos, piedras volcánicas y rocas, crece en elevaciones entre 1500 a 4500 msnm. ^(20, 21)

Su denominación taxonómica “*volcánica*” proviene al hecho de crecer entre las rocas eruptivas, solo se recolecta en época de lluvias durante el florecimiento y es casi escasa en época seca. Esta especie es muy requerida por sus propiedades medicinales y tintoreras. ^(20, 22)

2.2.2. Características

Es una hierba anual, sub-arbusto rastrero, que forman matas que cubren grandes extensiones, las ramas alcanzan a medir 30cm de longitud, sus hojas carnosas-coriácea, mayormente rómbico elípticas de 7-14 mm de longitud uniformemente alternas enteras y simples. Las flores son pequeñas hermafroditas que están en forma de racimo con pétalos polimórficos pentámeras de color verde amarillenta o cremoso, fruto aquenio, aplanado de color negruzco azulado más o menos carnosos. ⁽²¹⁾

2.2.3. Clasificación Taxonómica

Fue realizado en el Museo de Historia Natural del Perú (ver anexo N° 2)

Clase: Dicotiledóneas

División: Fanerógamas

Subclase: Angiospermas

Género: Muehlenbeckia

Orden: Poligonales

Familia: Poligonáceas

Especie: *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl.

2.2.4. Propiedades curativas

Es utilizada con buenos resultados en procesos gripales, rinofaringitis, bronquitis, asma bronquial, aftas bucales y como antiséptico. Sus principios activos producen en el organismo una gran reacción calórica y que esto es aprovechado por su función antialérgica y descongestionante. Su sabor no tan fuerte, permite que sea utilizada en niños. ^(23, 21)

Es usado para la fiebre para la cual las raíces se hacen hervir para bañarse, curar las aftas donde las raíces son hervidas y se toma como mate son consumidas cada cuatro horas, el dolor de dientes para ello las hojas son masticadas, enfermedad de los riñones para lo cual las raíces son hervidas y se toma como refresco, diarrea donde se toma el jugo obtenido a partir de las hojas, tos de calor para ello las raíces son hervidas y son consumidas como mate de refresco, las ramas reposadas son usadas para inflamaciones internas y se toma el mate tres veces al día. ⁽²⁴⁾

2.2.5. Metabolitos secundarios.

Los metabolitos secundarios son todas aquellas moléculas activas que son generadas por diversas especies vegetales, cada planta en sus diferentes órganos (raíz, tallo, hoja, flor) poseen diferentes tipos de componentes químicos con acción farmacológica y cosmética. ⁽²⁶⁾

2.2.6. Tipos de metabolitos secundarios básicos

Los metabolitos secundarios se clasifican de acuerdo a sus grupos funcionales, los cuales son: alcaloides, terpenoides y/o esteroides y compuestos fenólicos. ⁽²⁶⁾

a. Alcaloides.

Son compuestos nitrogenados que contienen uno o más átomos de nitrógeno como parte del sistema cíclico que manifiestan su actividad farmacológica. Aproximadamente el 80% del reino vegetal no contiene alcaloides esto hace sospechar que estos metabolitos no son vitales para los organismos vivos. Sin embargo, desde hace años, es conocida la acción farmacológica, por ejemplo: La berberina es antibacteriana y antiinflamatoria, carpaina es antibacteriana, emetina es emético, antihelmíntico y expectorante, estriquina y cafeína son estimulantes, cocaína es sedante y anestésico para aplicación tópica. ⁽²⁷⁾

b. Terpenoides y esteroides.

Los compuestos esteroidales pueden impedir determinada transformación de síntesis vital en la célula bacteriana. Los terpenos, su clasificación determina el número de isoprenos, monoterpenos (2 isoprenos) pueden llegar a tener hasta 8 isoprenos. Los iridoides pertenecen a los monoterpenos. Se caracteriza por su sabor amargo y han manifestado poseer una gran variedad de acciones biológicas y farmacológicas entre las que más destacan es la actividad hepatoprotectora, colerética, antimicrobiana, antiviral, antitumoral y antiinflamatoria. ⁽²⁸⁾

c. Compuestos fenólicos.

Son un grupo de sustancias que tienen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos, estos compuestos son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua. ⁽²⁷⁾

- **Flavonoides:** Están ampliamente distribuidos en constituyentes naturales y son uno de los grupos más numerosos. Estos compuestos poseen acciones farmacológicas muy variadas entre ellas tenemos, actividad antimicrobiana de los flavonoides prenilados, antivíricos, acción fungitóxica de isoflavonas, la actividad espasmolítica de los glicósidos de la epigenina, antihepatotóxica de los flavanolignanos conocidos como la silimarina, actividad estrogénica de isoflavonas, el uso de rotenona como insecticida.^(26, 27)
- **Quinonas:** Son anillos aromáticos con dos funciones ceto. Estos metabolitos se encuentran en la corteza, la raíz y en algunos casos en las hojas están ampliamente distribuidos. Las quinonas han sido distinguidos desde la antigüedad por sus propiedades tintoreras, sin embargo, una gran cantidad de ellas están asociadas a la actividad antibacteriana, antimalarica, antifúngica y antitumoral, etc.⁽²⁷⁾
- **Taninos:** Son sustancias polifenólicos de origen vegetal, solubles en alcohol, agua, acetona y glicerina, su carácter hidrosoluble permite que sea de fácil extracción. Esta sustancia tiene dos propiedades principales: su capacidad de curtir la piel y su poder astringente, sus acciones farmacológicas están relacionadas con su propiedad, entre ellas tenemos: Bactericida y bacteriostático, antifúngico, antidiarreico, cicatrizante, antioxidante, analgésico, hipocolesterolemia, antihemorrágico.⁽²⁶⁾
- **Saponinas:** Son heterósidos (azúcar + aglicón) se caracteriza por su capacidad de producir espuma cuando se agita una solución acuosa, es componente de varios extractos de las plantas con acciones farmacológicas de: antimicrobiano, antivírico, antimicótico, antihemorroidal, estimulante, antiestres, antiinflamatorio, diurético, expectorante.⁽²⁶⁾

2.2.7. Métodos de extracción.

Es un proceso extractivo para aislar los principios activos directamente a partir de la droga. Las técnicas más utilizadas y reconocidas en el área de fitoquímica son la extracción por maceración y la percolación o lixiviación. ⁽²⁶⁾

- **Maceración:** Es una técnica que consiste en contacto prolongado por un tiempo determinado de la droga con el solvente, que consta en poner la droga seca (hojas, flores y tallos) triturada con el disolvente, manteniendo en agitación constante durante 2-14 días. La mezcla es decantada para obtener un extracto líquido con los principios activos. ⁽²⁶⁾
- **Percolación:** Es un método conocido también como lixiviación, consiste en colocar la droga en una columna o recipiente cónico para luego ser agregado el disolvente que atraviesa toda la zona donde se encuentra el material a extraer, en la parte inferior es recogido el extracto que contiene los principios activos extraídos. ⁽²⁶⁾

2.2.8. Concentración de extractos.

La mayoría de los casos se concentran eliminando parcial o totalmente los disolventes, se trabaja a presión reducida y temperatura generalmente no mayor a 40°C, el rota vapor se utiliza como una alternativa, para realizar este tipo de trabajo en el laboratorio. ⁽²⁶⁾

2.2.9. Tamizaje fitoquímico.

Se desarrollaron una serie de métodos para determinar cualitativamente diferentes grupos químicos en las plantas, los cuales se basan en la extracción y posterior aislamiento de los grupos de mayor interés. Esta técnica consiste en utilizar un solvente apropiado para poder extraer los metabolitos de las plantas para su posterior aplicación en reacciones de coloración y precipitación, nos permite una evaluación rápida y de bajo costo.

2.2.10. Generalidades de la bacteria

Staphylococcus aureus.

Son cocos Gram positivos que pertenecen a la familia de *Staphylococaceae*, se desarrolla en cadenas forma de racimo de uvas, la mayor parte oscila entre 0,5 y 1,5 micras de diámetro, son inmóviles y capaces de progresar en una variedad de condiciones aeróbica y anaeróbica en presencia de una alta concentración de sal y temperaturas que varían de 18-40°C. Estos microorganismos se encuentran en la piel y mucosas del ser humano. Originan una gran variedad de enfermedades que pueden poner en riesgo a la vida, como son las infecciones de la piel, en los tejidos blandos, los huesos y el aparato genitourinario. Pueden presentar resistencia a múltiples antibióticos en especial a los b-lactámicos y las penicilinas semisintéticas, en la actualidad menos del 10% de las bacterias son sensibles a estos antibióticos y estas cepas SARM son también resistentes a los antibióticos b-lactámicos. En los últimos años se ha elevado la tasa de morbilidad y mortalidad a pesar del gran número de antimicrobianos disponibles. ⁽²⁹⁾

Conforma parte de la piel y la flora normal de las mucosas y participa en diversas enfermedades como son las infecciones e intoxicaciones alimenticias. Este microorganismo *S. Aureus* produce más de 95% de proteína A, la cual puede estar asociada al medio extracelular o la célula misma, la presencia de coagulasa o la proteína A es de gran importancia clínica para poder distinguir de las otras especies de *Estafilococos*. *S. Aureus* es un microbio que puede ocasionar infecciones en todos los grupos de edad en forma epidémica y esporádica, se determinó como una de las principales causantes de las infecciones a afectan a las heridas. ⁽³⁰⁾

2.2.11. Antimicrobianos.

Para la Organización Mundial de la Salud (OMS), el uso razonable de los antibióticos radica en garantizar que las personas que reciban el tratamiento sea adecuado para sus necesidades en la dosificación personal requerida, por un tiempo apropiado y al costo más accesible para cada uno de ellos y su comunidad.⁽³¹⁾ El uso racional de estos antimicrobianos puede salvar gran cantidad de personas, al realizarlo de un modo irrazonable no solo encarece los servicios de salud, sino que se expone a la aparición con más frecuencia de los efectos secundarios, como la interacción entre fármacos y la probabilidad de aparición de bacterias resistentes a los medicamentos.

Los antibióticos son los que conforman parte del grupo de los fármacos más habitualmente recomendados en el mundo. En países en vías de crecimiento el consumo de los antibióticos han conducido a un incremento desproporcionado en el uso inadecuado de estos medicamentos.⁽³²⁾ Investigaciones recientes evidencian que el personal de salud comúnmente prescribe medicamentos antibacterianos en exceso, ya sea por petición del paciente, por no contar con el tiempo necesario para analizar con los pacientes sobre si son necesarias el uso de estos fármacos en ciertas circunstancias o por prevención a cerca de la sensación de su diagnóstico.⁽³³⁾

Son fármacos anti-infecciosos, ejercen su acción sobre células distintas de las del paciente, con las que se pretende eliminar el organismo infectante sin dañar las células infectadas. Las diferencias biológicas que presentan estas dos células nos permiten que sea posible la farmacología anti-infecciosa.⁽³⁴⁾

Los fármacos antimicrobianos producen dos tipos de efectos: a) bactericidas. Son los que provocan la muerte de las células que interfieren en la infección, entre ellos tenemos: B-lactámicos, aminoglucosidos, rifampicina, vancomicina, polimixina, formacina, quinolonas y nitrofurantoinas. B) bacteriostáticos. Son los medicamentos que inhiben el crecimiento y replicación, una vez interrumpido el tratamiento el microorganismo puede reponerse y volver a multiplicarse, pertenecen a este

grupo: macrolidos, lincosamidas, tetraciclinas, cloranfenicol, sulfamidas y trimetoprima. ⁽³⁴⁾

El mecanismo de acción de los antimicrobianos que alteran la biología de los microorganismos se da por los siguientes procesos: inhibición de la pared celular en fases diversas; alteración de la membrana citoplasmática, lo que conduce a cambios de la permeabilidad y la lisis celular; inhibición de la síntesis de proteínas, por actuar sobre ribosomas, en la iniciación (subunidad 30 S), en la elongación (subunidad 50 S); interferencia de la síntesis y/o metabolismo de los ácidos nucleicos, ARN-polimerasa dependiente de ADN y ADN-girasa; antimetabolitos que bloquean la síntesis de ácido fólico. ⁽³⁴⁾

2.3. Formulación de Hipótesis

2.3.1. Hipótesis general

El extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) posee efecto antibacteriano en cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *in vitro*.

