

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS
HOJAS DE *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua)
SOBRE CEPAS DE *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615”

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico y
Bioquímico

TESISTAS:

Bach. Ginocchio Flores, Galo Narciso

Bach. Pérez Huamán, Rubí Orfelinda

ASESOR:

Mg. Q.F. Muguruza López, Oscar Alberto

Lima – Perú

2019

“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS
HOJAS DE *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua)
SOBRE CEPAS DE *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615”

DEDICATORIA

A Dios por iluminar mi camino para cumplir mis metas y proyectos.

A mi Madre que siempre me da la fuerza para seguir adelante y a mi Padre que desde el cielo ilumina mi camino.

A mi hermana Ruth, que siempre me brinda su apoyo incondicional y a mi familia por confiar y tener fe en mí.

Rubí Pérez

DEDICATORIA

A Dios por iluminar este largo camino, a él con amor.

A mi madre Irene la persona más luchadora y ganadora que he conocido; que supo guiarme y apoyarme en esta etapa de mi vida, este logro es tanto mío como de ella.

Este proyecto está dedicado a mi padre que está en el cielo, ya que me inculcó con amor valores y sueños de superación profesional.

A mi abuela Julia y a todos mis familiares y amigos que apoyaron en esta etapa.

Galo Ginocchio

AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios por permitirnos culminar esta etapa y bendecir nuestros proyectos.

A nuestro Centro de Estudios la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica por la formación académica recibida en los 5 años de carrera universitaria.

A nuestro Asesor Q.F. Oscar Muguruza por su constante apoyo y prestación de atención en nuestro proceso de tesis, gracias a él por guiar este proyecto desde su inicio hasta su culminación.

Al Q.F. Pedro Jacinto por su apoyo en la ejecución del proyecto de Investigación.

A nuestros familiares que estuvieron en todo momento acompañándonos y apoyándonos durante el tiempo que duró este proyecto de investigación.

A nuestras amigas Araceli Alcántara y Priscilla Sichez por su apoyo durante el proceso de investigación.

Rubí y Galo

RESUMEN

El objetivo principal de la investigación fue determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, la muestra vegetal fue recolectada en el centro poblado Porcon Alto, Departamento de Cajamarca. Para la preparación del extracto etanólico se utilizaron las hojas secas, las cuales fueron maceradas con alcohol de 96% al cual se realizó una marcha fitoquímica y se identificaron alcaloides, taninos, compuestos fenoles, triterpenos y esteroides. Para evaluar el efecto antibacteriano se usó la técnica de difusión en agar cilindro - placa, se usó 3 grupos de prueba en las concentraciones al 50%, 75%, 100% y un control (+) bacitracina 0,04mg, con 10 repeticiones en placas de agar sangre, la incubación se realizó con una temperatura de 37°C durante 24 horas. Los resultados fueron expresados según medida de los diámetros de cada halo de inhibición los cuales se procesaron mediante el software estadístico SPSS vs 21, se empleó la prueba de un factor (ANOVA), análisis de Tukey, normalidad según el estadístico de Anderson Darling con un nivel de confianza del 95% ($p < 0.05$). Conclusión, el extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) mostró tener efecto frente a *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

Palabras clave: hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze, efecto antibacteriano, bacitracina, Agar sangre, halo de inhibición.

ABSTRACT

The main objective of the research was to determine the antibacterial effect of the ethanolic extract of the leaves of *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) on strains of *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, the vegetal sample was collected in the town center Porcon Alto, Department of Cajamarca. For the preparation of the ethanolic extract dry leaves were used, which were macerated with 96% alcohol to which a phytochemical march was made and alkaloids, tannins, phenol compounds, triterpenes and steroids were identified. To evaluate the antibacterial effect, the cylinder-plate agar diffusion technique was used, 3 test groups were used in concentrations of 50%, 75%, 100% and a control (+) bacitracin 0.04mg, with 10 repetitions in blood agar plates, the incubation was performed at a temperature of 37 ° C for 24 hours. The results were expressed as measured by the diameters of each inhibition zone, which were processed by the statistical software SPSS vs 21, the one-factor test (ANOVA), Tukey analysis, normality according to the Anderson Darling statistic was used. 95% confidence level ($p < 0.05$). Conclusion, the ethanolic extract of the leaves of *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) showed to have an effect against *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

Key words: *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze leaves, antibacterial effect, bacitracin, blood agar, inhibition halo.

NDICE GENERAL

DEDICATORIA	
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	3
CAPÍTULO I: PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN	5
1.1 Descripción de la realidad problemática	5
1.2. Formulación del problema.....	7
1.2.1. Problema general.....	7
1.2.2. Problemas específicos.....	7
1.3. Objetivos	8
1.3.1. Objetivo General	8
1.3.2. Objetivos específicos	8
1.4. Justificación.....	8
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	10
2.1. Antecedentes del estudio	10
2.1.1. Antecedentes nacionales	10
2.1.2. Antecedentes internacionales.....	11
2.2. Bases teóricas.....	12
2.2.1. <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze	12
2.2.1.1. Descripción botánica.....	12
2.2.1.2. Taxonomía de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze	13
2.2.1.3. Distribución Geográfica.....	13
2.2.1.4. Principio activo	15
2.2.1.5. Propiedades farmacológicas	15
2.2.2. <i>Streptococcus pyogenes</i>	16
2.2.2.1. Descripción	16
2.2.2.2. Hábitat.....	17
2.2.2.3. Taxonomía	17
2.2.2.4. Morfología	18
2.2.2.5. Acción patógena	19
2.2.2.6. Factores en la superficie	19
2.2.2.7. Factores externos	20

2.2.2.8.	Pruebas de laboratorio.....	21
2.2.2.9.	Resistencia antibiótica del <i>Streptococcus pyogenes</i>	22
2.2.2.10.	Tratamiento	23
2.2.4	Extracción	25
2.2.5	Método de difusión en Agar	27
2.2.5.1	Definición	27
2.2.5.2	Método difusión en Agar Cilindro – Placa	27
2.3	Formulación de hipótesis.....	29
2.3.3	Hipótesis General	29
2.3.4	Hipótesis específicas	29
2.4	Variables.....	29
2.4.3	Variable independiente X.....	29
2.4.4	Variable dependiente Y.....	29
2.4.5	Operacionalización de variables	30
2.5	Marco Conceptual	30
CAPÍTULO III: MÉTODO.....		32
3.1.	Tipo del estudio.....	32
3.2.	Diseño a utilizar.....	32
3.3.	Población	32
3.4.	Muestra	33
3.5.	Técnicas e instrumento de recolección de la muestra.....	33
3.5.1.	Técnica de recolección de datos.....	33
3.5.2.	Instrumentos de recolección de datos	33
3.5.3.	Materiales e instrumentos de laboratorio	34
3.5.4.	Equipos.....	34
3.5.5.	Reactivos	35
3.5.6.	Obtención del material vegetal.....	36
3.5.7.	Identificación botánica	36
3.5.8.	Determinación fisicoquímica de la muestra	36
3.5.8.1.	Prueba de solubilidad.....	36
3.5.8.2.	Marcha fitoquímica.....	37
3.5.8.3.	Método de difusión en agar – cilindro – placa para determinar el efecto antibacteriano	38
3.6.	Procesamiento de Datos.....	42
CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS		43

4.1.	Presentación de los resultados	43
4.1.1.	Prueba de Solubilidad.....	43
4.1.2.	Resultados de la Marcha Fitoquímica.....	44
4.1.3.	Análisis Descriptivo.....	45
4.2.	Contrastación de Hipótesis	46
4.2.1.	Hipótesis General:	48
4.2.2.	Hipótesis específicos	50
4.3.	Discusión de resultados	53
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		56
5.1.	Conclusiones.....	56
5.2.	Recomendaciones.....	57
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		58
ANEXOS.....		62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Hábitat de especies de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze.....	14
Tabla 2. Principales grupos de <i>Streptococcus</i> en enfermedades Humanas.....	18
Tabla 3. Operacionalización de variables.....	30
Tabla 4. Reactivos empleados en la Marcha Fitoquímica.....	35
Tabla 5. Solventes para la prueba de Solubilidad.....	37
Tabla 6. Ensayos empleados en la Marcha Fitoquímica.....	38
Tabla 7. Concentraciones del extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze.....	40
Tabla 8. Resultados de la prueba de solubilidad.....	43
Tabla 9. Resultados de la Marcha fitoquímica.....	44
Tabla 10. Grupos de concentraciones del extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze.....	45
Tabla 11. Promedio de las concentraciones del extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) sobre cepas de <i>Sreptococcus pyogenes</i> ATCC19615.....	45
Tabla 12. Tamaño del Halo de inhibición del extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (Pachachamcua).....	46
Tabla 13. Tamaño del Halo de inhibición en mm.....	49
Tabla 14. Contraste de igualdad del tamaño del halo de inhibición en mm.....	49
Tabla 15. Tamaño del Halo de inhibición en la concentración al 50% del Extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (Pachachamcua).....	51

Tabla 16. Tamaño del Halo de inhibición en la concentración al 75% del extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (Pachachamcua).....	51
Tabla 17. Tamaño del Halo de inhibición en la concentración al 100% del extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (Pachachamcua).....	52
Tabla 18. Tamaño del Halo de inhibición de la Bacitracina.....	53

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Planta <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (Pachachamcua).....	13
Figura 2.	Mapa geográfico de la obtención de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze.....	14
Figura 3.	Estructura superficial de <i>Streptococcus pyogenes</i> y sus elementos extracelulares.....	16
Figura 4.	Enfermedades ocasionadas por <i>Streptococcus pyogenes</i>	19
Figura 5.	Cepa de <i>Streptococcus pyogenes</i>	22
Figura 6.	Clasificación de <i>Streptococcus pyogenes</i> ssp. Según el tipo de hemolisis.....	22
Figura 7.	Estructura química de la Bacitracina.....	24
Figura 8.	Mecanismo de acción de la Bacitracina.....	24
Figura 9.	Proceso de Extracción.....	27
Figura 10.	Método difusión en agar cilindro – placa.....	28
Figura 11.	Flujograma del procedimiento experimental.....	42

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N°1	Matriz de consistencia.....	63
ANEXO N°2	Certificación Botánica.....	64
ANEXO N°3	Certificado de la cepa <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615....	65
ANEXO N°4	Protocolo de sangre de ovino.....	66
ANEXO N°5	Obtención y recolección de la muestra vegetal.....	67
ANEXO N°6	Prueba de solubilidad.....	68
ANEXO N°7	Marcha fitoquímica.....	69
ANEXO N°8	Formulación de concentraciones de extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kuntz) Kuntze (Pachachamcua).....	70
ANEXO N°9	Efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kuntz) Kuntze (Pachachamcua) por el método de difusión en agar cilindro – placa.....	71
ANEXO N°10	Lectura de los resultados de los halos de inhibición.....	72
ANEXO N°11	Ficha de validación de instrumentos (Prueba de solubilidad).....	74
ANEXO N°12	Ficha de validación de instrumentos (Marcha Fitoquímica).....	76
ANEXO N°13	Ficha de validación de instrumentos (Análisis Microbiológico)....	78

INTRODUCCIÓN

Desde tiempos lejanos el hombre utilizó las plantas como sustrato principal para la elaboración de fitomedicamentos, bien sea de forma industrial o en preparados tradicionales, con el fin de disminuir la prevalencia de patologías de origen infeccioso, controlar problemas de resistencia de microorganismos y los eventos o efectos indeseados que suelen presentar los mismos¹.

En nuestro país, y en otros países camino al desarrollo, las plantas medicinales son la principal alternativa terapéutica en medicina complementaria y tradicional. La flora que crece en el Perú ofrece variadas e importantes posibilidades para el descubrimiento de nuevos compuestos químicos con actividad antimicrobiana. Se estima que en nuestro país existen unas 25 000 especies de plantas conocidas².