2.3.2. Hipótesis específicas

1. Existen algunos tipos de metabolitos secundarios en el extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) relacionados con el efecto antibacteriano.
2. El extracto etanólico al 25%, 50% y 100% de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) poseen efecto antibacteriano en cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *in vitro*.
3. El extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) tiene mayor efecto antibacteriano frente a la Gentamicina en cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *in vitro*.

2.4. Tabla de operacionalización de variables

Tabla N° 1: Operacionalización de variables e indicadores

Variable	Dimensión	Indicador	Escala
VI Extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. (mullaca)	Análisis Fitoquímico	Identificación de metabolitos secundarios. Concentración del extracto.	Diferentes concentraciones: 100%, 50% y 25%
VD Efecto antibacteriano en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>in vitro</i> .	Estudio microbiológico	Diámetros de halos de inhibición (mm)	Observación de unidad formadora de colonia. Medida de los halos de inhibición en mm.

2.5. Definición de términos básicos

1. **UFC:** Una unidad formadora de colonia se asume que se forma a partir de una bacteria. ⁽³⁸⁾
2. **Cepas ATCC:** Material biológico de referencia certificado por American Type Culture Collection. ⁽³⁹⁾
3. **Antibiograma:** Perfil de sensibilidad de un bacilo a un grupo de agentes antibacterianos. ⁽³⁸⁾
4. **Sensible:** Significa que una infección causada por una bacteria es inhibida por una concentración del agente antibacteriano que esta pueda ser tratada de manera apropiada. ⁽³⁸⁾
5. **Intermedio:** Significa que las cepas microbianas que pueden ser inhibidas por concentraciones de los antimicrobianos superiores a las obtenidas con las dosificaciones normales, siempre y cuando se puedan incrementar las dosis empleadas y/o que el antimicrobiano se concentre fisiológicamente en el tejido o lugar infectado. ⁽⁶⁾

6. **Resistente:** Significa que una bacteria no es inhibida por una concentración del agente antibacteriano que puede alcanzar en un fluido del cuerpo luego de una dosis estándar terapéutica. ⁽³⁸⁾
7. **Antimicrobiano:** Cualquier sustancia natural, semi-sintética o de origen sintético que inhibe el metabolismo y/o el crecimiento de una bacteria y puede matarlo. ⁽³⁸⁾
8. **Estándar de McFarland:** El Estándar 0,5 de Mc Farland corresponde alrededor de $1,5 \times 10^8$ CFU/mL. Es utilizado cuando se ajustan suspensiones del inóculo para pruebas de susceptibilidad. ⁽³⁸⁾
9. **Extracto etanólico:** Es una sustancia adquirida por medio de una extracción de una fracción de una materia prima, utilizando un disolvente como etanol.
10. **Taxonomía:** Es una ciencia que estudia los principios, métodos y clasificación científica; que son aplicables en la biología para poder ordenar jerárquicamente y sistemáticamente el reino vegetal y animal.
11. **Drogas Vegetales:** Son aquellas partes de una planta medicinal que posee en una mayor cantidad o una cantidad mínima de principios activos que se pueden extraer.
12. **Microorganismos:** Ser vivo microscópico que presenta una organización biológica elemental.
13. **Cepa:** Se distingue por ser característica de un organismo en particular que mantiene sus propiedades bioquímicas y macroscópicas homogéneas y únicas
14. **Halo de inhibición:** Zona alrededor de un disco que contiene el extracto antibiótico colocado en un antibiograma en el cual no se produce el crecimiento bacteriano. ⁽⁴⁰⁾
15. **Medios de cultivo:** Son nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares. ⁽⁴⁰⁾
16. ***Staphylococcus aureus*:** Es un agente etiológico de diversas patologías incluyendo infecciones de piel y tejido blando. ⁽²⁹⁾

CAPITULO III METODOLOGÍA

3.1. Tipo y diseño de investigación

3.1.1 Tipo de la investigación

- **Por su alcance es de tipo**

Descriptiva: Se mide y recoge información de manera independiente de las variables.

- **Por su finalidad es de tipo**

Básica: Este estudio busca más el conocimiento para poder así ser aplicadas en otras investigaciones.

- **Por su ubicación temporal es de tipo**

Transversal: Debido a que el investigador solo evaluó una única vez el efecto antibacteriano sobre las placas inoculadas de la bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

3.1.2 Diseño de la investigación

Es un diseño experimental donde se manipulan deliberadamente una o más variables, vinculadas a las causas de forma aleatoria, para medir el efecto que tienen en otra variable de interés y las pruebas controladas para entender los procesos causales después del estadístico. Así mismo se tuvo un grupo control y uno experimental, los mismos que se midieron a través de pruebas de pre-test y pos-test y fichas de observación para el registro de los hallazgos.

3.2. Población y muestra de la investigación

3.2.1. Población

- 10 sub-arbustos de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) en 10m² del distrito de Laraos en la provincia de Yauyos-Lima.
- Cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

3.2.2. Muestra

- 1 kg de hojas frescas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca).
- 10 placas Petri con *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (Gram +); del Laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.3.1 Técnicas.

- La obtención del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (Mullaca) se realizó mediante el método de maceración, donde el uso del solvente depende del tipo de planta a emplear y de principios activos de la planta por extraer.
- La identificación de metabolitos secundarios se realizó mediante la marcha fitoquímica, donde fue utilizado diferentes reactivos que al entrar en contacto con la muestra genera una reacción y es evaluado por la presencia o ausencia de coloración y precipitado de cada metabolito presente en la muestra. ⁽³⁵⁾
- La actividad antibacteriana se realizó utilizando el método de Difusión en disco (Kirby-Bauer). La cual tuvo como objetivo evaluar la eficacia de una muestra vegetal con propiedades antibacterianas frente a un determinado microorganismo, donde se realizó la medición en mm de los halos de inhibición de las muestras y los controles respectivos.

3.3.2 Instrumentos.

- **Ficha de recolección de datos**

La ficha de recolección de datos de la solubilidad, marcha fitoquímica y el análisis microbiológico se realizó en base a los indicadores con sus respectivos criterios, dicho juicios de expertos tuvieron una mínima y máxima calificación (Ver anexos 3, 5 y 7). Fue elaborado por los autores con el propósito de recolectar los datos para la prueba en estudio y su validación se realizó a través de la técnica del juicio de expertos. Los expertos fueron tres Químicos Farmacéuticos, especialistas y con amplia experiencia en la investigación.

Tabla N° 2: Resumen de Resultados de Juicio de expertos

Juez experto	Resultados	Condición
Dra. Q.F Maritza Ruiz Sánchez	50	Válido aplicar
Mg Q.F Pedro Jacinto Hervias	50	Válido aplicar
Mg Q.F Carlos Cano Pérez	50	Válido aplicar

Dicha revisión dio como resultado que el instrumento es considerado válido y aplicable presentándose concordancia entre los tres expertos.

El proceso permitió al investigador recolectar todos los datos necesarios para relacionar las dos variables de estudio teniendo en cuenta que a la planta en estudio se le realizaron una serie de pruebas e identificación para lograr la preparación del extracto y posteriormente realizar el tratamiento microbiológico en las placas Petri. Los resultados obtenidos de la medición del efecto antibacteriano fueron realizados en el laboratorio de microbiología de la facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Mayor de San Marcos, dichos resultados fueron recopilados en respectivos informes de ensayo para ser evaluados estadísticamente.

3.4. Actividad antimicrobiana del extracto.

3.4.1. Fórmula para determinar el porcentaje de inhibición

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

3.4.2. Clasificación de la actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición.

Tabla N° 3: Actividad antimicrobiana según el porcentaje de inhibición.

Actividad antimicrobiana	Porcentaje de inhibición
Inactivo	<40%
Poco activo	40-50%
Moderado activo	51-75%
Buena actividad	>76%

Fuente: Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana. (IMET)-EsSalud. 2007

3.5. Materiales, equipos y reactivos

3.5.1 Materiales:

- Tubos de ensayo de 13x100mm, 16x100mm y 20x100mm.
- Frascos de vidrio 100 mL, 250mL y 500mL de capacidad.
- Pipetas Pasteur.
- Pipetas graduadas de expulsión total, de capacidades nominales de 1ml, 5 ml, 10 ml y 25 ml, graduadas en divisiones de 0.01 ml, 0.1 ml, 0.25 ml respectivamente.
- Micropipetas graduadas de expulsión total, de capacidades nominales de 100 µL y 1000 µL.
- Puntas de Micropipetas.
- pH metro capaz de medir 0.01 unidades de pH a 25°C, que permita que las medidas realizadas, tengan una precisión de ± 0.1 unidades de pH.

- Balanza con capacidad de 2000g y sensibilidad de 0.1g.
- 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 μ L y 0.5-5mL
- Micropipetas calibradas de 20-200 μ L y 0.5-5mL
- Discos vacíos para difusión en placa
- Frascos de vidrio de 500mL de capacidad con tapa rosca

3.5.2 Equipos:

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

3.5.3 Reactivos:

- Reactivo de Dragendorff
- Ácido sulfúrico al 10%
- Reactivo de Baljet
- Limaduras de magnesio
- Ácido clorhídrico 37%
- Hidróxido de sodio 40%
- Ácido nítrico concentrado
- Reactivo de Kedde
- Reactivo de Lieberman Burchard

- Cloruro Férrico
- Hidróxido de amonio
- Fehling A
- Fehling B
- Agua destilada
- Agar nutritivo (Agar Mueller Hinton marca Scharlau)
- Suero fisiológico estéril (NaCl 0.9%)
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- Etanol 96°

3.6. Procedimiento experimental

3.6.1. Recolección de la muestra vegetal

La recolección de la planta *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) se realizó en el distrito de Laraos provincia de Yauyos-Lima a 3857 m.s.n.m. en el mes de diciembre del 2017. La planta fue transportada teniendo en consideración las Buenas prácticas de transporte para su conservación hasta el laboratorio de Físicoquímico de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Mayor de San Marcos

3.6.2. Preparación del extracto etanólico.

Se lavaron 1 kg de Hojas de la planta a chorro de agua corriente para eliminar la suciedad y se seleccionaron las hojas que se encuentran en un estado apropiado de la planta. Las hojas que presentaron mal estado fueron eliminadas.

Las hojas seleccionadas fueron secadas a temperatura ambiente con una buena ventilación, bajo sombra por un espacio de 15 días, luego pasaron a una estufa a 40°C, durante 48 horas.

Las muestras fueron molidas en un mortero reduciendo su tamaño en fragmentos pequeños y se colocó en un Beaker de 500 mL. Se pesaron 85 gramos de muestra para luego colocarlos en un frasco de vidrio de color ámbar de capacidad de 1 L, se procedió a macerar con una cantidad de 300 mL de alcohol etílico de 96°, se agitó hasta que la solución cubra toda la

muestra. Se tapó el envase y se dejó macerar durante 2 semanas, agitando todos los días.

Al final de la maceración se agitó la muestra y se procedió a filtrar separando la masa sólida del líquido, se decantó la muestra por 20 minutos y se filtró por segunda vez usando papel filtro. Posteriormente la muestra filtrada se dejó evaporar en la estufa a menos de 40°C.