En las últimas décadas, luego de un tiempo donde la industria farmacéutica se centró básicamente en la elaboración de medicamentos de síntesis, dejando de lado las medicinas antiguas que tenían como base variados tipos de extractos derivados de plantas medicinales, existen cambios cualitativos en diversos programas industriales enfocados en la búsqueda de nuevos fármacos de origen herbario².

Actualmente, se vienen desarrollando investigaciones dirigidas al descubrimiento de nuevos componentes con acciones farmacológicas provenientes de origen natural. Múltiples estudios fueron dirigidos hacia la investigación de propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes de la flora medicinal y aromática³.

Los antibacterianos son compuestos que suelen emplearse para combatir diferentes tipos de microorganismos con la finalidad de matar o inhibir el crecimiento de estos; han existido en la naturaleza como mecanismo de evolución, Regulación, y adaptación de las poblaciones microbianas⁴.

Las moléculas antibacterianas componen uno de los grupos Farmacológicos con mayor disposición y demanda en la atención primaria inmediata de la salud. La

elevada demanda de prescripción de estos medicamentos está condicionada por la innegable eficacia en la curación y prevención de infecciones ocasionadas por microorganismos. El consumo indiscriminado de los antibióticos genera efectos no favorables que causan la disminución de su eficacia, dilatación del tiempo estimado de diagnóstico y factores que generan complicaciones poniendo en riesgo la vida de los pacientes que consumen este grupo farmacológico⁵.

El empleo de antibacterianos que promueve la resistencia a bacterias se denomina presión antibiótica, existe variedad de reportes que describen la presencia de cepas resistentes inmediatamente luego que se inicia el uso de un nuevo antibiótico⁴. La OMS sostiene que la resistencia a medicamentos para el tratamiento por infecciones de *Streptococcus pyogenes* es prevalente en los hospitales y la población. Se estima que hay una probabilidad de mortalidad en un 64% en pacientes infectados con cepas resistentes³.

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE LA INVESTIGACIÓN

1.1 Descripción de la realidad problemática

Desde su descubrimiento, los medicamentos antibacterianos constituyen su uso frecuente en tratamiento de diversas patologías infecciosas en la población. Su empleo en la medicina generó la disminución de muchas enfermedades infecciosas. Con el tiempo, su uso inapropiado incrementó las reacciones adversas; dando lugar a la proliferación de microorganismos con resistencia, convirtiéndose en un problema de salud mundial³.

El fenómeno de resistencia bacteriana representa un gran reto para la comunidad científica médica; en pacientes hospitalizados se encuentran variaciones en la frecuencia del uso de fármacos antibacterianos, por ejemplo: Grecia (51,4 %), España (36 %), Brasil (55.4 %), Turquía (30.6 %) y China (77,8 %); estimándose que cerca del 10 al 50 % de la prescripción de antibacterianos son innecesarias. El Centro de Control de enfermedades en los Estados Unidos estima que las complicaciones relacionadas a la resistencia bacteriana suman cada año 4 000 millones y 5 000 millones de dólares a los costos de cuidados de la salud⁶.

En el Perú, varios estudios muestran el uso inapropiado de los fármacos, donde los factores que influyen son la precaria formación profesional de los profesionales sanitarios, con comportamientos que incumplen la normatividad de una correcta prescripción. Recientemente se han publicado los resultados de una encuesta a nivel nacional orientada a integrantes de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica en donde sólo el 40 % de los 78 hospitales encuestados realizaban alguna actividad como

medida programada orientada a mejorar la utilización de antibacterianos en hospitales⁶.

Otro de los factores que causan la resistencia bacteriana en el Perú, son la automedicación no informada del paciente y la incesante promoción comercial que lejos de educar en salud, conlleva a usar irresponsablemente los fármacos.

El Perú cuenta con una variedad de flora medicinal con propiedades curativas, empleadas en la medicina tradicional. Por ello, se vienen desarrollando investigaciones dirigidas al descubrimiento de nuevos componentes con acciones farmacológicas provenientes de origen natural. La mayoría de los estudios están dirigidos hacia la investigación de propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes de la flora medicinal y aromática³.

Las plantas con propiedades medicinales de origen andino se usan para extraer componentes activos esenciales los mismos que son usados en la industria cosmética y farmacéutica basándose en el saber tradicional de los pobladores de la zona y en publicaciones de estudios etnobotánicos. En los estudios de extractos vegetales, se presentan efectos antibacterianos y antimicóticos, entre ellos el *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze conocida popularmente como la Pachachamcua, motivo por el cual esta vez será el punto de partida para esta investigación.

Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze (Pachachamcua), es una planta aromática que pertenece a la familia *Lamiacea*. El *Clinopodium nubigenum* crece entre 3 000 y 4 000 msnm en América Latina, varias comunidades suelen emplearlo como remedio tradicional. Los pobladores de Cajamarca lo usan en infusión para el control de resfriados y en otros casos se aplican una decocción para curar el dolor estomacal.

El estudio de las plantas medicinales peruanas tiene como finalidad poder encontrar una nueva opción para poder actuar contra las diferentes

enfermedades infecciosas y a la vez hacia los microorganismos patógenos que con el transcurrir del tiempo están volviéndose más resistentes hacia los tratamientos de antibióticos. La diversidad de la flora silvestre es capaz de brindar una multiplicidad de metabolitos con actividad biológica. Por ello, mediante la presente investigación se pretende conocer y determinar el efecto antibacteriano *in vitro* del *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) frente a *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

¿El extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) presentará efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615?

1.2.2. Problemas específicos

1. ¿El extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) que grupos de metabolitos secundarios poseerá?
2. ¿Cuál será la concentración de extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) con efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC19615?
3. ¿El efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) será comparable a la Bacitracina 0,04 mg sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC19615?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Determinar si el extracto Etanólico de hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) presenta efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC19615.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Identificar los grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua).
2. Determinar que concentración del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC19615.
3. El extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) tiene efecto antibacteriano comparable a Bacitracina 0,04 mg sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC19615.

1.4. Justificación

En los últimos años el incremento de fármacos antibacterianos destinados a la farmacoterapia de infecciones nosocomiales y de la población, generó la resistencia de diversos microorganismos a los antibióticos, constituyendo un problema mundial de salud pública³. El mal uso de los antibacterianos ha generado un incremento de bacterias resistentes, provocando el aumento de enfermedades infecciosas resistentes.

La presente investigación se enfocó en estudiar el efecto antibacteriano *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, la cual nos permitirá determinar si el extracto etanólico del *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze presenta metabolitos que le darán el efecto antibacteriano.

Con este estudio se podrá dar una alternativa natural para contrarrestar las enfermedades infecciosas, que aquejan a personas de bajos recursos o que se encuentran en zonas alejadas de los Centros de Salud. En especial, a los pacientes pediátricos que con diferentes patologías ameritan el uso de antibacterianos; llegando así a recurrir a un esquema terapéutico saturado de estos medicamentos⁷. La culminación de esta investigación, proporcionará datos de la eficacia de la Pachachamcua como antibacteriano, y así proponer el uso de la medicina tradicional para evitar pacientes pediátricos con resistencia a los antibacterianos.

El Perú es uno de los países que posee una gran variedad de recursos vegetales con propiedades medicinales. Ante la problemática de la resistencia antimicrobiana, diversas entidades de salud buscan urgentes alternativas terapéuticas innovadoras en el campo farmacológico⁸. Por ello, el rol de los Químicos Farmacéuticos deberá centrarse en estudiar los beneficios terapéuticos de las plantas medicinales para obtener propiedades, que se deban a metabolitos. El Químico Farmacéutico actualmente no tiene participación continua en el área de la investigación de plantas medicinales. Esta investigación deberá a guiar a la profesión a realizar investigaciones *in vitro* de las plantas medicinales, para encontrar nueva información evitando el uso irracional del medicamento, interacciones medicamentosas y/o resistencia antimicrobiana.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

2.1.1. Antecedentes nacionales

Neira J. (2018)⁹ en su investigación titulada “**Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de las plantas medicinales utilizadas por los pobladores de Tuctumpaya, Quequeña y Chiguata, frente a bacterias gram positivas: *Staphylococcus aureus* – *Streptococcus pneumoniae* causantes de infecciones de importancia médica, Arequipa – Perú 2017.**” El principal objetivo fue determinar el efecto antimicrobiano de los extractos etanólicos de cuatro especies vegetales dentro de ellas el *Clinopodium bolivianum* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* mediante la técnica de Kirby Bauer y se logró demostrar que todos los extractos poseen efecto antimicrobiano a una concentración de 30 mg/mL de solvente.

Polo M. (2018)¹⁰ en su investigación titulada “**Actividad antibacteriana de especies vegetales procedentes del distrito de Cachicadan, Provincia de Santiago de Chuco, Región la Libertad**” donde fueron estudiadas cinco especies vegetales dentro de ellas el *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts sobre cepas de *Bacillus subtilis*, *E. Coli*, y *Staphylococcus aureus* resistente a meticulosa (SARM). Polo M. empleó etanol de 45°gL al 10% como solvente para su extracción alcohólica, para determinar la actividad antibacteriana se evaluó mediante la relación de la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida (CMB/CMI), donde el CMI se realizó por el método de la microdilución en medio Mueller-Hinton y la determinación de CMB por el método de difusión en agar, donde los resultados de CMI de las cinco especies en estudio frente a las cuatro cepas

bacteriológicas están comprendidas entre 0,31 a 40 mg/mL y para CMB está entre los rangos de 0,63 a 40 mg/mL. Concluyendo así que la especie vegetal *Clinopodium puchellum* (kunth) Govaerts tiene buena actividad antibacteriana frente a las cuatro cepas.

Bamberger K, Collave S. (2010)¹¹, en la investigación titulada “**Efecto de los extractos de las hojas de *Clinopodium taxifolium* “Chinininga” frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae in vitro*”**, el objetivo fue determinar el efecto antibacteriano del extracto de hojas de *Clinopodium taxifolium* frente a *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*. En este estudio usaron el método modificado de difusión de Kirby Bauer donde realizaron pequeños hoyuelos de 3 mm de diámetro, en el cual se añadieron 10, 20, 30 y 40 ul del extracto *Clinopodium taxifolium*, se realizaron cuatro ensayos por cada uno de los extractos para ambas bacterias, transcurrido las 24 horas procedieron a medir el halo de inhibición, observando los resultados siguientes, el extracto hexánico presentó halo de inhibición de 12 a 18 mm en ambas bacterias, el extracto etanólico presentó halos de inhibición de 10 a 12 mm y el extracto acuoso de 9 a 11 mm, concluyendo que a medida que aumentó la concentración de los extractos el efecto fue mayor sobre *Clinopodium taxifolium* presentando una buena actividad antibacteriana para la cepa de *Klebsiella pneumoniae*.

2.1.2. Antecedentes internacionales

Palacios L. (2016)¹², en su investigación titulada: “**Estudio Fitoquímico y Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las especies vegetales *Bidens odorata* y *Clinopodium procumbens* procedentes de los Estados de Hidalgo y Puebla**”. El objetivo fue determinar la actividad antimicrobiana de *Bidens odorata* y *Clinopodium procumbens* contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, para ello emplearon una maceración de las plantas con diferentes solventes de diversas polaridades, para el análisis microbiológico se tomó una muestra representativa de 20mg de cada extracto, se colocó en

un medio de cultivo de Miuller – Hilton, donde el *Clinopodium procumbens*, donde presento una mayor actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* con un CMI 300µg /mL.

Claro Paz M. (2006)¹³ en su proyecto de investigación titulado “**Determinación de la actividad Anti-Helicobacter pylori de *Plantago major* (llantén), *Verbena officinalis* (verbena), *Clinopodium bolivianum* (khoa), *Caléndula officinalis* (caléndula), *Piper angustifolium* (matico) y *Rubus boliviensis* (khari khari) por el método de difusión de disco**” busca demostrar el efecto antibacteriano de diversas especies vegetales entre ellas *Clinopodium bolivianum* frente a cepas de *Helicobacter pylori* de origen clínico, usaron el método de difusión en discos preparando dos tipos de extractos, uno hidroalcoholico y otro diclorometanico y uno acuoso por métodos de infusión, usaron a la tetraciclina como control positivo y el solvente de extracción como control negativo; su investigación arrojó que todas las especies utilizadas (excepto *Plantago major* y *Rubus boliviensis*) tuvieron actividad sobre la cepa en estudio, siendo el *Clinopodium bolivianum* y *Piper angustifolium* las de mayor actividad inhibitoria llegando al nivel de confianza de 99%.