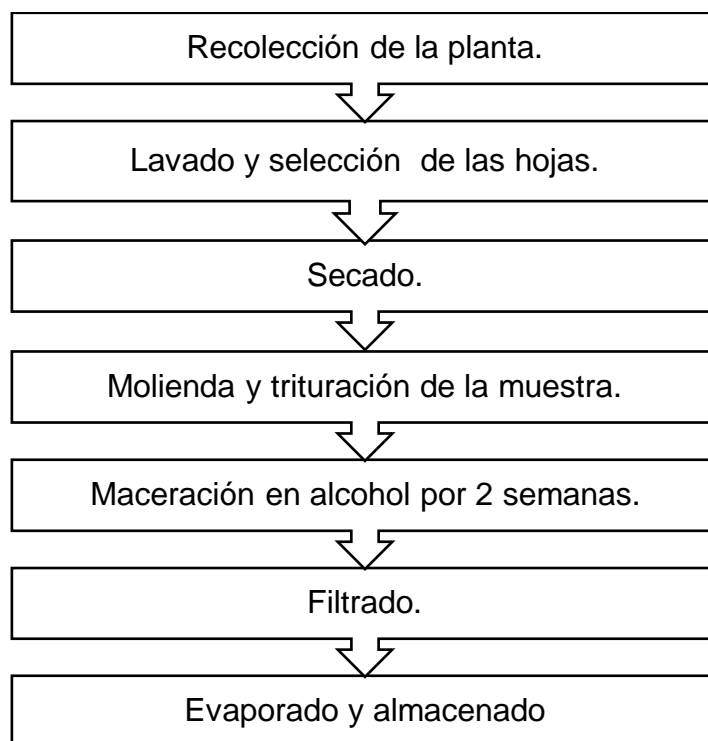


Figura N° 1: Cronograma del proceso de preparación del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica (Benth.) Endl.* (mullaca).

3.6.3. Prueba de solubilidad del extracto etanólico

Para el análisis de solubilidad del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica (Benth.) Endl.* (mullaca), se utilizaron solventes de variada polaridad. De esa manera conocer en que solvente se pueden analizar los metabolitos. Se realizó en acetato de etilo, ciclohexano, metanol, butanol, éter de petróleo, etanol y agua destilada.

3.6.4. Marcha fitoquímica: Identificación de metabolitos

Para la identificación de los metabolitos del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) se hizo la marcha fitoquímica. Dicho proceso tuvo como objetivo reconocer a través de cambio de coloración y precipitado, que es generada al tener contacto el reactivo con la muestra.

- **Identificación de Antocianinas:** En un tubo de ensayo se adiciona 2 mL del filtrado y se añade 6 gotas de ácido mineral diluido H₂SO₄ al 10%. Se considera positivo ante presencia de coloración rojo a anaranjado.
- **Identificación de Lactonas:** Prueba de Baljet: Se toma 2 mL del extracto y se adiciona 3-4 gotas del reactivo. Se considera positivo ante presencia de coloración anaranjada o roja oscura.
- **Identificación de Alcaloides:** En 2 mL del extracto se adiciona 2 mL del reactivo de Dragendorff. Se considera positivo ante presencia de precipitado anaranjado-marrón
- **Identificación de Cardenolidos:** En 2 mL del extracto se adiciona 1-2 gotas del reactivo de Kedde. Se considera positivo si da un color azul o violeta que desaparece en 1-2 horas
- **Identificación de Esteroles:** Se toma 2 mL del extracto y se realiza la prueba de Liebermann-Burchard. Se considera positivo ante presencia de color azul, verde, rojo, anaranjado.
- **Identificación de Saponinas:** Se agrega en un tubo de ensayo 2 mL del extracto y 2 mL agua caliente (40 °C), se deja reposar durante 15 a 30 minutos y luego se agita manualmente durante 1 a 2 minutos. La formación de espuma con apariencia de panal de abeja se considera positiva.
- **Identificación de Triterpenos:** Prueba de Liebermann-Burchard: Se toma 2 mL del extracto se le agrega 1 mL de cloroformo resbalando por las paredes, 1 mL de anhídrido acético y se deja reposar en frío. La aparición de colores rojo, rosa, verde, púrpura o azul en la interfase

cuando se añade 1 o 2 gotas de ácido sulfúrico concentrado se considera positiva

- **Identificación de Taninos:** Se toman alícuotas de 2 mL del extracto y se agrega 3-4 gotas de cloruro férrico. Se considera positiva la aparición de un precipitado color azul oscuro.
- **Identificación de Quinonas:** Reacción de Bornträger: Se tomó 2 mL del extracto en un tubo de ensayo se hirvió por 10 minutos con Hidroxido de potasio al 2-5%. Se enfrió la solución, se acidulo y se extrajo con benceno. La capa orgánica se decoloro y la fase alcalina se puso roja, lo cual indico positivo para quinonas. La fase alcalina quedo amarillenta con una fluorescencia verde, para que enrojezca se le añadió un poco de peróxido de hidrogeno al 5%, lo cual indica positivo para derivados de antronas.
- **Identificación de Fenoles:** Se toma 2 mL del extracto y se agregó 3-4 gotas de cloruro férrico. Se considera positiva la aparición de un color azul oscuro o verde oscuro.
- **Identificación de Azúcares reductores:** Se toman alícuotas de 2 mL del extracto en un tubo de ensayo, luego se adiciona 1 mL de FehlingA y Fehling B, se calienta a fuego directo y constante. Se considera positiva la aparición de un precipitado rojo.
- **Identificación de Flavonoides:** Ensayo de Shinoda: Se toma 2 mL del filtrado etanólico en un tubo de ensayo, se agrega varias limaduras de magnesio y por la pared del tubo se deja caer lentamente HCl concentrado (37%). La aparición de colores: naranja y rojo, indica la presencia de flavonoides en el material vegetal.
- **Identificación de Aminoácidos:** Ensayo xantoproteico: Se agrega a un tubo 2 mL de extracto y 2 mL de ácido nítrico concentrado. Calentar en baño de agua a ebullición. Se deja enfriar y se agrega 1.5 mL de NaOH 40%. Si da una coloración amarilla al agregar el ácido concentrado y luego da un color anaranjado con la adición del hidróxido, se considera como positivo.

3.6.5. Procedimiento del Análisis Microbiológico

3.6.5.1 Tratamiento de la muestra

El extracto etanólico se trabajó a 3 concentraciones: 100%, 50% y 25%. Para realizar las diluciones a partir del extracto se usó etanol 96° y dichas diluciones se realizaron de la siguiente forma:

- ❖ 100%: se colocó 5mL del extracto en un vial.
- ❖ 50%: se colocó 2.5mL del extracto en un vial y se completó con 2.5mL de etanol
- ❖ 25%: se colocó 1.25mL del extracto en un vial y se completó con 3.75mL de etanol.

Se utilizó discos vacíos para difusión en placa, los cuales se embebieron con las distintas diluciones de la muestra a analizar, para cada dilución se usó seis discos. La cantidad de muestra agregada a los discos fue de 100µL.

También se agregó control positivo (Gentamicina 10ug) y el diluyente (alcohol etílico 96°) en los respectivos discos como control negativo, la cantidad de diluyente agregada también fue de 100 µL.

3.6.5.2 Preparación del Agar Mueller Hinton:

El agar Mueller - Hinton fue preparado con agua destilada de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se autoclavó el agar a 121°C y 15 lb/pg² durante 15 minutos. Inmediatamente después se dejó enfriar en Baño María a 45 - 50°C. Una vez temperado se vertió 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 se mantuvo entre 7,2 - 7,4. Esta medición se realizó sumergiendo el bulbo del electrodo del potenciómetro en el agar antes de autoclavar.

3.6.5.3 Preparación de los inóculos bacterianos:

La cepa almacenada fue reactivada para el análisis, esto se hizo transfiriendo una pequeña cantidad de colonias a un tubo con caldo TSB estéril, aproximadamente 10 mL y se llevó a incubar a 35°C por 24 horas. Luego al observarse turbidez en el tubo se confirmó la activación de la cepa. Para obtener colonias en fase logarítmica de crecimiento se tomó un asa del caldo inoculado y se sembró por estrías en una placa con agar TSA, esta se incubó por 24 horas a 35°C.

A partir de colonias puras del microorganismo *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 ya reactivado y en su fase logarítmica de crecimiento, se tomó una cierta cantidad de colonias que fueron diluidas en un tubo de ensayo conteniendo 10 mL de suero fisiológico (cloruro de sodio 0.9%) de tal manera que la solución resultante tuvo una turbidez muy similar al tubo N°1 de la escala de Mac Farland el cual corresponde a una concentración de 3×10^8 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 que fue diluido a un volumen total de 9 mL con suero fisiológico en un tubo con tapa rosca, todos los materiales usados estuvieron debidamente esterilizados y también el área de trabajo. La solución resultante tuvo una concentración de 1×10^8 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 tuvo una concentración de 1×10^6 ufc/mL. Por lo tanto al final se obtuvo un tubo de ensayo con una solución de 1×10^6 ufc/mL de *Staphylococcus aureus*.

3.6.5.4 Inoculación de las placas:

Se agregó 100 uL del inóculo bacteriano preparado (1×10^6 ufc/mL) a cada una de las placas que ya contenían el agar solidificado y con la ayuda de una espátula de Drigalsky se esparció el inóculo por toda la placa de tal manera que se obtuvo un crecimiento homogéneo, para lo cual se deslizó el asa en la placa en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie de la misma. Luego se repitió el procedimiento rotando la placa 60° en dos oportunidades más. Las placas fueron sembradas de borde a borde cuidadosamente, para evitar problemas en la realización de las lecturas. Se dejó secar 3 a 5 minutos antes de colocar los discos.

3.6.5.5 Preparación de los discos de antibióticos:

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

3.6.5.6 Aplicación de los discos a las placas inoculadas:

Estos fueron colocados con dispensador o pinza estéril. Luego de estar sobre el agar se presionó los discos levemente para que queden adheridos al mismo. Estuvieron a más de 15 mm del borde de la placa y fueron distribuidos de tal manera que no hubo superposición de los halos de inhibición. Los discos de antibióticos fueron colocados de la siguiente manera:

Seis discos del antibiótico en dos placas inoculadas con el microorganismo obteniendo resultados por sextuplicado.

Luego de colocados los discos la placa se incubó a $35-37^\circ\text{C}$ durante 18-24 horas.

Los discos con la muestra fueron colocados de manera similar, 6 discos de cada concentración en dos placas, estos también se incubaron a $35-37^\circ\text{C}$ durante 18-24 horas. El diluyente de las muestras o control negativo también se trabajó de la misma manera.

3.6.5.7 Interpretación de los resultados

Después de 18 a 24 horas de incubación, cada placa fue examinada. Las zonas de inhibición resultantes fueron uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento bacteriano. Los diámetros de la zona de inhibición completa fueron medidos en milímetros pasando por el centro del disco. La medición fue realizada con un vernier digital. Cada disco fue medido por tres diámetros diferentes y se reportó el promedio de dichas medidas. Los valores de las mediciones de los seis discos de cada concentración fueron comparados con las medidas de los halos de inhibición producidos por el antibiótico.

3.7. Técnicas estadísticas de análisis de datos

Se interpretaron los resultados del estudio, se midió y comparó los diámetros de halo de inhibición, entre los grupos del extracto etanólico y el grupo control positivo Gentamicina. El análisis se realizó con Software SPSS v20.

CAPITULO IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Resultados de la investigación

4.1.1. Resultados de la prueba de solubilidad

Los resultados del ensayo de solubilidad obtenidos del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) se muestra en la tabla N° 4.

Tabla N° 4: Resultados del ensayo de solubilidad.

1	Acetato de etilo	Insoluble (-)
2	Ciclohexano	Insoluble (-)
3	Metanol	Soluble (++)
4	Butanol	Insoluble (-)
5	Éter de petróleo	Insoluble (-)
6	Etanol	Soluble (++)
7	Agua destilada	Moderadamente soluble (+)

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados se determinaron en tres niveles, siendo el nivel (-) la insolubilidad del extracto y los niveles (+) y (++) los que indican si el extracto es: moderadamente soluble y soluble, respectivamente.

4.1.2. Resultados del screening fitoquímico.

Los resultados de la identificación de tipos de metabolitos presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca), se muestra en la tabla N° 5.

Tabla N° 5: Resultados del screening fitoquímico.