2.2. Bases teóricas

2.2.1. *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze

2.2.1.1. Descripción botánica

Planta herbácea, vascular, aromática y rastrera, alcanza 15 cm como altura máxima, Su raíz es pivotante y fibrosa. Presenta tallo con ramificaciones variadas y de color café rojizo. Presenta hojas de forma oval lanceoladas simple y opuesta, base ligeramente truncada, suelen medir de largo hasta 4 mm. Sus flores son zigomorfas y labiadas, miden de 3 a 5 mm, sus 5 sépalos son de color verde al igual que sus 5 pétalos. Su fruto es seco indehiscente y tetraquenio¹⁴.

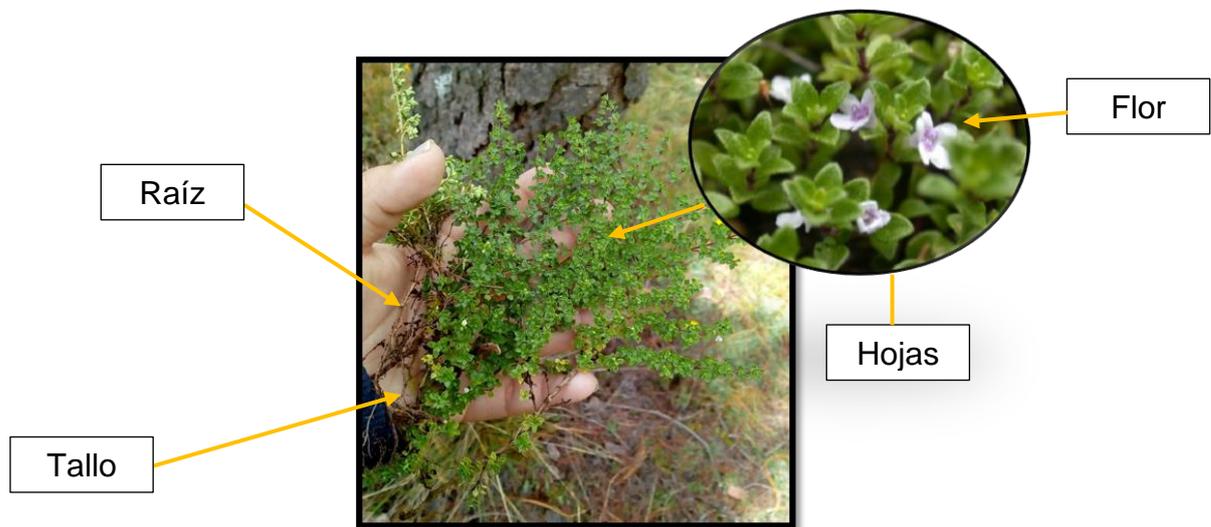


Figura 1. Planta *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua)

Fuente: elaboración propia 2019

2.2.1.2. Taxonomía de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze

Reino: Vegetal

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Clinopodium*

Especie: *Clinopodium nubigenum*
(Kunth) Kuntze

Nombre Científico: *Clinopodium nubigenum*

Nombre Común: Pachachamcua (Cajamarca), Sunfo (Ecuador).

2.2.1.3. Distribución Geográfica

El *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze, es una especie vegetal aromática, la podemos ubicar en las cordilleras andinas de países como Panamá, Costa Rica, Colombia, Ecuador, Venezuela y Perú, se ubican en rangos altitudinales que oscilan entre los 3 500 a 4 500 msnm.

En Perú, crece en bosque tropical. Clima seco, valles interandinos, matorral seco de piedra arsénica, a modo de pendientes pronunciadas de roca caliza; entre altitudes de 1 500 – 3 600 metros como: Cajamarca¹⁵.

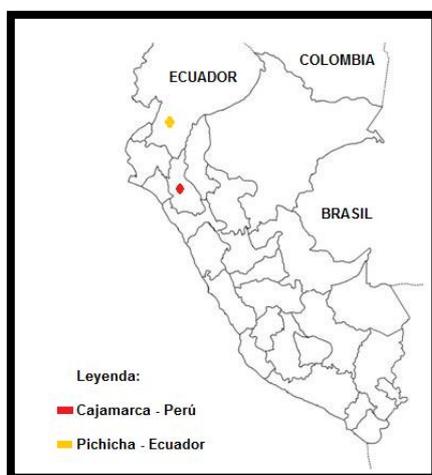


Figura 2. Mapa geográfico de la obtención del *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze

Fuente: elaboración propia 2019

Tabla 1. Hábitat de especies de *Clinopodium* estudiadas

ESPECIE	HÁBITAT
<i>Clinopodium acinos</i>	En gran parte del norte de África, y Europa hasta Turquía.
<i>Clinopodium brownei</i>	Costa del Golfo de México en México y los Estados Unidos, específicamente de Texas a través de la Florida
<i>Clinopodium grandiflorum</i>	Es natural de Europa
<i>Clinopodium menthifolium subsp</i>	En gran parte de Europa, con excepción de Turquía, Finlandia, Irlanda, Suecia, Noruega y Dinamarca. También en el norte de África.
<i>Clinopodium multiflorum</i>	Chile
<i>Clinopodium nepeta</i>	Norte de África
<i>Clinopodium vulgare</i>	Europa
<i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze	Ecuador y Perú

Fuente: elaboración propia 2019

2.2.1.4. Principio activo ¹⁶

Los principios activos que contiene el *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) son: los alcaloides, almidón, taninos, flavonoides, aceites esenciales, triterpenos y esteroides presentando cada uno de ellos diversas propiedades farmacológicas.

Las características de importancia en el uso medicinal del *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze se le pueden atribuir a la presencia de los siguientes compuestos: los flavonoides, son los responsables de brindar a la planta propiedades antioxidantes, antitrombótico, combaten fragilidad capilar, protegen al hígado y estómago, le dan a la planta capacidad antibacteriana, antiinflamatoria y analgésica.

Los terpenos y esteroides conjuntamente con los taninos son los responsables del sabor amargo que caracteriza a la planta, los terpenos se comercializan con frecuencia para brindar el aroma, fragancia en alimentación y cosmética, en el campo medicinal tiene propiedades antiulcerosas, anticarcinogénicas y antimicrobianas.

Así mismo se le atribuye la acción sedante y analgésico a la presencia de alcaloides.

2.2.1.5. Propiedades farmacológicas¹⁶

El *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) ha sido utilizado desde tiempos remotos, por sus bondades terapéuticas de importancia tales como: analgésico, antiemético, digestiva, antiinflamatorio, antiespasmódica, antidisentérica, antioxidante, fortificante, antibacterial, calmante, y expectorante.

Además, se suele usar en hemorragias, úlceras bucales, reumas, control antiséptico, dolores menstruales y de garganta, el uso etnomédico que se le atribuye en esta región es para el control de dientes.

2.2.2. *Streptococcus pyogenes*

2.2.2.1. Descripción

Streptococcus pyogenes, es considerada como una cepa importante dentro del género *Streptococcus*. Esta cepa bacteriana es la que origina en mayor porcentaje la faringitis además de infecciones al tejido epitelial. Uno de los mayores problemas ocasionados por esta cepa son las consecuencias post-streptococcicas que no generan purulencia, las cuales son: la Glomerulonefritis y la Fiebre Reumática; las cuales se consideran graves ya que se les considera responsables de causar la muerte¹⁷.

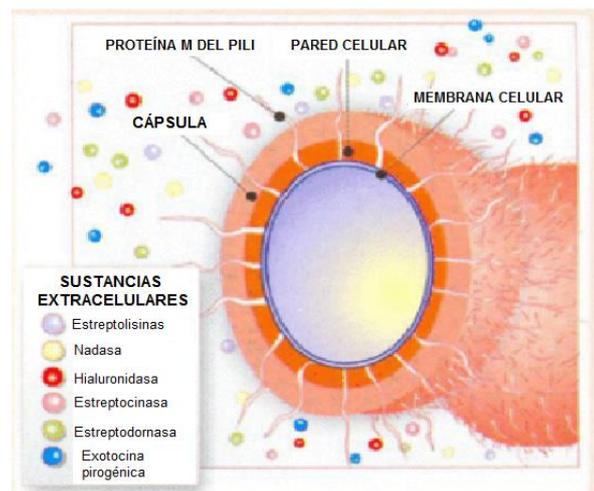


Figura 3. Estructura superficial del *Streptococcus pyogenes* y sus elementos extracelulares.

Fuente: Microbiología médica, 6e 2017

2.2.2.2. Hábitat

El hábitat del *Streptococcus pyogenes*, son la mucosa y piel del ser humano. Así mismo se pueden encontrar en el polvo, ropa, muebles, en objetos inanimados pueden sobrevivir 4 semanas¹⁷.

2.2.2.3. Taxonomía

La primera clasificación que se le dio a los estreptococos fue según la presencia de hemólisis y el tipo de hemólisis que presentan en agar sangre. Se denominó β -hemolíticos, cuando sus colonias quedan cercadas o rodeadas por un halo de color tenue, sitio que muestra que los hematíes se han lisado en su totalidad; se denominó α -hemolíticos, cuando la hemólisis no es completa y en el medio de cultivo se observa una tonalidad verdosa, por último los γ -hemolíticos, los cuales no presentan en el medio un de halo de hemólisis. Tiempo después, Rebecca Lancefield (1895-1981) plasmó sus conocidos estudios sobre carbohidratos antigénicos en extractos de pared de estreptococos β - hemolíticos. Con su estudio consiguió definir diferentes grupos serológicos, identificados de la A a la H y de la K hasta la V. De todos estos los grupos A, B, C, D y G son los que se aíslan con mayor frecuencia del ser humano. En el caso de *Streptococcus pyogenes* corresponde al grupo serológico A debido a su naturaleza β -hemolítica¹⁸.

Tabla 2. Principales Grupos Serológicos de *Streptococcus* en enfermedad humana

Serogrupo	Antígeno específico de la pared celular	Aspectos clínicos
A	Ramnosa-N-acetil-glucosamina	Erisipela, Faringitis, impétigo, amigdalitis, escarlatina, celulitis, secuelas no supurativas: glomerulonefritis y fiebre reumática.
B	Ramnosa-glucosamina	Meningitis neonatal, Corioamnionitis, sepsis puerperal y neonatal.
C	Ramnosa-N-acetil-galactosamina	Infecciones del tracto respiratorio alto.
D	Acido glicerol teicoico	Infecciones genitourinarias, endocarditis, heridas.
G	Ramnosa-galactosamina	Celulitis, sepsis, infecciones respiratorias altas

Fuente: elaboración propia 2019

2.2.2.4. Morfología

El *Streptococcus pyogenes*, son cocos Gram (+) que se aglomeran en pares o en ramificaciones, son rigurosos en cuanto a su crecimiento, cuando el cultivo se realiza en Agar sangre las cepas bacterianas forman colonias de coloración blanca a grisácea, englobadas en una zona de hemólisis completa (β) provocada por el trabajo de la estreptolisina S y estreptolisina O. El *Streptococcus pyogenes* al igual que todos los Gram (+) gozan de una pared celular gruesa compuesta de peptidoglicanos, lo que les permite mantener la rigidez y consistencia en su estructura. En la pared celular bacteriana se localiza el antígeno específico para el Grupo A, compuesto de un polímero de ramnosa y N-acetilglucosamina. Tienen en sobre su estructura a la proteína

M, la cual es un elemento influyente de virulencia. Otro componente estructural de superficie es el ácido lipoteicoico, que intercede en las etapas iniciales de la colonización del huésped. Además, esta bacteria está cubierta por una cápsula de ácido hialurónico, que funciona como mecanismo protector para repeler las defensas del huésped¹⁷.

2.2.2.5. Acción patógena

El *Streptococcus pyogenes*, es causante de infecciones leves como la faringitis en un 20% a 30% de los casos, así mismo también causa infecciones graves como sepsis, fascitis necrotizante y la enfermedad estreptocócica invasiva¹⁷.

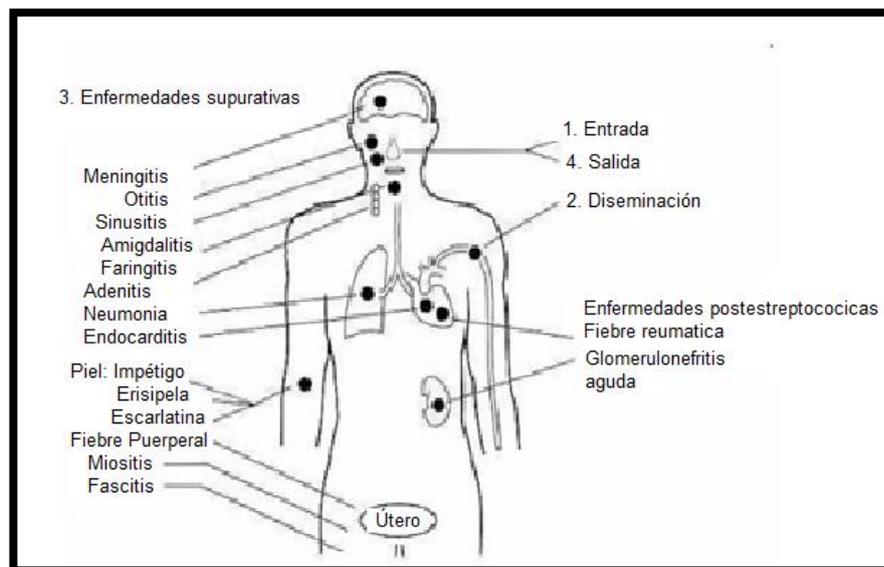


Figura 4. Enfermedades ocasionadas por *Streptococcus pyogenes*.

Fuente: Microbiología médica, 27e 2016

2.2.2.6. Factores en la superficie ¹⁸

- **Cápsula:** Su cápsula está compuesta por Ácido Hialurónico. Poseen una cápsula de ácido hialurónico difusa que actúa como respuesta evasiva de su sistema inmune con la fusión del complemento C3b.

- **Ácido lipoteicoico:** El motivo primordial para que se dé la infección por *Streptococcus pyogenes* es la colonización al epitelio de la faringe siendo uno de los sitios más comunes para esta infección. La unión específica se da en el extremo flicolipídico del ácido lipoteicoico de la pared celular bacteriana, uniéndose a la fibronectina, la cual actúa como receptor en el huésped. Luego de la adherencia, colonización y multiplicación se genera el daño epitelial.
- **Proteína M:** Esta proteína es el elemento primordial de la virulencia, la proteína M cuenta con una estructura espiralada en la cual su extremo carboxiterminal está cubierto de peptidoglicano presente en la pared celular, cuya función principal es asegurar la infección, permitiendo al estreptococo oponer resistencia frente a la fagocitosis generada por los leucocitos humanos.
- **Factor H:** Este elemento es favorable a C3b a la degradación, originado por vía alterna. Como resultado previene la opsonización de la bacteria por el C3b.
- **Proteasa C5a.:** Se encarga de degradar al C5a. estimulando la respuesta bactericida oxidativa. Es un elemento primordial de virulencia.

2.2.2.7. Factores externos ¹⁸

- **Estreptoquinasa:** Esta enzima se encarga de provocar la lisis de los coágulos de fibrina por acción indirecta, también promueve la formación de anticuerpos durante el proceso de infección.
- **Hialuronidasa:** Degrada al ácido hialurónico, esta enzima es la encargada de promover el pasaje de la bacteria entre los tejidos.
- **Estreptolisina O:** Es la enzima causante de la hemólisis en el Agar sangre, es antigénica y oxígeno-lábil. Actúa en la lisis de leucocitos, células tisulares y plaquetas.

- **Estreptolisina S:** Participa de manera principal, juega un papel importante en la generación del deterioro del tejido.
- **Exotoxina pirogenica estreptococcia (Spe):** Se encarga de la aparición de los brotes cutáneos en la escarlatina.

2.2.2.8. Pruebas de laboratorio¹⁹

- **Prueba de Detección Rápida (PDR):** Las pruebas en la Faringo amigdalitis Aguda se aplican para aseverar que la infección es ocasionada por *Streptococcus pyogenes* o *estreptococo betahemolítico* Grupo A (EBHGA) y recetar antibióticos de manera inmediata; en caso de ser positivas sin necesidad de esperar al resultado del cultivo de la exudación faríngea, que es la prueba más exacta que se considera para el diagnóstico.

Estas pruebas, cuya aplicación es de manera sencilla, es considerada de rutina para cualquier consulta y servicio de urgencia, consiste en la localización del carbohidrato específico del *estreptococo betahemolítico* Grupo A, después de su extracción mediante procesos químicos o enzimáticos, directamente del exudado faríngeo o amigdalar extraído con un trozo de algodón o hisopo. El diagnóstico se realiza en 15 a 60 minutos.

- **Cultivo y aislamiento:** para obtener un crecimiento bacteriano de *Streptococcus pyogenes* debe estar a una temperatura de 35 a 37° C por 24 horas.

El agar sangre es el medio predilecto para el crecimiento de *Streptococcus pyogenes*, es gracias a ese medio que ocurren los tres tipos de hemólisis:

- **Alfa hemólisis:** es la lisis parcial de los eritrocitos.
- **Beta hemólisis:** es la lisis completa de los eritrocitos.
- **Gama hemólisis:** son colonias que no muestran hemólisis.



Figura 5. Cepa de *Streptococcus pyogenes*

Fuente: elaboracion propia 2019

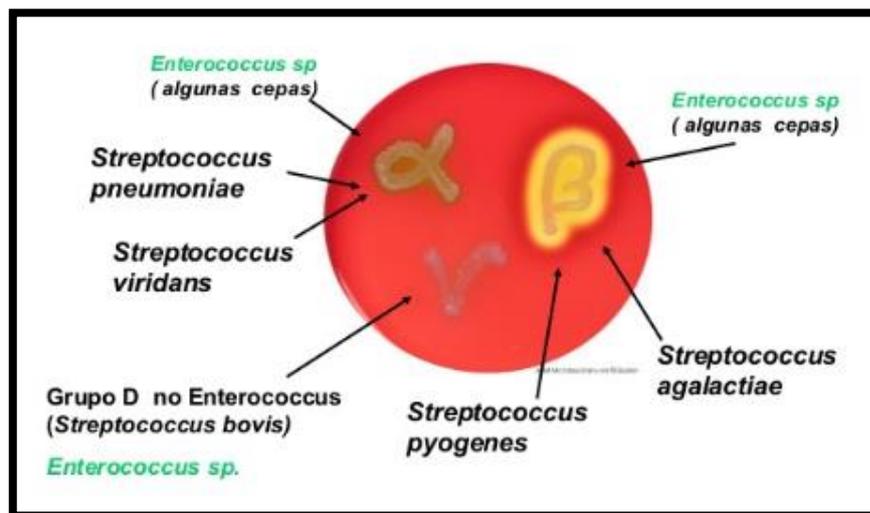


Figura 6. Clasificación de *Streptococcus ssp.* Según el tipo de hemolisis.

Fuente: Microbiología médica, 6e 2017

2.2.2.9. Resistencia antibiótica del *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes, ha demostrado resistencia a macrólidos por 2 mecanismos: el primero se relaciona con la enzima metilasa codificada por genes erm(B) o erm(A) el cual se relaciona con resistencia a los macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (fenotipo MLSB), el segundo mecanismo se vincula con una bomba de flujo externo codificada por el gen mef(A). Este

último conlleva a resistencia a los macrólidos mientras se mantiene la sensibilidad a clindamicina y a estreptogramina B (fenotipo M) ²⁰.

2.2.2.10. Tratamiento²⁰

Streptococcus pyogenes presenta una elevada sensibilidad a penicilina. Puede utilizarse la eritromicina o una cefalosporina vía oral en aquellas personas que presenten alergias a la penicilina, aunque el tratamiento mencionado puede resultar poco o nada eficaz contra infecciones combinadas con *Staphylococcus aureus*, en cuyo tratamiento puede abarcar otros fármacos como la vancomicina o oxacilina. La eritromicina presenta mayor eficacia que la que presentan otros macrólidos como la azitromicina y claritromicina. En pacientes que presentan complicación severa de tejidos blandos, deberá emplearse el desbridamiento o drenaje quirúrgico.

El tratamiento con antibióticos para las personas que padecen faringitis acelera la recuperación de los síntomas y evita que desarrolle fiebre reumática cuando se reconstituye durante los 10 primeros días de haberse iniciado la enfermedad. No hay señales de que el tratamiento evite o inhiba la progresión de la glomerulonefritis aguda.

2.2.3. Bacitracina²¹

Es un antibiótico obtenido a partir de polipéptidos cíclicos (bacitracina A, B y C), producidos por cepas de *Bacillus licheniformis* o *subtilis* que presenta actividad frente a bacterias gram+ inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana.

2.2.3.2 Uso clínico

Su uso clínico es de preferencia por vía tópica debido a la nefrotoxicidad que causa, está indicado en la terapéutica de infecciones óticas, oftálmicas, de piel y mucosa oral; así como también en la prevención de infecciones bacterianas en heridas abiertas. En cuanto a su uso por vía sistémica está indicada en el tratamiento de empiema y neumonía causada por estafilococos, como se mencionó debido a su toxicidad a nivel de nefronas se debe limitar a situaciones en que otros antibióticos menos nefrotóxicos sean ineficaces. Se le suele combinar con otro tipo de antibióticos tales como gramacidina, polimixina B; así como también con corticoides como prednisona, dexametasona e hidrocortisona y con preparados de zinc.²²

2.2.3.3 Efectos secundarios

- Cardiovasculares: Sensación de opresión en el tórax, hipotensión.
- Sistema nervioso central: Se manifiesta con dolor.
- Dermatológicas: prurito, edema de cara y labios, exantema.
- Gastrointestinales: Vómitos, náuseas, diarrea, anorexia, prurito y ardor rectal
- Hematológicas: discrasias sanguíneas.
- Renales: IM: necrosis tubular y glomerular; azoemia, insuficiencia renal.

Las mínimas concentraciones absorbidas por vía tópica se excretan por los riñones.²²

2.2.4 Extracción

2.2.4.1 Extracción por Maceración²³

Se conoce como maceración a la exposición durante un tiempo prolongado y considerable de la droga frente al solvente, el cual constituye un conjunto de mezcla homogénea, el líquido solvente actúa

simultáneamente sobre las diversas proporciones de la droga, circula a través de esta todas las direcciones y sentidos, disuelve las moléculas de sus principios activos hasta obtener una concentración en equilibrio con la del contenido celular; en otras palabras, la maceración es el proceso de extracción entre una matriz sólida (droga) y un líquido (solvente) en el cual el solvente se encargará de extraer las moléculas solubles que se deseen obtener de la droga vegetal.