METABOLITOS	REACTIVO DE IDENTIFICACIÓN	RESULTADO
Almidón	Lugol	(+)
Azúcares reductores	Fehling A y Fehling B	-
Aminoácidos	Reactivo xantoproteico	+++
Triterpenos	Liebermann-Burchard	-
Antocianinas	H2SO4 al 10%.	-
Lactonas	Reactivo Baljet	-
Alcaloides	Reactivo de Dragendorff	+++
Flavonoides	Reactivo de Shinoda	+
Cardenolidos	Reactivo de Kedde.	-
Esteroles	Reactivo Liebermann-Burchard	-
Saponinas	agua caliente (40 °C)	+++
Taninos	Cloruro férrico	+++
Quinonas	Reactivo de Bornträger	+++
Fenoles	Cloruro férrico	+++

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados fueron medidos en cuatro niveles, siendo el nivel (-) la ausencia de metabolitos y los niveles (+), (++) y (+++) que indican presencia de metabolitos en nivel bajo, medio y alto, respectivamente.

4.1.3. Resultados del ensayo microbiológico

Los valores normales globales de los halos de inhibición de las 3 concentraciones 100%, 50% y 25% del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca), control positivo (Gentamicina 10ug) y el control negativo (alcohol etílico 96°), se muestran en la tabla N° 6.

Tabla N° 6: Cuadro de valores normales globales de las 3 concentraciones 100%, 50% y 25% del extracto etanólico, control positivo (Gentamicina 10ug) y el control negativo (alcohol etílico 96°).

Microorganismo	Controles			Muestra		
	Halo de inhibición (mm)			Halo de inhibición (mm)		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	Gentamicina 10ug			100%		
	27.53mm	27.11 mm	26.55 mm	13.97 mm	14.09 mm	13.83 mm
	26.50 mm	25.57 mm	25.72 mm	14.37 mm	13.83 mm	13.45 mm
				50%		
				10.49 mm	11.56 mm	11.45 mm
				10.76 mm	10.46 mm	10.52 mm
	Alcohol etílico 96°			25%		
	0 mm	0 mm	0 mm	8.85 mm	8.82 mm	8.52 mm
	0 mm	0 mm	0 mm	9.12 mm	8.86 mm	8.25 mm

Fuente: Elaboración propia

Los valores promedios globales de los halos de inhibición de las 3 concentraciones 100%, 50% y 25% del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca), control positivo (Gentamicina 10ug) y el control negativo (alcohol etílico 96°), se muestran en la tabla N° 7 y en la figura N° 2.

Tabla N° 7: Cuadro de valores promedios globales de las 3 concentraciones 100%, 50% y 25% del extracto etanólico, control positivo (Gentamicina 10ug) y el control negativo (alcohol etílico 96°)

Variable	Media	Mediana	Desviación Estándar
Alcohol etílico 96	0.00 mm	0.00 mm	0.00
Gentamicina 10ug	26.50 mm	26.53 mm	0.76
Extracto etanólico 100%	13.92 mm	13.90 mm	0.31
Extracto etanólico 50%	10.87 mm	10.64 mm	0.50
Extracto etanólico 25%	8.74 mm	8.84 mm	0.31

Fuente: Elaboración propia

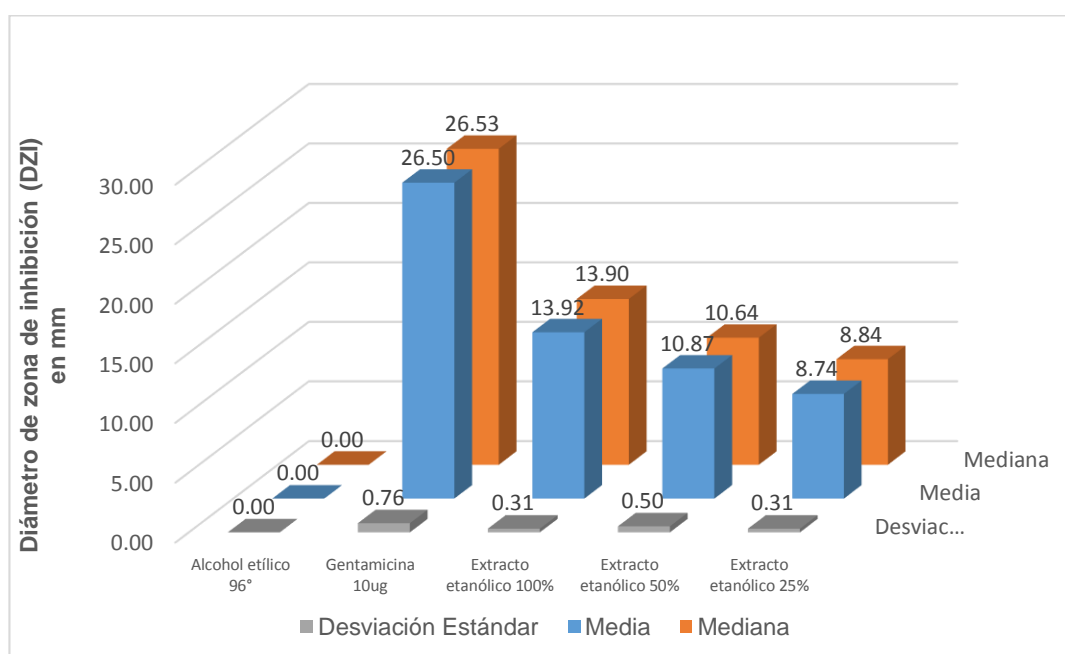


Figura N° 2: Gráfico de barras de los valores promedios globales de las 3 concentraciones 100%, 50% y 25% del extracto etanólico, control positivo (Gentamicina 10ug) y el control negativo (alcohol etílico 96°).

Fuente: Elaboración propia

La actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca), control positivo (Gentamicina 10ug) y control negativo (alcohol etílico 96°) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, según diámetro de la zona de inhibición y porcentaje de inhibición, se muestran en la tabla N° 8, figura N° 3 y 4

Tabla N° 8: Actividad antibacteriana del extracto etanólico, según diámetro de la zona de inhibición y porcentaje de inhibición.

Bacteria en estudio	Extracto etanólico (hojas)	Diámetro de zona de inhibición (DZI) en mm		Actividad antibacteriana %	
	%	X (mm)	Resultado (Kirby - Bauer)	% Inhibición	Resultados
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.	Alcohol etílico 96%	0.00	0.00	0.00	0.00
	Gentamicina 10ug	26.50	Sensible	100.00
	Extracto etanólico 100%	13.92	Intermedio	52.53	Moderadamente activo
	Extracto etanólico 50%	10.87	Resistente	41.02	Poco activo
	Extracto etanólico 25%	8.74	Resistente	32.98	Inactivo

* Esquema DZI frente a control positivo & Actividad antimicrobiana/ Porcentaje de inhibición

Resistente: < 12 mm Inactivo: < 40%

Intermedio: 13-14 mm Poco activo: 40 - 50%

Sensible: > 15 mm Moderadamente activo: 51 - 75%

Buena actividad: > 76%

La categorización de las tres concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca), control negativo (alcohol etílico 96°) y control positivo (Gentamicina 10ug), respecto al diámetro de zona de inhibición (DZI) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 se muestra en la figura N° 3.

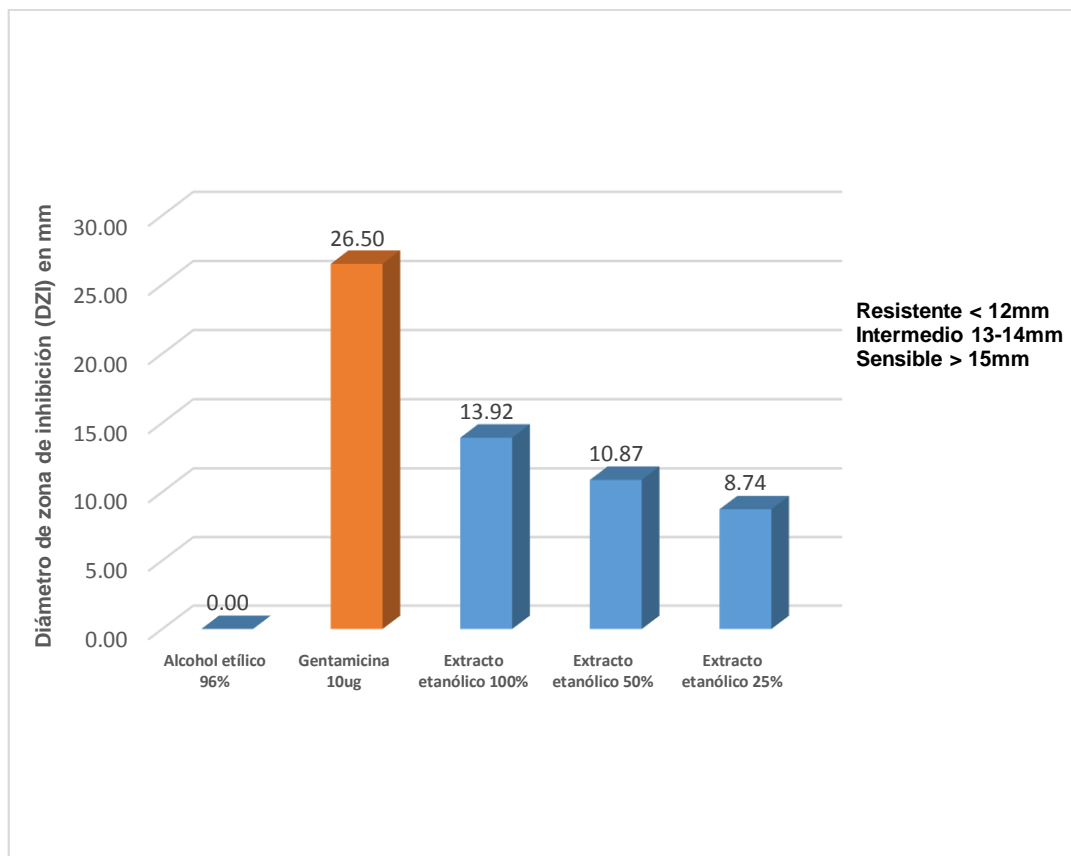


Figura N° 3: Gráfico de barras de la categorización del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca), según diámetro de la zona de inhibición.

Fuente: Elaboración propia.

La actividad antibacteriana según porcentajes de inhibición del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) en las tres concentraciones, control negativo (alcohol etílico 96°) y control positivo (Gentamicina 10ug) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 se muestra en la figura N° 4.

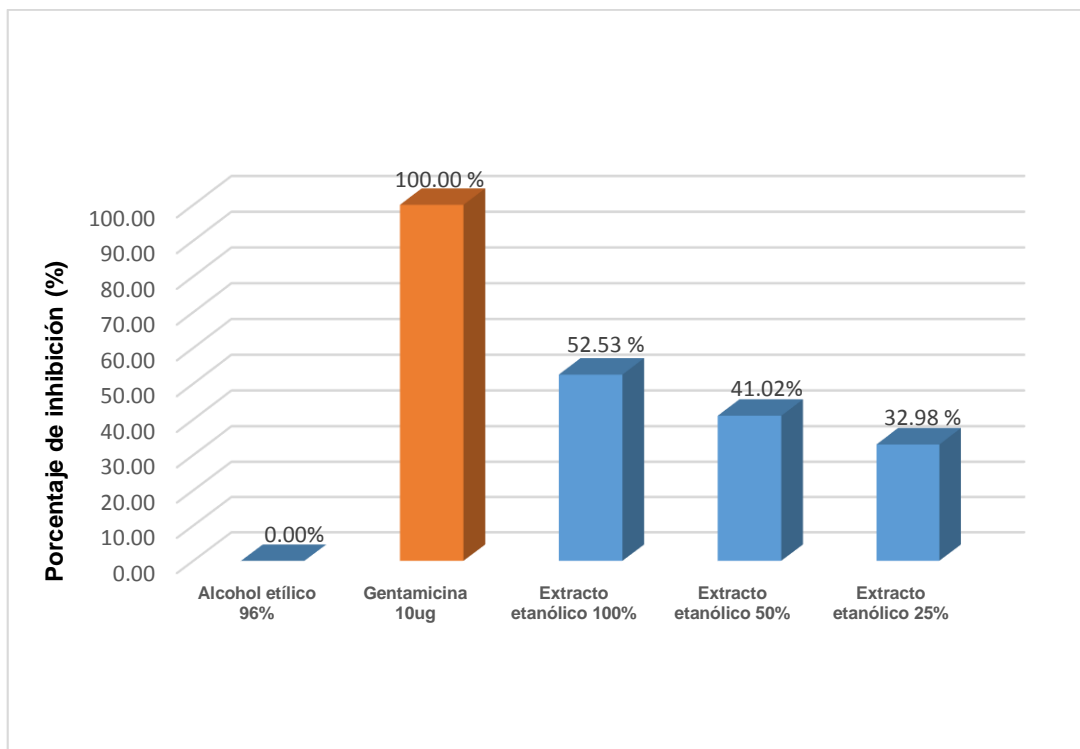


Figura N° 4: Gráfico de barras de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica (Benth.) Endl.* (mullaca), según porcentaje de inhibición.