2.2.4.2 Extracción Hidroalcohólica

Este tipo de extracción se lleva a cabo con el etanol como disolvente orgánico, que penetra y disuelve las sustancias presentes en la muestra vegetal.²³

2.2.4.3 Extracción Sólido – Líquido

Se basa en la extracción de metabolitos a través de una muestra sólida pulverizada donde se extrae los metabolitos con la ayuda de disolventes de origen orgánico en el cual sean solubles, que los diferencie de las sustancias presentes en la matriz, comúnmente se somete a centrifugación tras la extracción para eliminar los sólidos que hayan podido quedar.²³

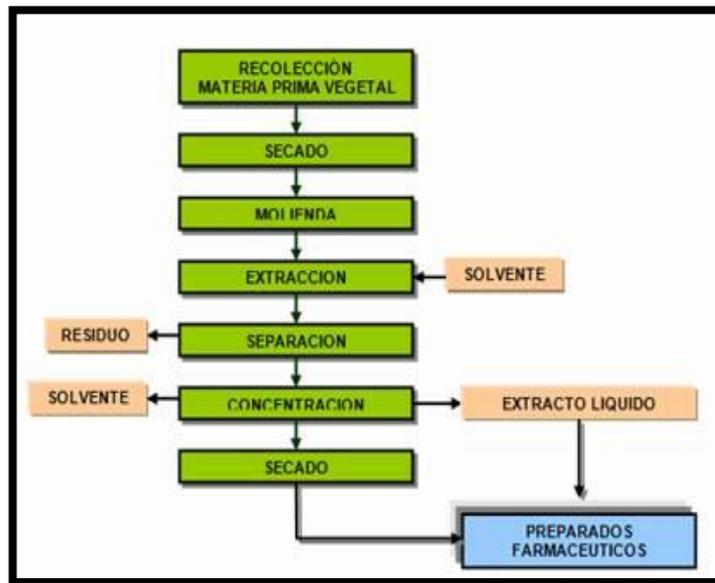


Figura 9. Proceso para la obtención de un extracto sólido a través de un disolvente líquido

Fuente: Monografía de Obtención de extractos a partir de plantas medicinales

2.2.5 Método de difusión en Agar

2.2.5.1 Definición

Este método permite probar la eficacia de una solución de extracto o un antibiótico específico en la superficie de placa de agar donde se realiza la siembra de una suspensión bacteriana calibrada, se puede emplear discos de papel filtro, pozo y cilindros²⁴.

2.2.5.2 Método difusión en Agar Cilindro – Placa

Se fundamenta este método en la difusión del extracto o antibiótico desde un cilindro metálico vertical sobre una superficie de solución Agar solidificada en placa Petri previamente inoculada con el microorganismo en estudio hasta lograr la inhibición total del microorganismo inoculado en la zona de inhibición que puede mostrar un área circular alrededor del cilindro con el extracto o antibiótico. Los halos de inhibición serán directamente proporcionales a la cantidad de extracto o antibiótico añadido al cilindro metálico. Para esta técnica se necesita que el agar esté solidificado en una placa Petri para la colocación del cilindro metálico y a su vez debe estar a una temperatura compatible con la viabilidad microbiana que es a 42°C – 45°C.

El procedimiento que se emplea para este método consiste en colocar el medio empleado en las placas Petri de 100 x 20 mm que pueden contener una capa de base del medio sin inocular ya gelificado, luego se procede a inocular con la bacteria que se desea estudiar, para luego colocar los cilindros para dispensar la solución patrón y la muestra, así mismo la distribución de cada uno dependerá del diseño de ensayo microbiológico, las placas finalmente se incuban en condiciones establecidas según el microorganismo empleado. Luego del periodo en que se llevó a incubación se procede hacer la lectura de los halos de inhibición que se notará alrededor de cada cilindro, el tamaño de la zona queda efectuado por la sensibilidad de cada microorganismo que se estudie, su estado fisiológico y número de células viables. También existirán factores como las condiciones de incubación, la concentración de la muestra y el espesor del medio de cultivo ya que estos factores pueden modificar en gran magnitud la respuesta de la sustancia a evaluar.²⁸

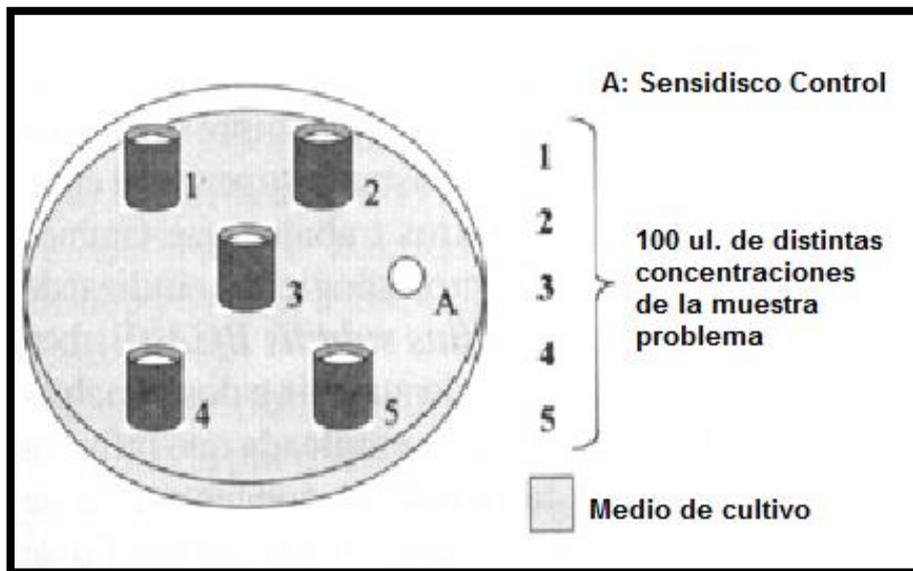


Figura 10. Método difusión en agar cilindro – placa

Fuente: Avances en medicina veterinaria, vol. 1

2.3 Formulación de hipótesis

2.3.3 Hipótesis General

El extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC19615.

2.3.4 Hipótesis específicas

1. Existen grupos de metabolitos secundarios en el extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) como posibles responsables del efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.
2. Existe una concentración óptima del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze con efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC19615.
3. Existe efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) comparable con la Bacitracina 0,04 mg sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

2.4 Variables

2.4.3 Variable independiente X

Extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze.

2.4.4 Variable dependiente Y

Efecto antibacteriano frente a cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

2.4.5 Operacionalización de variables

Tabla3 Operacionalización de variables

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES
V1: INDEPENDIENTE EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (Pachachamcua)	Prueba de Solubilidad	<ul style="list-style-type: none"> • Muy soluble (++++) • Poco soluble (++) • Débilmente soluble (+) • Insoluble (-)
	Marcha Fitoquímica	<ul style="list-style-type: none"> • Alcaloides • Triterpenos/esteroides • Carbohidratos • Almidones y polisacáridos • Azúcares reductores • Aminoácidos y proteínas • Compuestos Fenoles • Taninos
V2: DEPENDIENTE EFECTO ANTIBACTERIANO FRENTE A LAS CEPAS DE <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Concentración del extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze.	<ul style="list-style-type: none"> • 50% • 75% • 100%
	Método de Difusión en Agar cilindro – placa	Distancia de halo de inhibición con relación al desplazamiento de la bacteria y el punto de siembra de la muestra de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (Pachachamcua)

Fuente: elaboración propia 2019

2.5 Marco Conceptual

- **Agar – Sangre:** Medio de cultivo altamente nutritivo adecuado para el cultivo de diversos microorganismos²⁶.
- **Antibiótico:** Subgrupo de fármacos con actividad antibacteriana²¹.
- **Cepa:** Cultivo formado por microorganismos de tipo fenotípicos provenientes de una porción derivada de un organismo mayor²⁸

- **Disco de sensibilidad:** Son discos impregnados de un antibiótico específico que es utilizado para realizar pruebas de sensibilidad por el método de difusión en agar²⁷.
- **Efecto antibacteriano *in vitro*:** Es la propiedad para eliminar bacterias inoculadas en condiciones controladas y estandarizadas dentro de un laboratorio²⁷.
- **Extracción etanólica:** Se le conoce al extracto obtenido de un vegetal previamente disecado, cuyo proceso se realiza a partir de la maceración o percolación de la materia prima vegetal, utilizando como solvente el etanol²³.
- **Halo de inhibición:** Zona circular que ha sido inhibida por el agente antibacteriano²⁸.
- **Incubación:** Proceso de que facilita el crecimiento antibacteriano que debe contar con una temperatura óptima²⁴.
- **Patogenicidad:** Parte de la patología que estudia cómo se originan y desarrollan las enfermedades²⁹.
- ***Streptococcus*:** Son bacterias grampositivas de forma redondeada agrupadas en cadenas, pueden ser aerobios o anaerobios, no presentan flagelos pero si desarrollan fimbrias, existen alrededor de 20 especies siendo el *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 junto al *pneumoniae* unas de las más patógenas para el ser humano³¹.

CAPÍTULO III: MÉTODO

3.1. Tipo del estudio

- **Experimental:** Debido a que se empleó métodos y técnicas de laboratorio para determinar el efecto antibacteriano del recurso vegetal en forma aleatoria.
- **Transversal:** El estudio fue realizado en un periodo de tiempo determinado y las variables se midieron una sola vez, en nuestro caso al cabo de 24 horas de haber realizado el estudio microbiológico.
- **Prospectivo:** Los datos fueron recolectados de acuerdo al momento del experimento.

3.2. Diseño a utilizar

Experimental *in vitro*: Por la manipulación de la variable independiente en forma aleatoria, con el fin de obtener datos, fenómenos y consecuencias sobre un posible evento en particular.

3.3. Población

- **Población vegetal:** 30 plantas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) recolectada en un perímetro de 6m x 6m situado (7°04'06.8" S y 78°35'49.5 W) en el distrito de Porcón alto, departamento de Cajamarca provincia de Cajamarca.

- **Población microbiana:** Cepas estandarizadas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, obtenidas del área de microbiología del Instituto Nacional de Salud del Niño.

3.4. Muestra

- **Muestra vegetal:** 3 kilogramos de hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze, obtenidas en un perímetro determinado (6m x 6m), de un campo ubicado en el distrito de Porcón alto, departamento de Cajamarca provincia de Cajamarca.
- **Muestra microbiana:** Cepas de *Streptococcus pyogenes* de tipo ATCC 19615 cultivadas en placas Petri de Agar Sangre preparado en laboratorio con Agar Base más sangre de ovino certificada por el Instituto Nacional de Salud del Perú.

3.5. Técnicas e instrumento de recolección de la muestra

3.5.1. Técnica de recolección de datos

Se realizó una técnica de recolección de observación estructurada, en vista que la investigación es de tipo prospectiva y experimental.

3.5.2. Instrumentos de recolección de datos

Los instrumentos usados para recolectar datos fueron fichas de observación, diseñadas para cumplir la hipótesis de la tesis. Este instrumento fue revisado y evaluado mediante juicio de experto, con el fin de garantizar los criterios de validez, precisión y confiabilidad.