Fuente: Elaboración propia

4.2. Discusión de resultados

En el ensayo de solubilidad realizado al extracto etanólico de hojas de *Muehlenbeckia volcánica (Benth.) Endl.* (mullaca) observó que es soluble en metanol y alcohol etílico, moderadamente soluble en agua destilada (Tabla N° 4)

Según el ensayo fitoquímico preliminar realizado al extracto etanólico de hojas de *Muehlenbeckia volcánica (Benth.) Endl.* (mullaca), se observó la presencia de metabolitos como alcaloides, aminoácidos, saponinas, taninos, quinonas y fenoles (tabla N° 5); que concuerda con la investigación de Arauco K. (2016), quien realizó la prueba preliminar cualitativa de los

metabolitos del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (mullaca), encontrando también la presencia de taninos, quinonas, compuestos fenólicos, grupos aminos libres, flavonoides, terpenos y/o esteroides. ⁽¹⁴⁾Además Sinche J. (1956) realizó un estudio Farmacognóstico y Farmacológico de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth) “mullaca” donde encontró presencia de Saponinas politerpénicas, taninos catequicos, resina, gomas, mucilagos, grasas, ceras, rutina, pectinas, almidones y celulosa. ⁽²⁵⁾

En el estudio fitoquímico del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca), se observa la presencia de alcaloides, saponinas, taninos y quinonas (tabla N° 5), los cuales son los compuestos químicos responsables de la actividad antibacteriana; Lock O. en su libro “Investigación fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales” menciona que el efecto antibacteriano se debe a la presencia de los alcaloides, compuestos fenólicos y quinonas;⁽²⁷⁾Kuklinski, C. en su libro “Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural” afirma que los compuestos que tienen actividad antibacteriana son: Saponinas, taninos y flavonoides. ⁽²⁶⁾

En el extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. al 25% frente a cepas de *Staphylococcus aureus* se observó un halo de inhibición de 8.74mm de diámetro de zona de inhibición (DZI); mientras que el extracto al 50% se observó un halo de inhibición de 10.87mm de diámetro de zona de inhibición (DZI) y en el extracto al 100% se observó un halo de inhibición de 13.92mm de diámetro de zona de inhibición (DZI). Por lo tanto los valores de los halos de inhibición de 8.74mm y 10.87mm son resistentes, mientras que el halo de inhibición de 13.92mm es intermedio (tabla N° 8 y figura N°3) en comparación con los criterios de categorización del Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión, frente a su control positivo, en el cual indica si se utiliza Gentamicina 10 ug como control positivo se categoriza Sensible cuando el halo de inhibición se encuentra > 15 mm, Intermedio cuando el halo de inhibición se encuentra entre 13-14 mm y resistente si es < 12 mm.⁽⁶⁾ Gómez S; et al. Estudiaron un extracto alcohólico de hojas de *Anacardium*

occidentale Linn. "Casho" utilizando el método difusión en disco en cepas de *Staphylococcus aureus*, similar al empleado en el presente estudio, utilizó como control Positivo Gentamicina 10 ug, el extracto fue evaluado en tres concentraciones: 75, 150 y 300 mg/ml. encontrándose diámetros en la zona de inhibición de 6.0mm, 6.7mm y 8.0 mm. Respectivamente, obteniendo como resultado resistente en las tres muestras evaluadas. ⁽¹³⁾

Con los resultados obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición para determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca), tomando como referencia el protocolo de estudio del Instituto de Medicina Tradicional, donde considera buena actividad si el porcentaje de inhibición es > 76%, Moderadamente activo 51 - 75%, Poco activo 40 - 50% e Inactivo < 40%. ⁽³⁶⁾El extracto etanólico al 25% de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) presenta una actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* de 32.98% (es inactivo comparado con gentamicina 10 ug); en el extracto etanólico al 50% se observó una actividad antibacteriana de 41.02% (es poco activo comparado con gentamicina 10 ug) y en el extracto etanólico al 100% se observó una actividad antibacteriana de 52.53% (es moderadamente activo comparado con gentamicina 10 ug) (tabla N° 8 y figura N°4). Saldaña D; et al. Realizaron una investigación titulada: "Evaluación fitoquímica y actividad antibacteriana *in vitro* de *Clidemia hirta* L don "Mullaca morada"; similar al estudio realizado. La actividad antimicrobiana fue evaluada usando el método de disco difusión, utilizando gentamicina 10ug como control positivo, para *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 19 y 12 mg/ml se encontró porcentajes de inhibición de 66.67% y 58.33%; respectivamente donde se evidencia como resultado moderada actividad.⁽¹⁵⁾

En la presente investigación en relación al control negativo (alcohol etílico 96°) se observó crecimiento total de las bacterias de *Staphylococcus aureus* por lo tanto no hay halo de inhibición ni efecto antibacteriano lo que nos valida que el efecto antibacteriano del extracto de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) se debe al 100% a propiedades de la planta y no del

vehículo con el que se maceró (tabla N° 6), estos resultados también concuerdan con el estudio realizado por Rodríguez A; et al. determinaron el efecto antibacteriano del extracto etanólico de tallos de *Rosmarinus officinalis* en cultivos de *Staphylococcus aureus*, utilizó el método de difusión en disco y como control negativo (alcohol de 70°) y concluye que en el control negativo no se encontraron ningún efecto antibacteriano. ⁽³⁷⁾

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

1. El extracto etanólico de las hojas de ***Muehlenbeckia volcánica (Benth.) Endl.*** (mullaca) presenta metabolitos secundarios como alcaloides, saponinas, taninos y quinonas que podrían ser los responsables de la actividad antibacteriana.
2. La concentración al 100 por ciento del extracto etanólico de las hojas de ***Muehlenbeckia volcánica (Benth.) Endl.*** (mullaca) presenta mayor efecto antibacteriano “*In vitro*” en cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
3. Al comparar la actividad antibacteriana “*In vitro*” a través de los halos de inhibición se ha demostrado que el extracto etanólico de las hojas de ***Muehlenbeckia volcánica (Benth.) Endl.*** (mullaca) tiene un efecto antibacteriano menor que la Gentamicina en cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

5.2. Recomendaciones

1. Se recomienda utilizar preparados galénicos a base de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) ya que tiene un efecto antibacteriano y que puedan complementar el tratamiento convencional.
2. Se recomienda al MINSA tener como una alternativa económica el uso de plantas medicinales *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) en pacientes de bajos recursos aplicando la medicina natural.
3. Se recomienda realizar estudios microbiológicos con otras bacterias y otros tipos de extractos (acuosos, hexánicos, etc.) de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca) para determinar su espectro de acción antibacteriano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Washington C. Diagnostico microbiológico. 6^{ta} ed. Argentina: Editorial médica panamericana; 2007.
2. Vega P. Uso de plantas con propiedades medicinales en la comunidad del cantón Yacuambi durante el período Julio - Diciembre 2011. [Tesis de titulación]. Ecuador. Universidad técnica particular de Loja: 2013
3. Ringuelet J. Sonia V. Productos naturales vegetales 1^a ed. La Plata: Universidad Nacional de La Plata, 2013. 261p.
4. Lock O. Investigación en productos naturales. Sociedad Química del Perú. Perú. 2011.
5. Madigan M. Biología de los Microorganismos. Décima edición. Madrid. España. 2004.
6. Instituto Nacional de Salud (INS). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el Método de disco difusión. Ministerio de Salud. Lima -2002.
7. Organización Mundial de la Salud. Resistencia bacteriana [Internet]. 2017 [citado 4 ene 2018]. Disponible en: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/es/>
8. Cedric F. y col. Actividades antibacterianas de los extractos de metanol de *Albizia adianthifolia*, *Alchornea laxiflora*, *Laportea ovalifolia* y otras tres plantas camerunesas contra bacterias Gram-negativas resistentes a múltiples fármacos, Saudi Journal of Biological Sciences. 2016.
9. Rodríguez D. Barreto A. Propiedades biológicas de *Pedilanthus tithymaloides*: una alternativa natural de tratamiento. Cien. Act. [Internet]. 2015 [citado 7 ene 2018]. Disponible en: <http://revistas.usb.edu.co/index.php/Cienciactual/article/view/2288>

10. Munayco E. Efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de *Allium sativum* sobre cepas estándares de la cavidad bucal [tesis de titulación]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013
11. Levy SB. The antibiotic paradox. 2^{da} Ed. edición. Cambridge (MA): Perseus Publishing; 2002.
12. Purca T. Efectividad antibacteriana "*in vitro*" del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis*. L (Romero) sobre flora salival [tesis de titulación]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2013. 97p.
13. Gómez S. Ferreira J. Evaluación de la actividad anti-*Staphylococcus aureus* del extracto alcohólico de hojas de *Anacardium occidentale* Linn. "Casho" mediante el método de Difusión en disco (Kirby-Bauer)". [Tesis titulación]. Iquitos. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; 2016. 173p.
14. Arauco K. Efecto antiinflamatorio y analgésico del extracto etanólico de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth) endlincher (mullaca) sobre el granuloma inducido por carragenina en ratas. [Tesis titulación]. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2016. 68p.
15. Saldaña D. Garcia G. Evaluación fitoquímica y actividad antibacteriana *in vitro* de *Clidemia hirta* L don "mullaca morada" por el método de disco difusión, frente a microorganismos patógenos. [Tesis titulación]. Iquitos. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; 2016. 118p
16. Lozada M. Estudio fotoquímico y evaluación de actividad antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Streptococcus mutans* ATCC: 25175, *Streptococcus pneumoniae* ATCC: 49619, *Streptococcus pyogenes* ATCC: 19615 de extractos apolares (Cloroformo –Hexano) de *Croton elegans* Kunth (Mosquera). [Tesis titulación]. Quito. Universidad Politécnica Salesiana; 2016. 47p.
17. Flores G. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de *Pleurotus ostreatus* ante cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. [Tesis titulación]. Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 2017. 81p.

18. Borja D. Tello P. Evaluación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de la hoja, tallo y raíz de *Petiveria alliacea* L. sobre *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. [Tesis titulación]. Quito. Universidad Central del Ecuador. 2015. 138p.
19. Sisalema D. Separación de metabolitos secundarios de Martin Galvis (*Senna multijuga*) con actividad antibacteriana. [Tesis titulación]. Riobamba-Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 2013. 99p.
20. Cornejo V. Estudio Morfológico-estructural de plantas medicinales de uso más frecuente en Ayacucho. Facultad de Ciencias Biológicas. Ayacucho. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2003.
21. Mostacero et al. Plantas medicinales del Perú, taxonomía, ecografías, fenología, y etnobotánica. 1^{ra} ed. Perú. Asamblea nacional de rectores. 2011.
22. Alfaro R. Inventario de plantas medicinales de uso más frecuente en la provincia de Cangallo. [Tesis titulación]. Ayacucho. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2004. 71p.
23. Romero M. Plantas medicinales con propiedades antioxidantes en los distritos de Ayacucho, Carmen Alto y Quinoa de la provincia de Huamanga. Ayacucho. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2006.
24. Mantilla H. Las Plantas Medicinales de Nuestra Madre Tierra. 2a ed. Perú; 2004.
25. Sinche J. Estudio Farmacognóstico y Farmacológico de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth) "mullaca". [Tesis]. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 1956.
26. Kuklinski C. Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural, Farmacognosia. Barcelona: Omega; 2003.
27. Lock O. Investigación fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales. 3^{ra} ed. Lima. K&J soluciones gráficas; 2016.