Las fichas de observación son:

- Prueba de solubilidad
- Marcha fitoquímica
- Efecto antibacteriano

Se realizó la interpretación de los resultados de los halos de inhibición obtenidos, con los parámetros de la escala de Duraffourd y Lapraz, útil para establecer la sensibilidad de un microorganismo patógeno frente a la acción de antibacterianos en un ensayo *in vitro*

- (-) Nula: diámetro (< 8 mm)
- (+) Sensible: diámetro (8-14 mm)
- (++) Muy sensible: diámetro (14 - 20 mm)
- (+++) Sumamente sensible: diámetro(> 20 mm)

3.5.3. Materiales e instrumentos de laboratorio

- Frasco ámbar de 1L
- Pipetas de Pasteur de 5mL
- Baguetas
- Placas Petri
- Tubos de ensayo
- Papel kraft
- Tips estériles de 100 uL
- Mascarillas
- Guantes de látex
- Gradilla de metal

3.5.4. Equipos

- Cocinilla eléctrica
- Micropipeta de 100 µL
- Autoclave
- Incubadora
- Pinzas de Mayer estériles
- Cilindros de acero inoxidable estériles

3.5.5. Reactivos

Tabla 4 reactivos empleados en la marcha fitoquímica

N°	Compuesto químico	Reactivo	Composición
1	Alcaloides	Bertrand	12g de ácido silico tungstico para 100mL de agua destilada
		Mayer	1,358 g de cloruro mercúrico + 5,000 g de yoduro potásico para 100 mL de agua destilada
		Popoff	0.02g de Fenol + 4 mL de ácido sulfúrico cc. + 5 gts de ácido nítrico cc. Para 200 mL.
2	Triterpenos y esteroides	Lieberman – Burchard	1mL de anhídrido acético + 1mL de cloroformo + 1gt de ácido sulfúrico concentrado
3	Carbohidratos	Antrona	0.2g de Antrona para 100 mL de ácido sulfúrico 96%
4	Almidones y polisacáridos	Solución de yodo	0.5g de yodo + 1g de yoduro potásico para 100mL de agua destilada
5	Azúcares reductores	Fehling A y B	Consiste en 2 soluciones: A: 35g sulfato de cobre para 1Lt de agua destilada B: 150g de sal seignette o tartrato mixto de potasio + 3g de solución de hidróxido de sodio 40% para 1Lt de agua destilada
6	Aminoácidos y proteínas	Ninhidrina	0.2g de Ninhidrina para 100 mL de etanol absoluto o acetona
7	Compuestos fenoles y taninos condensados	FeCl ₃	Se puede obtener a partir de trozos de hierro oxidado + ácido clorhídrico

Fuente: elaboración propia 2019

3.5.6. Obtención del material vegetal

Para la obtención de extracto etanólico, se realizó la selección de las hojas y se procedió a elaborar el secado con la ayuda de una estufa a 40°C, luego se realizó la trituration de las hojas secas y se procedió a macerar 14 días con 1.5 L de alcohol de 96° en un frasco ámbar con la finalidad de evitar la contaminación y asegurar la conservación de los metabolitos. La muestra de estudio se transportó al laboratorio de farmacognosia de la UIGV.

3.5.7. Identificación botánica

La identificación de la muestra fue determinada en el herbario del Museo de Historia Natural de la UNMSM; para tal efecto se llevó los tallos, las hojas y florescencia.

3.5.8. Determinación fisicoquímica de la muestra

3.5.8.1. Prueba de solubilidad

Para realizar el ensayo de solubilidad del extracto etanólico del *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze, se colocaron en cada tubo de ensayo 1mL de muestra vegetal, la cual fue llevada a desecación; seguidamente se adicionó 1mL de cada uno de los solventes descritos en la tabla 5. Los resultados hallados fueron expresados como: (-), Insoluble, (+) Poco soluble, (++) Moderadamente soluble, (+++) Totalmente soluble.

Tabla 5. Solventes para la prueba de solubilidad

N°	SOLVENTES
1	Agua destilada
2	Etanol al 70°
3	Metanol
4	Benceno
5	Cloroformo
6	N – butanol
7	Ciclohexano
8	Eter dietílico

Fuente: elaboración propia 2019

3.5.8.2. Marcha fitoquímica

Los metabolitos existentes en la muestra vegetal permiten observar reacciones como: cambio de color y reacciones de precipitación, lo que indica que tipos de metabolitos primarios y secundarios tiene la muestra. En la siguiente tabla, se especifica cada uno de los ensayos fitoquímicos del extracto etanólico de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze.

Tabla 6. Ensayos empleados en la Marcha Fitoquímica

N°	Metabolito	Ensayo	Reacción Positiva
1	Alcaloides	Bertrand	Precipitado blanco
		Mayer	Precipitado blanco
		Popoff	Precipitado amarillo
2	Triterpenos y esteroides	Lieberman – Burchard	Color verde, azul, naranja o rojo
3	Carbohidratos	Antrona	Anillo de coloración verde
4	Almidones y polisacáridos	Solución de yodo	Coloración azul oscuro
5	Azucares reducidas	Fehling A y B	Precipitado de color rojo, anaranjado
6	Aminoácidos y proteínas	Ninhidrina	Coloración violácea
7	Compuesto fenoles y taninos hidrolizables	FeCl ₃	Color verde o azul

Fuente de elaboración propia 2019

Leyenda

- (-) Precipitado o coloración no evidente
- (+) Precipitado o coloración leve
- (++) Precipitado o coloración moderada
- (+++) El precipitado o coloración es total

3.5.8.3. Método de difusión en agar – cilindro – placa para determinar el efecto antibacteriano

a. Obtención de la placa bacteriana

La cepa de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 fue obtenida del Instituto Nacional de Salud (INS).

b. Activación de la cepa bacteriana

La cepa bacteriana de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 fue activada en Agar Sangre e incubado a 37° por 24 – 48 horas.

c. Preparación del inóculo con el método de suspensión directo de colonias

Se aislaron colonias de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, con un asa de Kolle ajustando el inóculo a una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de MacFarland (1×10^8 UFC/mL) en suero fisiológico estéril al 0.9%. Agitando durante 15 – 20 segundos y rotar varias veces el inóculo contra la pared del tubo para eliminar el exceso de inóculo.

d. Preparación del Agar Sangre

El Agar base se preparó con agua destilada según instrucciones de fábrica, ajustando el pH entre 7.2 – 7.4. Luego, se colocó en autoclave a 121 C° durante 15 minutos, se deja enfriar a 45 – 50 °C. Una vez temperado se vertió 50 mL de la sangre de cordero y procedió a homogenizar, se colocó en placas Petri estériles, dando un fondo uniforme de 4 mm de grosor aproximadamente, lo que equivale a 25 – 30 mL para placas de 100 mm de diámetro. Se dejó enfriar a temperatura ambiente.

e. Preparación de las concentraciones del extracto etanólico de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze

La muestra del extracto etanólico de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze, se lleva a diluciones con NaCl al 0.9% en concentraciones de 50%, 75% y la concentración pura, que constituye al 100%. Dichas disoluciones son preparadas para depositar en los cilindros de cada placa Petri.

Tabla 7. Concentraciones del extracto etanólico de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze

Concentración	Extracto etanólico de Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze	NaCl 0.9%
50%	2,5 mL	2,5 mL
75%	3,75 mL	1,25 mL
100%	5 mL	0 mL

Fuente: Elaboración propia 2019

f. Inoculación de las placas (sembrado)

Se inoculó las placas de agar sangre en su totalidad, sin dejar espacios libre, rotando la placa unos 60° con el fin de conseguir un sembrado uniforme, usando hisopos estériles a 10 cm de distancia de la llama del mechero. Dejar secar de 3 – 5 minutos antes de introducir los discos o cilindros.

g. Dispensación de los cilindros en las placas Petri

- Se colocan 3 cilindros con pinzas estériles en el agar sangre, previamente inoculado con la cepa bacteriana, Debe asegurarse que contacten firmemente con el agar sangre y tienen que estar distribuidos adecuadamente para evitar superposición de los halos de inhibición.
- Se distribuyó 100 µL de las diluciones de las concentraciones del extracto etanólico de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze 50%, 75% y 100% en cada cilindro
- El control positivo empleado fue el antibiótico bacitracina cuya presentación son disco de sensibilidad de 0,04mg de la marca BIOANALYSE.
- Se repitió dicho procedimiento para un total de 10 placas.
- Dejar que las diluciones difundan en el agar por 30 min.

h. Incubación

Se incubo las placas sin invertirlas a 37 °C por 24 horas.

g. Lectura e interpretación de resultados para evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze

Se midió el diámetro de los halos de inhibición con vernier incluyendo el diámetro del cilindro. La lectura se realiza al reverso de la placa y con luz transmitida para observar el halo en el agar sangre, los cuales serán registrados en las fichas de observación.

El tamaño del halo de inhibición indicó si el microorganismo en estudio es sensible, intermedio y resistente, categorías interpretativas para estudios *in vitro* validado y establecido por la NCCLS y empleado por el INS. En este sentido, para interpretar los resultados se tomó como modelo interpretativo la escala de Duraffourd y Lapraz (1983), tabulando cada diámetro de halo según la siguiente escala.

(-) Nula: Diámetro (< 8 mm)

(+) Sensible: Diámetro (8 - 14 mm)

(++) Muy sensible: Diámetro (14 - 20 mm)

(+++) Sumamente sensible: Diámetro (> 20 mm)

3.6. Procesamiento de Datos

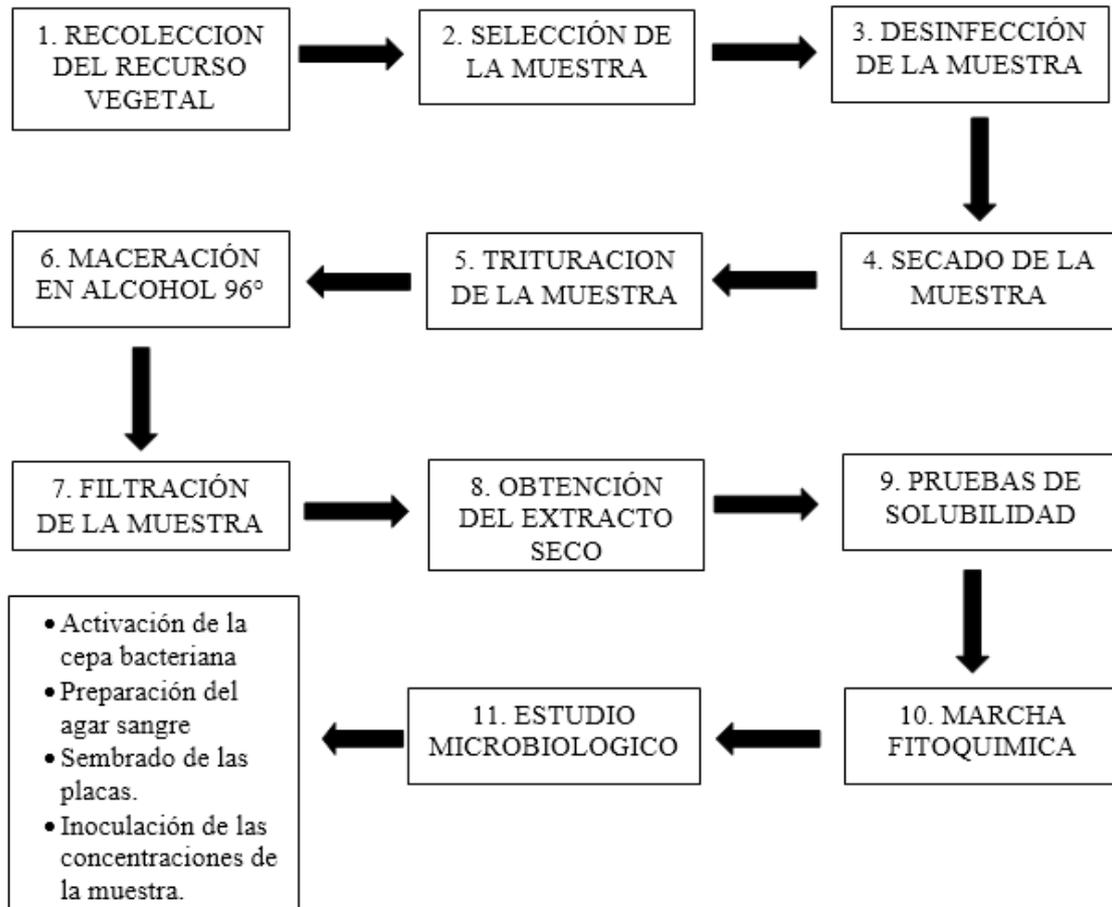


Figura 11. Flujograma del procedimiento experimental

Fuente: Elaboración propia 2019

CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1. Presentación de los resultados

4.1.1. Prueba de Solubilidad

Tabla 8. Resultados de la prueba de solubilidad del extracto etanólico del *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze

N°	Solventes	Observación
1	Agua destilada	-
2	Etanol 70°	+
3	Eter Dietílico	+
4	Cloroformo	+++
5	N-butanol	++
6	Ciclohexano	++
7	Metanol	+++

Fuente: Elaboración propia 2019

Leyenda:

- Totalmente soluble (+++)
- Moderadamente soluble (++)
- Ligeramente soluble (+)
- Insoluble (-)

Los resultados de la Tabla 8. Corresponden a la prueba de solubilidad que se realizó al extracto seco de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua), donde se emplearon solventes de distinta polaridad,

dando como resultado que el extracto seco de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze es soluble a diversos solventes con diferentes polaridades con excepción del agua destilada.

4.1.2. Resultados de la Marcha Fitoquímica

Tabla 9. Resultados de la Marcha Fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua).

N°	Compuesto químico	Ensayo	Resultado	Coloración
1	Alcaloides	Bertrand	-	Nula
		Mayer	-	Nula
		Popoff	+++	Precipitado amarillo
2	Triterpenos y esteroides	Lieberman – Burchard	++	Verde oscuro
3	Carbohidratos	Antrona	-	Nula
4	Almidones y polisacáridos	Solución de yodo	++	Azul oscuro
5	Azúcares reducidas	Fehling A y B	-	Nula
6	Aminoácidos y proteínas	Ninhidrina	-	Nula
7	Compuesto fenóles y taninos	FeCl ₃	++	Verde

Fuente: Elaboración propia 2019

Leyenda:

- Presencia de coloración o precipitado total (+++)
- Presencia de coloración o precipitado moderado (++)
- Presencia de coloración o precipitado leve (+)
- Ausencia de coloración o precipitado (-)

4.1.3. Análisis Descriptivo

La diferencia entre los grupos tratados (concentraciones de extracto etanólico de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze frente a las cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615) se determinó mediante el diseño experimental unifactorial ANOVA de un factor, considerándose significativo $p < 0,05$. Todo el procedimiento fue realizado con el programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*), versión 21,0 en español.

Tabla 10. Grupos de concentración del extracto etanólico del *Clinopodium nubigenum*

Factores inter-sujetos			
Grupos de Concentración		Etiqueta del valor	N
1		Concentración del extracto etanólico al 50%	10
2		Concentración del extracto etanólico al 75%	10
3		Concentración del extracto etanólico al 100%	10
4		Bacitracina (0.04 mg)	10

Fuente: Elaboración propia 2019

Tabla 11. Promedio de la concentración del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) sobre a las cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Estadísticos descriptivos			
Variable dependiente: Tamaño del Halo de Inhibición en mm.			
Grupos de Concentración	Media	Desviación típica	N
Concentración del extracto etanólico al 50%	10,4800	,04216	10
Concentración del extracto etanólico al 75%	12,2800	,04216	10
Concentración del extracto etanólico al 100%	14,5800	,04216	10
Bacitracina (0.04 mg)	15,4000	,00000	10
Total	13,1850	1,96071	40

Fuente: Elaboración propia 2019

En la tabla 11, se observan los valores obtenidos acerca del promedio de "Efecto de la concentración del extracto etanólico de *Clinopodium nubigenum*

(Kunth) Kuntze (Pachachamcua) sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615" observando que en la concentración al 100% existe mayor cambio en el diámetro del halo de inhibición obteniendo un promedio de 14.58 mm en comparación a las otras concentraciones.

Tabla 12. Tamaño del Halo de inhibición del extracto etanólico del *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze

Descriptivos

Tamaño del Halo de Inhibición en mm.

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Concentración del extracto etanólico al 50%	10	10,4800	,04216	,01333	10,4498	10,5102	10,40	10,50
Concentración del extracto etanólico al 75%	10	12,2800	,04216	,01333	12,2498	12,3102	12,20	12,30
Concentración del extracto etanólico al 100%	10	14,5800	,04216	,01333	14,5498	14,6102	14,50	14,60
Bacitracina (0.04 mg)	10	15,4000	,00000	,00000	15,4000	15,4000	15,40	15,40
Total	40	13,1850	1,96071	,31002	12,5579	13,8121	10,40	15,40

Fuente: Elaboración propia 2019

4.2. Contrastación de Hipótesis

La Técnica estadística es un diseño completamente aleatorio con efectos fijos, analiza la varianza de una vía o de un factor.

Nos interesa saber si el "Efecto de la concentración del extracto etanólico de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615" influye en el tamaño de los halos de inhibición (mm), para ello se efectuó la siguiente contrastación de hipótesis:

$$H_0 \equiv t_1 = t_2 = t_3 = t_4 \quad \text{Vs} \quad H_1 \equiv t_i \neq t_j$$

Es decir, contrastamos que no existe diferencia en los promedios de las concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) sobre cepas de *Streptococcus*

pyogenes ATCC 19615 frente a la alternativa de que al menos un promedio difiere de otro.

El modelo matemático es:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + u_{ij}, \quad i = 1, \dots, I; \quad j = 1, \dots, n_i$$

donde:

y_{ij}: Variable aleatoria, representa la observación j-ésima del i-ésimo tamaño del halo de inhibición (Variable respuesta).

μ: Efecto constante, común a todas las concentraciones del factor, denominado media global.

τ_i: Es la parte de y_{ij} debida por la acción del nivel i-ésimo, de la concentración que será común a todos los elementos sometidos a ese nivel del factor, llamado efecto de la concentración i-ésimo.

u_{ij}: Son variables aleatorias que engloban un conjunto de factores, cada uno de los cuales influye en la respuesta sólo en pequeña magnitud pero que de forma conjunta debe tenerse en cuenta. Es decir, se pueden interpretar como las variaciones causadas por todos los factores no analizados y que dentro del mismo tratamiento variarán de unos elementos a otros. Reciben el nombre de perturbaciones o error experimental.

Nuestro objetivo fue estimar el tamaño de los halos de inhibición (mm) y contrastar la hipótesis de todos los valores del factor (concentraciones) conduce al mismo efecto, frente a la propuesta de que al menos dos difieren entre sí. Para esto, es de suponer que los errores experimentales muestran variables aleatorias independientes igualmente distribuida según una Normal de promedio cero y varianza constante.

En el procesamiento de los resultados se obtuvo una colección de 40 unidades experimentales y se estudió el "Efecto de la concentración del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615" en

10 placas, es decir, se busca contrastar el efecto de un solo factor, que se presenta con cuatro niveles, sobre la variable respuesta.

Nos interesa saber si las concentraciones medias del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) frente a las cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615" son iguales en las diez placas, para ello realizamos el siguiente contraste de hipótesis:

Nivel de confianza: 95%

Nivel de significancia: 5%

Variable respuesta: Tamaño del diámetro de los halos de inhibición en mm.

Factor: Extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) frente a las cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615" con cuatro niveles. Es un factor de efectos fijos ya que viene decidido que niveles concretos se van a utilizar.

Modelo completo: Los cuatro tratamientos se prueban en cada una de las placas

Tamaño del experimento: Número total de observaciones (40). En cada placa se registra el tamaño del halo de inhibición por cada una de las concentraciones.

4.2.1. Hipótesis General:

H₀: El extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze no tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

H₁: El extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze tiene efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Tabla 13. Tamaño del Halo de inhibición en mm.

ANOVA de un factor

Tamaño del Halo de Inhibición en mm.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	149,883	3	49,961	37470,750	,000
Intra-grupos	,048	36	,001		
Total	149,931	39			

Fuente: Elaboración propia 2019

Tabla 14. Contraste de igualdad del tamaño del Halo de inhibición en mm.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Tamaño del Halo de Inhibición en mm.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	149,883 ^a	3	49,961	37470,750	,000
Intersección	6953,769	1	6953,769	5215326,750	,000
Concentración	149,883	3	49,961	37470,750	,000
Error	,048	36	,001		
Total	7103,700	40			
Total corregida	149,931	39			

Fuente: Elaboración propia 2019

La Tabla ANOVA, muestra que el valor medio del estadístico de contraste de igualdad de promedios, $F = 37470.750$ deja a su derecha un p-valor de 0.000, menor al 5% de significación, por lo que se rechaza la Hipótesis nula de similitud de promedios. Es decir, se aprecia diferencias significativas en las concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze frente a las cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

Es decir, existen diferencias significativas en el tamaño de los halos de inhibición (mm) en las concentraciones del extracto etanólico de las hojas de

Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze modificando su actividad antimicrobiana sobre las cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

Decisión estadística: Como el p_valor obtenido 0.000 es menor que el nivel de significancia se rechaza la Hipótesis nula por lo tanto: “*El extracto etanólico de las hojas de Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze modifica la actividad antibacteriana sobre las cepas de Streptococcus pyogenes ATCC 19615.*”

4.2.2. Hipótesis específicos

4.2.2.1. Hipótesis específica N°1

H₀: No existen grupos de metabolitos secundarios en las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) responsable del efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

H₁: Existe grupos de metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) responsable del efecto antibacteriano sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

Para la contrastación de la hipótesis específica 1, se realizó la marcha fitoquímica, con la finalidad de observar la presencia de metabolitos secundarios en el extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua).

Los resultados son expuestos en la Tabla 9 que corresponde a la marcha fitoquímica del extracto etanólico de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua), donde indica que la muestra presenta reacción positiva para alcaloides, compuestos fenoles, taninos, triterpenos y esteroides.

Los metabolitos secundarios identificados con mayor intensidad, entre ellos compuestos fenólicos, alcaloides, taninos, triterpenos y esteroides, estarían relacionados con el efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de

Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze (Pachachamcua), por tanto se acepta la H₁.

4.2.2.2. Hipótesis específica N° 2:

H₀: No existe una concentración óptima del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze con efecto antibacteriano frente a las cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

H₁: Existe una concentración óptima del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze con efecto antibacteriano frente a las cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

Tabla 15. Tamaño del halo de inhibición en la concentración al 50% del extracto etanólico del *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze

Estadísticos para una muestra^a

	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Tamaño del Halo de Inhibición en mm.	10	10,4800	,04216	,01333

a. Grupos de Concentración = Concentración del extracto etanólico al 50%

Prueba para una muestra^a

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
Tamaño del Halo de Inhibición en mm.	786,000	9	,000	10,48000	10,4498	10,5102

a. Grupos de Concentración = Concentración del extracto etanólico al 50%

Fuente: Elaboración propia 2019

Tabla 16. Tamaño del halo de inhibición en la concentración al 75% del extracto etanólico del *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze

Estadísticos para una muestra^a

	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Tamaño del Halo de Inhibición en mm.	10	12,2800	,04216	,01333

a. Grupos de Concentración = Concentración del extracto etanólico al 75%

Prueba para una muestra^a

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
Tamaño del Halo de Inhibición en mm.	921,000	9	,000	12,28000	12,2498	12,3102

a. Grupos de Concentración = Concentración del extracto etanólico al 75%

Fuente: Elaboración propia 2019

Tabla 17. Tamaño del Halo de inhibición en la concentración al 100% del *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze

Estadísticos para una muestra^a

	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Tamaño del Halo de Inhibición en mm.	10	14,5800	,04216	,01333

a. Grupos de Concentración = Concentración del extracto etanólico al 100%

Prueba para una muestra^a

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
Tamaño del Halo de Inhibición en mm.	1093,500	9	,000	14,58000	14,5498	14,6102

a. Grupos de Concentración = Concentración del extracto etanólico al 100%

Fuente: Elaboración propia 2019

Decisión estadística: Como el p_valor obtenido en los tres grupos de concentración del extracto etanólico es 0.000 y es menor que el nivel de significancia se rechaza la Hipótesis nula, por lo tanto: *“Existe una concentración optima del extracto etanólico de las hojas de Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze con efecto antibacteriano sobre cepas de Streptococcus pyogenes ATCC 19615”*

4.2.2.3 Hipótesis específica N°3

H₀: No existe efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) comparable con la Bacitracina 0,04 mg sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

H₁: Existe efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) comparado con la Bacitracina 0,04 mg sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615.