28. Boludo CJ, Terrero JD. Iridoides y secoiridoides (1): clasificación, biosíntesis, importancia ecológica, estrategias evolutivas y modificaciones semisintéticas. *Revista de fitoterapia*, 2013.
29. Murray sosenthalpfaller. *Microbiología médica*. 7^{ma} edición. 2013; 174-187, 258-264.
30. Peñaranda L, Sierra M. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de partes aéreas de las especies *Bursera simaruba* y *Bursera graveolens* contra algunos microorganismos patógenos. Cuba. Pontificia Universidad Javeriana. 2003.
31. Organización Mundial de la Salud. Estrategia mundial OMS de contención de la resistencia a los antimicrobianos. Ginebra: OMS; 2001
32. Mayca J. Prescripción de antibióticos en la consulta ambulatoria del servicio de Medicina Interna del Hospital Cayetano Heredia. [Tesis titulación] Lima: Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2001.
33. Schwart BH, Bell DM, Hughes JM. Prevención del surgimiento de la resistencia a los antimicrobianos: una llamada a la acción de los médicos, los funcionarios de salud pública y los pacientes. *JAMA* 1997; 278p
34. Armijo A. *Farmacología humana*. 6^{ta} ed. Mediavilla. 2014.
35. López E. Estudio Fitoquímico y aproximación Genética en especies de la sección Plinthine del género *Arenaria*. [Tesis]. España. Universidad de Granada Departamento de Botánica. 2007.
36. Protocolo de estudio de la actividad antimicrobiana. Instituto de Medicina Tradicional (IMET) – EsSalud. 2007.
37. Rodenas D. Rodríguez A. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de tallos de *Rosmarinus officinalis*. L (Romero) en cultivos de “*Staphylococcus aureus*” estudio *in vitro*. [Tesis titulación]. Lima. Universidad Inca Garcilaso de la Vega. 2018; 97p.
38. Cavalieri, Stephen, y col. *Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana*. [Internet]. 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

39. Montoya M. Las cepas ATCC. Instituto Colombiano de Medicina Tropical. 2002.
40. Gonzales A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas del Amazonas. Universidad nacional de Colombia. 2004; 100p.

ANEXO 1: Matriz de consistencia

“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. (Mullaca) EN CEPAS DE <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, IN VITRO”					
DEFINICION DEL PROBLEMA	OBJETIVOS	FORMULACION DE HIPÓTESIS	CLASIFICACIÓN DE VARIABLES	DEFINICIÓN OPERACIONAL DE LAS VARIABLES	METODOLOGIA
<p>PROBLEMA GENERAL:</p> <p>¿El extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. (mullaca) poseerá efecto antibacteriano frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>in vitro</i>?</p>	<p>OBJETIVO GENERAL:</p> <p>Evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. (mullaca) <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.</p>	<p>HIPÓTESIS PRINCIPAL:</p> <p>El extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. (mullaca) posee efecto antibacteriano en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>in vitro</i>.</p>	<p>VARIABLE INDEPENDIENTE:</p> <p>Extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. (Mullaca)</p>	<p>VARIABLE INDEPENDIENTE:</p> <p>Concentración del extracto.</p> <p>Presencia de metabolitos secundarios.</p>	<p>TIPO:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Por su alcance es de tipo: Descriptiva. -Por su ubicación temporal es de tipo: Transversal. -Por su finalidad es de tipo: Básica. <p>DISEÑO:</p> <p>Experimental</p>
<p>PROBLEMAS ESPECÍFICOS:</p> <p>¿Qué tipos de metabolitos secundarios poseerán el extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. (mullaca)?</p>	<p>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</p> <p>Determinar los tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. (mullaca) que se relacionan con el efecto antibacteriano.</p>	<p>HIPÓTESIS ESPECÍFICAS:</p> <p>Existen algunos tipos de metabolitos secundarios en el extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. (mullaca) relacionados con el efecto antibacteriano.</p>	<p>VARIABLE DEPENDIENTE:</p> <p>Efecto antibacteriano en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.</p>	<p>VARIABLE DEPENDIENTE:</p> <p>Diámetro de halo de inhibición.</p>	<p>POBLACIÓN Y MUESTRA:</p> <p>10 placas Petri de cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538.</p> <p>INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS:</p>

<p>¿El extracto etanólico al 25%, 50% y 100% de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica (Benth.) Endl.</i> (mullaca) poseerán efecto antibacteriano frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>in vitro</i>?</p> <p>¿El extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica (Benth.) Endl.</i> (mullaca) tendrá mayor efecto antibacteriano frente a la Gentamicina en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>in vitro</i>?</p>	<p>Evaluar si la concentración al 25%, 50% y 100% del extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica (Benth.) Endl.</i> (mullaca) poseen efecto antibacteriano en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>in vitro</i>.</p> <p>Comparar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica (Benth.) Endl.</i> (mullaca) frente a la Gentamicina en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>in vitro</i>.</p>	<p>El extracto etanólico al 25%, 50% y 100% de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica (Benth.) Endl.</i> (mullaca) poseen efecto antibacteriano en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>in vitro</i>.</p> <p>El extracto etanólico de las hojas de <i>Muehlenbeckia volcánica (Benth.) Endl.</i> (mullaca) tiene mayor efecto antibacteriano frente a la Gentamicina en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538, <i>in vitro</i>.</p>			<p>Instrumento de medición de precisión vernier.</p> <p>Ficha de recolección de datos.</p> <p>TÉCNICAS:</p> <p>Maceración etanólica.</p> <p>Marcha fitoquímica.</p> <p>Prueba de sensibilidad método de Difusión en disco.</p> <p>Procesamiento y análisis de datos: SPSS.</p>
--	--	---	--	--	---

ANEXO 2: Certificado botánico



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



"Año del Buen Servicio al Ciudadano"

CONSTANCIA N° 268-USM-2017

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

La muestra vegetal (planta completa) recibida de **Daniel LAGOS TALAVERANO**, estudiante de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega; sido estudiada y clasificada como: ***Muehlenbeckia volcanica*** (Benth.) Endl.; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: CARYOPHYLLIDAE

ORDEN: POLYGONALES

FAMILIA: POLYGONACEAE

GENERO: *Muehlenbeckia*


ESPECIE: *Muehlenbeckia volcanica* (Benth.) Endl.

Nombre vulgar: "mullaca"

Determinado por Mg. Hamilton Beltrán Santiago

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

Lima, 23 de Noviembre de 2017


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



ACE/ab

ANEXO 3: Instrumento de recolección de datos



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

FICHA DE OBSERVACION DE RECOLECCION DE DATOS

“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (MULLACA) EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC, *IN VITRO*”

INSTRUCCIONES

- Antes de empezar con la evaluación, procure estar en un estado de equilibrio emocional y somático.
- Si se siente agotado, estresado o enfermo, aplaza la evaluación.
- Procure desarrollar todas las mediciones bajo las mismas circunstancias de comodidad.
- En el caso de no tener certeza sobre la medición de una determinada unidad de análisis, elimine su evaluación.
- Registre los datos sin tachaduras ni enmendaduras.
- Los espacios en los que no contenga información, táchelos con una línea.

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CONTRA <i>Staphylococcus aureus</i> POR EL METODO DE KIRBY BAUER						
Nº de placa	CONCENTRACIÓN (%) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Muehlenbeckia volcánica</i> (Benth.) Endl. (MULLACA)				CONTROLES	
	DIAMETRO DEL HALO INHIBICION (mm)				GENTAMICINA	ETANOL 96°
	25%	50%	100%		10 ug	100ul
Placa 1-2						
Placa 1-2						
Placa 1-2						
Placa 1-2						
Placa 1-2						

ANEXO 4: Ficha de validación por juicio de expertos



Universidad
Inca Garcilaso de la Vega
Nuevos Tiempos. Nuevas Ideas

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

1. DATOS GENERALES

- 1.1.- Apellido y nombres del experto: JACINTO HERVIAS, Pedro
 1.2.- Cargo e institución donde labora: Docente
 1.3.- Grado académico: Magister Q.F. registro colegio profesional 17/97
 1.4.- Nombre de instrumento y motivo de evaluación: FICHA DE RECOLECCION DE DATOS
 1.5.- Autor de instrumento: Quinto Ancoña, Rocío; Lagos Tolentino, Daniel
 1.6.- Instrucciones: Luego de analizar el instrumento y cotejar la investigación con la matriz de consistencia de la presente, le solicitamos que en base a su criterio y experiencia profesional, valide dicho instrumento para su aplicación.

Nota: Para cada criterio considere la escala de 1 a 5 donde:

1.-Muy poco	2.-Poco	3.-Regular	4.-Aceptable	5.-Muy aceptable
-------------	---------	------------	--------------	------------------

INDICADORES	CRITERIOS	PUNTUACIÓN				
		1	2	3	4	5
1.- Claridad	Está formulado el instrumento con un lenguaje apropiado.					X
2.- Objetividad	El instrumento evidencia recojo de datos observables.					X
3.- Actualidad	El instrumento se adecua a los criterios científicos y tecnológicos.					X
4.- Organización	El instrumento tiene una organización lógica.					X
5.- Suficiente	Son suficientes en cantidad y calidad los elementos que conforman el instrumento.					X
6.- Intencionalidad	Es adecuado para obtener datos relacionados al estudio fitoquímico y efecto antibacteriano in vitro de la planta mencionada.					X
7.- Consistencia	Se basa en aspectos teóricos científicos de la Farmacognosia, Farmacología y Microbiología					X
8.- Coherencia	Existe coherencia y relación de los ítems, indicadores, las dimensiones y las variables.					X
9.- Metodología	La estrategia responde al propósito de la problemática de la investigación					X
10.- Pertinencia	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al método científico.					X
	Total parcial					50
	Total					50

III. PROMEDIO DE VALORACIÓN: 50

Puntuación

11-20	No válido, reformular
21-30	No válido, modificar
31-40	Válido, mejorar
41-50	Válido, aplicar

Mg. Pedro Jacinto H.
C.O.F.P.: 1797

ANEXO 5: Ficha de observación de la prueba de solubilidad



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

FICHA DE OBSERVACION DE PRUEBA DE SOLUBILIDAD

“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (MULLACA) EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC, *IN VITRO*”

INSTRUCCIONES

- Antes de empezar con la evaluación, procure estar en un estado de equilibrio emocional y somático.
- Si se siente agotado, estresado o enfermo, aplaza la evaluación.
- Procure desarrollar todas las mediciones bajo las mismas circunstancias de comodidad.
- En el caso de no tener certeza sobre la medición de una determinada unidad de análisis, elimine su evaluación.
- Registre los datos sin tachaduras ni enmendaduras.
- Los espacios en los que no contenga información, táchelos con una línea.

	DEMOSTRACIÓN	IDENTIFICACIÓN	RESULTADOS
ACETATO DE ETILO	1 mL extracto + 1 mL del reactivo	Soluble, Moderadamente soluble o Insoluble	
CICLOHEXANO	1 mL extracto + 1 mL del reactivo	Soluble, Moderadamente soluble o Insoluble	
METANOL	1 mL extracto + 1 mL del reactivo	Soluble, Moderadamente soluble o Insoluble	
BUTANOL	1 mL extracto + 1 mL del reactivo	Soluble, Moderadamente soluble o Insoluble	
ÉTER DE PETRÓLEO	1 mL extracto + 1 mL del reactivo	Soluble, Moderadamente soluble o Insoluble	
ETANOL	1 mL extracto + 1 mL del reactivo	Soluble, Moderadamente soluble o Insoluble	
AGUA DESTILADA	1 mL extracto + 1 mL del reactivo	Soluble, Moderadamente soluble o Insoluble	

Leyenda: Soluble (++) , Moderadamente soluble (+), Insoluble (-)

ANEXO 6: Ficha de validación por juicio de expertos



Universidad
Inca Garcilaso de la Vega
Nuevos Tiempos. Nuevas Ideas

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

1. DATOS GENERALES

1.1.- Apellido y nombres del experto: Carla Abreu Pérez

1.2.- Cargo e institución donde labora: UIG

1.3.- Grado académico: Magister registro colegio profesional 7767

1.4.- Nombre de instrumento y motivo de evaluación: FICHA DE RECOLECCION DE DATOS

1.5.- Autor de instrumento: Antonio Ancoña, Eucio, Lagos Taberamo, Daniel

1.6.- Instrucciones: Luego de analizar el instrumento y cotejar la investigación con la matriz de consistencia de la presente, le solicitamos que en base a su criterio y experiencia profesional, valide dicho instrumento para su aplicación.

Nota: Para cada criterio considere la escala de 1 a 5 donde:

1.-Muy poco	2.-Poco	3.-Regular	4.-Aceptable	5.-Muy aceptable
-------------	---------	------------	--------------	------------------

INDICADORES	CRITERIOS	PUNTUACIÓN				
		1	2	3	4	5
1.- Claridad	Está formulado el instrumento con un lenguaje apropiado.					✓
2.- Objetividad	El instrumento evidencia recojo de datos observables.					✓
3.- Actualidad	El instrumento se adecua a los criterios científicos y tecnológicos.					✓
4.-Organización	El instrumento tiene una organización lógica.					✓
5.- Suficiente	Son suficientes en cantidad y calidad los elementos que conforman el instrumento.					✓
6.- Intencionalidad	Es adecuado para obtener datos relacionados al estudio fitoquímico y efecto antibacteriano in vitro de la planta mencionada.					✓
7.- Consistencia	Se basa en aspectos teóricos científicos de la Farmacognosia, Farmacología y Microbiología					✓
8.- Coherencia	Existe coherencia y relación de los ítems, indicadores, las dimensiones y las variables.					✓
9.- Metodología	La estrategia responde al propósito de la problemática de la investigación					✓
10.- Pertinencia	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al método científico.					✓
	Total parcial					50
	Total					50

III. PROMEDIO DE VALORACIÓN: 50

Puntuación

COP. 07767

11-20	No válido, reformular
21-30	No válido, modificar
31-40	Válido, mejorar
41-50	Válido, aplicar

ANEXO 7: Screening fitoquímico



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

FICHA DE OBSERVACION DE PRUEBA DE SCREENING FITOQUÍMICO

“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (MULLACA) EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC, *IN VITRO*”

INSTRUCCIONES

- Antes de empezar con la evaluación, procure estar en un estado de equilibrio emocional y somático.
- Si se siente agotado, estresado o enfermo, aplaza la evaluación.
- Procure desarrollar todas las mediciones bajo las mismas circunstancias de comodidad.
- En el caso de no tener certeza sobre la medición de una determinada unidad de análisis, elimine su evaluación.
- Registre los datos sin tachaduras ni enmendaduras.
- Los espacios en los que no contenga información, táchelos con una línea.

SCREENING FITOQUIMICO				
	REACTIVO	DEMOSTRACION	IDENTIFICACION	RESULTADOS
IDENTIFICACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	Fehling A + Fehling B	2 mL extracto + 5 gotas de Fehling A + Fehling B, agitar luego llevamos a baño maría por 10 minutos.	Formación de un precipitado anaranjado rojizo	
IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS	FeCl ₃	2 mL extracto + 5 gotas del reactivo	Coloración azul oscuro o verde oscuro	
IDENTIFICACIÓN DE TANINOS	FeCl ₃	2 mL de extracto + 5 gotas del reactivo	Precipitado color azul oscuro.	
IDENTIFICACIÓN SAPONINAS	H ₂ O	2 mL extracto + 1 mL de H ₂ O destilada caliente agitación por 2 minutos	Forma espuma con apariencia de panal de abeja	
IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES	Reacción de Shinoda	2 mL de extracto + limadura de magnesio + 1° gotas de HCl (agitar)	Cambio de coloración a naranja, rojo, violeta o rosado	
IDENTIFICACIÓN DE ANTOCIANINA	Reacción con H ₂ SO ₄ al 10%	2 mL de extracto + 6 gotas de H ₂ SO ₄ al 10%	Cambio de coloración rojo naranja	
IDENTIFICACIÓN DE LACTONAS	Reacción de Baljet	2 mL de extracto + 4 gotas de reactivo	Cambio de coloración a color	

			naranja o rojo oscuro	
IDENTIFICACIÓN DE CARDENÓLIDO	Reacción de Kedde	2 mL de extracto + 2 gotas de reactivo	Cambio de coloración a azul o violeta	
IDENTIFICACIÓN DE ESTEROIDES	Reacción de Lieberman	2 mL de extracto +4 gotas de reactivo	Cambio de coloración azul, verde o rojo	
IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES	Dragendorff	2 mL extracto + 3 gotas del reactivo	Precipitado color rojo marrón	
	Reactivo de mayer	2 mL extracto + 3 gotas del reactivo	Precipitado color blanco lechoso	
	Reactivo de wagner	2 mL extracto + 3 gotas del reactivo	Precipitado color marrón	
IDENTIFICACIÓN DE QUINONAS	Reactivo de Bornträger	2 ml extracto hervir por 10 minutos con Hidroxido de potasio al 2-5%. Enfriar la solución, se acidula y extraer con benceno.	La capa organica se decolora y la fase alcalina se pone roja.	

Leyenda:

Abundante cantidad (+++)

Mediana cantidad (++)

Poca cantidad (+)

Ausencia (-)

ANEXO 8: Ficha de validación por juicio de expertos



Universidad
Inca Garcilaso de la Vega
Nuevos Tiempos, Nuevas Ideas

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

1. DATOS GENERALES

- 1.1.- Apellido y nombres del experto: Ruiz Sanchez Maritza Galive
 1.2.- Cargo e institución donde labora: Docente
 1.3.- Grado académico: D.Sc. FCSAregistro colegio profesional 6.3.04
 1.4.- Nombre de instrumento y motivo de evaluación: FICHA DE RECOLECCION DE DATOS
 1.5.- Autor de instrumento: Quinto Ancoite, Rocío, Lagos Talavera, Daniel.
 1.6.- Instrucciones: Luego de analizar el instrumento y cotejar la investigación con la matriz de consistencia de la presente, le solicitamos que en base a su criterio y experiencia profesional, valide dicho instrumento para su aplicación.

Nota: Para cada criterio considere la escala de 1 a 5 donde:

1.-Muy poco	2.-Poco	3.-Regular	4.-Aceptable	5.-Muy aceptable
-------------	---------	------------	--------------	------------------

INDICADORES	CRITERIOS	PUNTUACIÓN				
		1	2	3	4	5
1.- Claridad	Está formulado el instrumento con un lenguaje apropiado.					✓
2.- Objetividad	El instrumento evidencia recojo de datos observables.					✓
3.- Actualidad	El instrumento se adecua a los criterios científicos y tecnológicos.					✓
4.- Organización	El instrumento tiene una organización lógica.					✓
5.- Suficiente	Son suficientes en cantidad y calidad los elementos que conforman el instrumento.					✓
6.- Intencionalidad	Es adecuado para obtener datos relacionados al estudio fitoquímico y efecto antibacteriano in vitro de la planta mencionada.					✓
7.- Consistencia	Se basa en aspectos teóricos científicos de la Farmacognosia, Farmacología y Microbiología					✓
8.- Coherencia	Existe coherencia y relación de los ítems, indicadores, las dimensiones y las variables.					✓
9.- Metodología	La estrategia responde al propósito de la problemática de la investigación					✓
10.- Pertinencia	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al método científico.					✓
	Total parcial					50
	Total					50

III. PROMEDIO DE VALORACIÓN: 50

Puntuación

11-20	No válido, reformular
21-30	No válido, modificar
31-40	Válido, mejorar
41-50	Válido, aplicar

ANEXO 9: Testimonios fotográficos



Figura N° 5:

- A)** Recolección de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl.
- B)** Selección de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl.
- C)** Limpieza de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl.
- D)** Secado de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl.



Figura N° 6:

A) Trituración de las hojas secas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl.

B) Pesado de las hojas trituradas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl.

C) Preparación del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl.

D) Filtración de la solución macerada de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl.



Figura N° 7:

A) Marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl.

B) Resultados de la marcha fitoquímica de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl.

C) Resultado de la identificación de alcaloides.

D) Resultado de la identificación de saponinas.

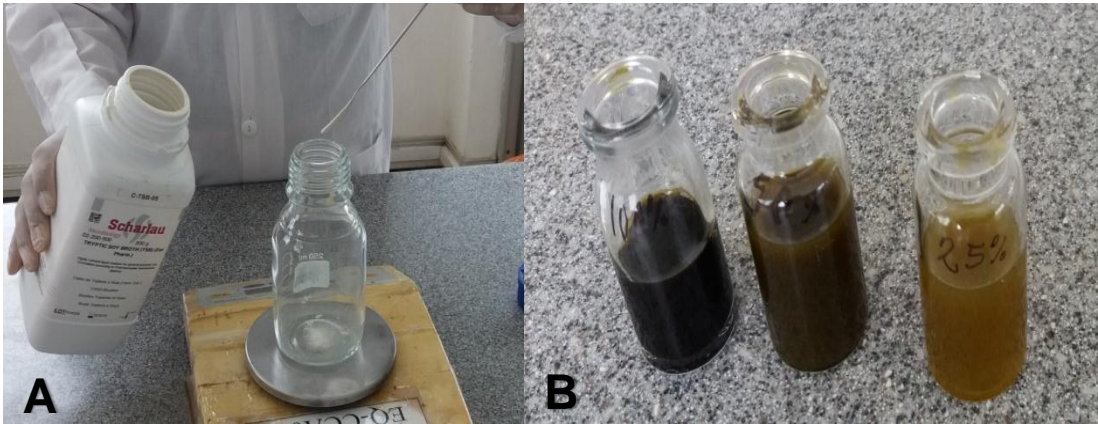


Figura N° 8:

A) Pesado de agar Muller Hinton para la preparación de medio de cultivo.

B) Preparación de las diluciones al 25%, 50% y 100% del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl.

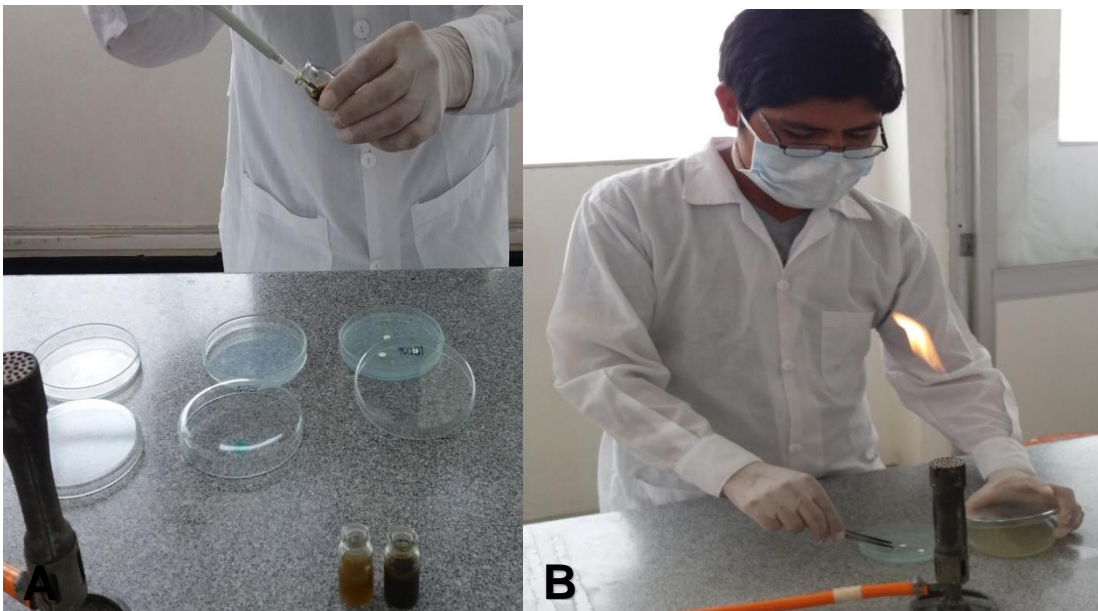


Figura N° 9:

A) Preparación de los discos con las muestras y controles.

B) Aplicaciones de los discos a las placas inoculadas con *Staphylococcus aureus*.

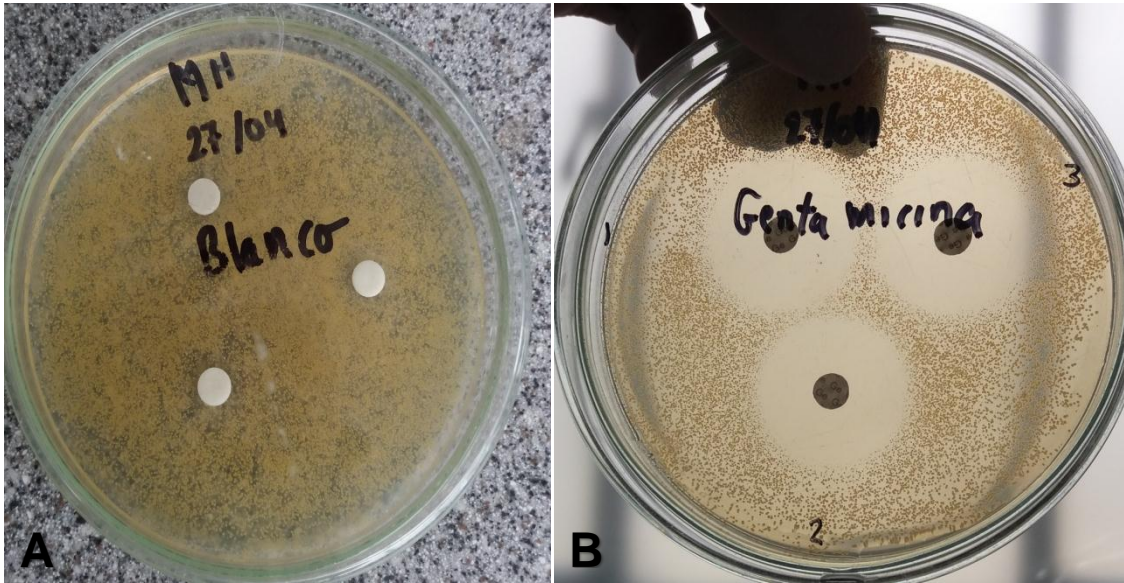


Figura N° 10:

- A) Resultados del control negativo (alcohol etílico 96°). No presentó inhibición. Crecimiento total
- B) Resultados del control positivo (Gentamicina 10ug). Presentó inhibición.

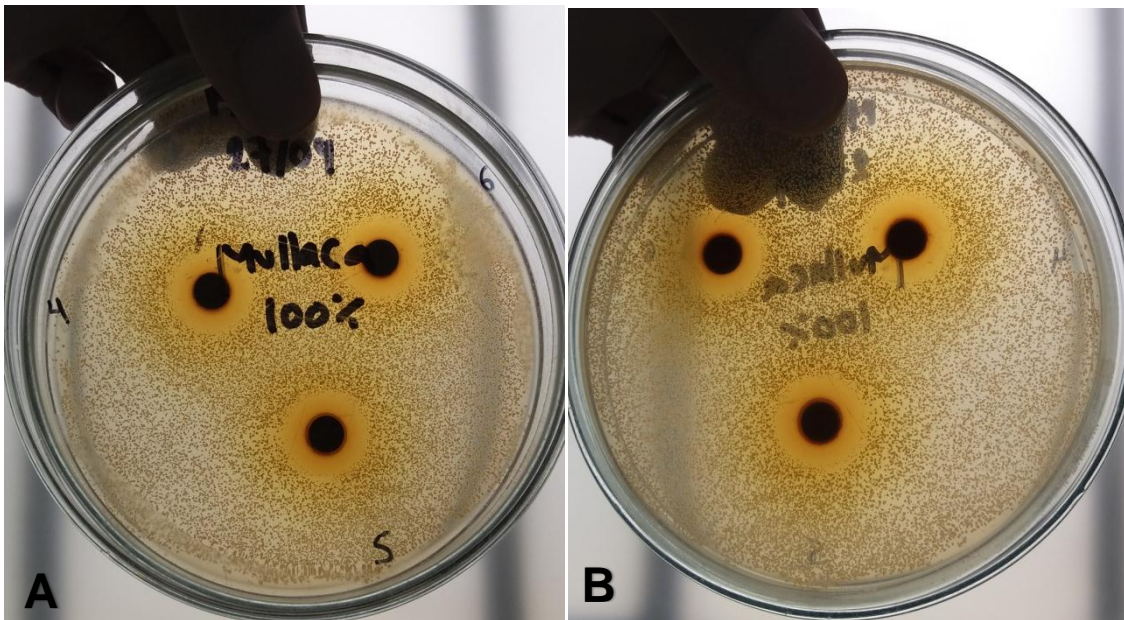


Figura N° 11.

- A y B) Resultados de la dilución al 100% del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca). Presento inhibición

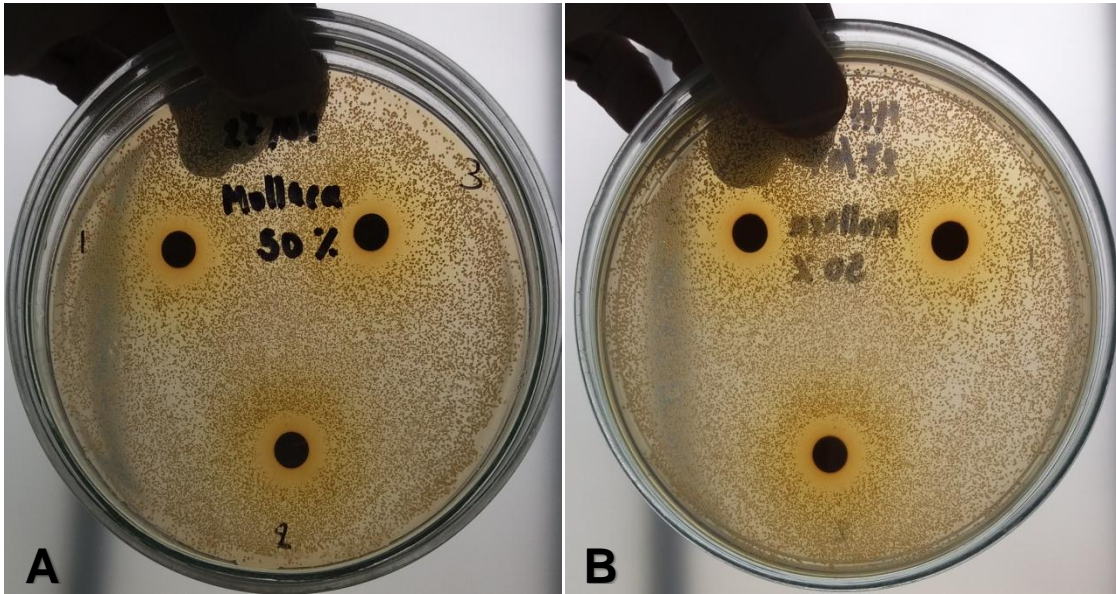


Figura N° 12.

A y B) Resultados de la dilución al 50% del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca). Presento inhibición.

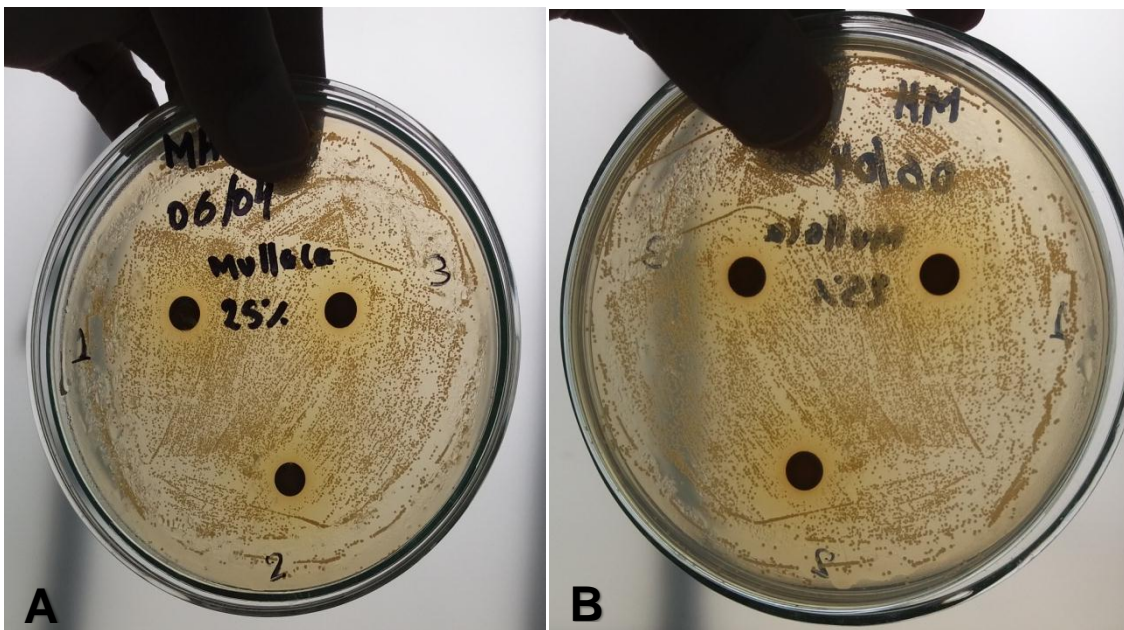


Figura N° 13.

A y B) Resultados de la dilución al 25% del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (Benth.) Endl. (mullaca). Presento inhibición

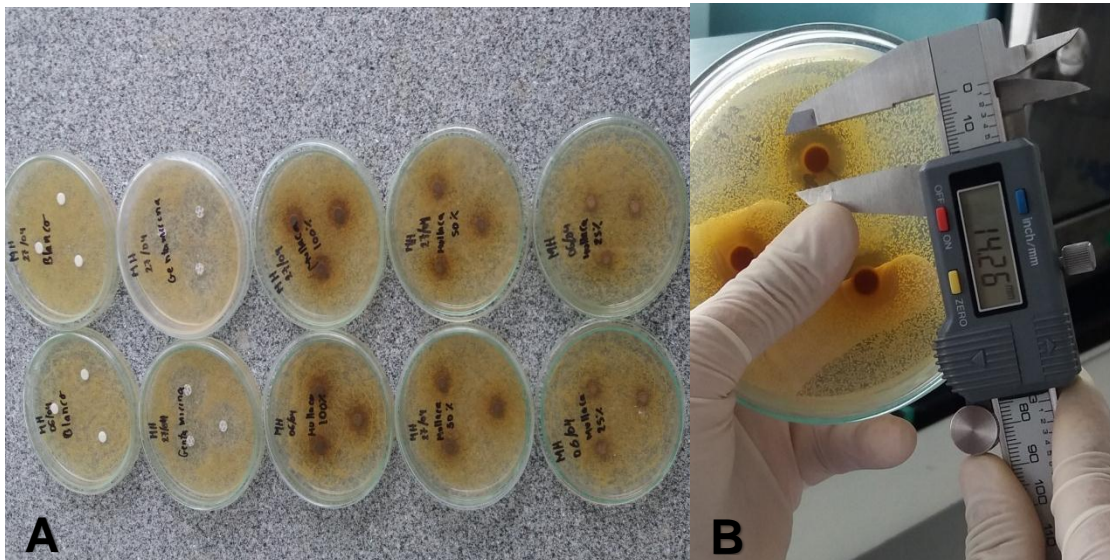


Figura N° 14.

- A)** Resultados del control negativo (alcohol etílico 96°); control positivo (Gentamicina 10ug) y del extracto etanólico al 25%, 50% Y 100% de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica (Benth.) Endl.*
- B)** Medición de halo de inhibición con el vernier.



Figura N° 15. Culminación del proceso.