Tabla 18. Tamaño del Halo de inhibición de la Bacitracina

Estadísticos para una muestra^a

	N	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media
Tamaño del Halo de Inhibición en mm.	10	15,4000	,00000	,00000

a. Grupos de Concentración = Bacitracina (0.04 mg)

Prueba para una muestra^a

	Valor de prueba = 0					
	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
					Inferior	Superior
Tamaño del Halo de Inhibición en mm.	4,836E+16	9	,000	15,40000	15,4000	15,4000

a. Grupos de Concentración = Bacitracina (0.04 mg)

Fuente: Elaboración propia 2019

Decisión estadística: Como el p_valor obtenido es 0.000 y es menor que el nivel de significancia se rechaza la Hipótesis nula, por lo tanto: *“Existe efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de Clinopodium nubigenum (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) comparable con la Bacitracina 0,04 mg sobre cepas de Streptococcus pyogenes ATCC 19615”*

4.3. Discusión de resultados

En el presente estudio de investigación se utilizó el método de cilindro en placas para evaluar el efecto antibacteriano del extracto etanólico, de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) sobre cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC19615.

A pesar de las investigaciones realizadas sobre las propiedades medicinales de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze en diferentes partes del mundo, en nuestro país solo se han reportado investigaciones del género *Clinopodium* con otro tipo de especies, por tanto, sería de gran importancia profundizar su investigación para adquirir los beneficios del recurso vegetal.

Los resultados obtenidos en el presente estudio de investigación indica que las concentraciones iguales o mayores que 50% del extracto etanólico de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) presentó actividad antimicrobiana para la cepa de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. Datos

que son respaldados por: Neira J. (2018) EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE LAS PLANTAS MEDICINALES UTILIZADAS POR LOS POBLADORES DE TUCTUMPAYA, QUEQUEÑA Y CHIGUATA, FRENTE A BACTERIAS GRAM POSITIVAS: *Staphylococcus aureus* – *Streptococcus pneumoniae* CAUSANTES DE INFECCIONES DE IMPORTANCIA MÉDICA, AREQUIPA – PERÚ 2017, Donde se determinó el efecto antimicrobiano de los extractos etanólicos de cuatro especies vegetales dentro de ellas el *Clinopodium bolivianum* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* mediante la técnica de Kirby Bauer y se logró demostrar que todos los extractos poseen efecto antimicrobiano a una concentración de 30 mg/mL de solvente; Polo M. (2018), ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE ESPECIES VEGETALES PROCEDENTES DEL DISTRITO DE CACHICADAN, PROVINCIA DE SANTIAGO DE CHUCO, REGION LA LIBERTAD, se estudiaron 5 tipos de especies vegetales dentro de ellas el *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* resistente a meticulosa (SARM) donde se determinó que *Clinopodium pulchellum* tiene buena actividad antibacteriana frente a las 4 cepas, Bamberger K., Collave S.(2010), EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE LAS HOJAS DE *Clinopodium taxifolium* “Chinininga” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae in vitro*, donde se determinó con el método de kirby bauer que *Clinopodium taxifolium* que en concentraciones mayor o igual al 10% presenta buena actividad antimicrobiana en las dos cepas., Palacios L. (2016), ESTUDIO FITOQUÍMICO Y EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LAS ESPECIES VEGETALES *Bidens odorata* Y *Clinopodium procumbens* PROCEDENTES DE LOS ESTADOS DE HIDALGO Y PUEBLA”. Se determinó la actividad antimicrobiana de *Bidens odorata* y *Clinopodium procumbens* contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, donde el *Clinopodium procumbens*, donde presento una mayor actividad inhibitoria frente a *Staphylococcus aureus* con un CMI 300µg /mL., Claro paz M. (2006) DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTI-*HELICOBACTER PYLORI* DE *Plantago major* (Llanten), *Verbena officinalis* (Verbena), *Clinopodium bolivianum* (Khoa), *Calendula officinalis* (Calendula), *Piper angustifolium*

(Matico), *Rubus boliviensis* (Khari Khari), donde refiere que el *Clinopodium bolivianum* presenta una buena actividad antibacteriana frente a la cepa de *Helicobacter pylori* al 99% de confianza.

Este estudio de investigación aporta nueva información que puede ser utilizada como base para investigaciones futuras, se tiene que considerar que los resultados obtenidos pueden variar de acuerdo al lugar u origen, donde fue realizada la recolección del recurso vegetal, así mismo las condiciones climáticas, el suelo y las diferentes técnicas de cultivo.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

1. El extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) presentó grupos de metabolitos secundarios como alcaloides, compuestos fenoles, taninos, triterpenos y esteroides.
2. Las cepas de *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 son sensibles al extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) en las concentraciones de 50%, 75% y 100%.
3. El extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) en la concentración de 50%, 75% y 100% poseen efecto antibacteriano comparable con el control positivo de Bacitracina 0,04 mg, siendo la concentración de 100% la de mayor efecto.

5.2. Recomendaciones

1. Desarrollar estudios con cepas de similares características tales como el *Streptococcus pneumoniae* ya que es otra bacteria que causa infecciones como la neumonía, sinusitis y la peritonitis.
2. Investigar si en otro órgano del *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze presenta metabolitos secundarios con efecto antibacteriano.
3. Realizar la recolección de este recurso vegetal en los primeros meses del año entre marzo y mayo ya que hay más disponibilidad del vegetal en el año.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rangel D. García I. Velasco J. et al. Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nítida* (Ruiz et Pavon). Rev Facultad de Farmacia. 2001; (41): 43 – 46.
2. Ruiz J. Roque M. Actividad antimicrobiana de cuatro plantas del Nor – Oriente Peruano. Rev Ciencia e Investigación. 2009; 12 (1): 41 – 47.
3. Espinoza C. Serna Z. Efecto antibacteriano in vitro del latex de *Croton lechleri Mull Arg.* (sangre de grado) frente a *Staphylococcus aureus*. [tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico] Perú: Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2018
4. Pacheco L. La resistencia a antibióticos: El efecto colateral. Rev Horizonte Sanitario. 2012; 11 (1): 24 – 31
5. Fernández D. Quiros M. Cuevas O. et al. Curso de superación sobre selección y manejo con antibacterianos en infecciones respiratorias y urinarias. Rev MediSur. 2015; 13 (2): 293 – 302.
6. Ana C. Chambi N. Características de la prescripción y uso de antibacterianos en pacientes con septicemia del Servicio de Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica del Hospital Nacional Docente Madre – Niño San Bartolomé agosto – diciembre 2013. [tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico] Perú: Universidad Privada Norbert Wiener; 2015
7. Segil I., Sichez H. Buenas Prácticas de Prescripción en el Servicio de Unidad de Terapia Intensiva Pediátrica del Hospital Nacional Docente Madre – Niño San Bartolomé de Agosto 2013 – Enero 2014. [tesis para optar el título profesional de Químico Farmacéutico] Perú: Universidad Privada Norbert Wiener; 2014
8. Torres-Marquina I., Minchan P., Martos F., et al. Actividad antioxidante y antimicrobiana de los aceites esenciales de *Satureja seríceea* “Romerito del campo” y *Satureja nubigena* “Pachachamcua” provenientes de la región de Cajamarca, 2013. Rev. Perspectiva. 2016; 17 (1): 13 – 31.
9. Neira J. “Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de las plantas medicinales utilizadas por los pobladores de

- Tuctumpaya, Quequeña y Chiguata, frente a bacterias gram positivas: *Staphylococcus aureus* – *Streptococcus pneumoniae* causantes de infecciones de importancia médica, Arequipa – Perú 2017.”[para optar el título profesional de Biólogo] Perú: Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa; 2018.
10. Polo M. Ganoza M. Actividad antibacteriana de especies vegetales procedentes del distrito de Cachicadan, Provincia de Santiago de Chuco, Región la Libertad. [para optar el título profesional de Químico Farmacéutico] Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2018.
 11. Bamberger K., Collave S. Efecto de los extractos de las hojas de *Clinopodium taxifolium* “Chinininga” frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Klebsiella pneumoniae* in vitro. [tesis para optar el título de Químico Farmacéutico] Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2010.
 12. Palacios L. Estudio Fitoquímico y Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de las especies vegetales *Bidens odorata* y *Clinopodium procumbens* procedentes de los Estados de Hidalgo y Puebla. [protocolo de tesis que para obtener el grado de: Licenciatura en Químico Farmacéutico Industrial] México: Instituto Politécnico Nacional; 2016.
 13. Claro M. Determinación de la actividad anti - helicobacter pylori de *Plantago major* (llantén), *Verbena officinalis* (verbena), *Clinopodium bolivianum* (khoa), *Caléndula officinalis* (caléndula), *Piper angustifolium* (matico) y *Rubus boliviensis* (khari khari) por el método de difusión de disco”. [tesis para obtener el grado de Licenciatura en Química Farmacéutica]. Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés. 2006
 14. Caicedo E, Otavalo S. Determinación de temperatura y tiempo de deshidratación para la elaboración de té de Sunfo, *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Kunth) Kuntze. [tesis para obtener el grado de ingeniero agroindustrial] Ecuador: Universidad Técnica del Norte; 2007
 15. Paul C. Diseño de una Planta para elaboración de un deshidratado para infusiones de Sunfo *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze. [proyecto previo a la obtención del título de Ingeniero Agroindustrial] Quito, Ecuador: Escuela Politécnica Nacional; 2018.

16. Aracil B. Alos J. *Streptococcus pyogenes* resistentes a los macrólidos. Rev J Antimicrob Chemother 2000; 45:605-609.
17. Rodríguez G. Géneros *Streptococcus* y *enterococcus*. Rev Bacteriología y virología médica. 2006; 1: 273 – 290
18. Gonzáles M., Orden B. Pruebas de detección rápida para el diagnóstico. Infecciones Respiratorias. Rev Formación activa en Pediatría de Atención Primarias. 2009; 2 (4): 220 – 224.
19. Arias M. Identificación de agentes bacterianos causantes de infecciones de oído y su relación con la resistencia a los antibacterianos. [Requisito previo para optar por el título de Licenciada en Laboratorio Clínico] Ecuador: Universidad Técnica de Ambato; 2018.
20. Patricia R., Rosa R., Francisco H. Comparación de la sensibilidad a la bacitracina con la identificación serológica de *Streptococcus pyogenes* [internet]Costa Rica: Hospital Nacional de Niños; 2018; (26) 25-30.
21. Bacitracina [base de datos de internet]. Madrid, R, España: Comité de medicamentos de la asociación de medicamentos Española de Pediatría; 2015; disponible en: <http://pediamecum.es/wp-content/farmacos/Bacitracina.pdf>
22. Ana C. Cándida G. Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia metódica.[tesis previa para la obtención del título de Bioquímica y Farmacéutica]. Ecuador: Universidad de Cuenca; 2010.
23. Mateos P. Agentes antibacterianos y microorganismos. España; 2010. [accesado 15 de Abril del 2015] Disponible en: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/a3-agentes_antibacterianos_y_microorganismos.pdf
24. Gonzáles A. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólico de plantas del amazonas. [trabajo final para la especialidad de Tecnología en alimentos] Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2014.
25. Guerra A. Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físico-químicas de los extractos fluidos, blandos y secos así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (*Phlebodium pseudoaureum*) a nivel de laboratorio. [trabajo de graduación para la conferírsele el título de Ingeniero Químico] Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala; 2005.

26. Pedraza P., Castellanos H. Estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro. Parte X. [trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar el título de Microbiología Industrial y Bacteriología] Colombia: Pontificia Universidad Javeriana; 2009
27. Taroco R., Seija V., Vignoli R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. Rev Bacteriología y Virología Médica. 2012; 1: 663 – 671.
28. Casado C., Torrico G., Medina M. Medios de cultivo en un laboratorio de Microbiología. [proyecto de tesis] Perú. Universidad Cesar Vallejo; 2012.
29. Instituto de Salud Pública. Gobierno de Chile. Guía de Bioseguridad para Laboratorios Clínicos. 2013
30. Malbran C. Método de determinación de sensibilidad antimicrobiana por difusión. Rev Servicio Antibacteriano. 2012, 1: 23 – 28
31. Rivera M. Estreptococo Beta Hemolítico grupo A (*Streptococcus pyogenes*). Rev Honduras Pediátrica. 2008; 19 (2): 47 -51.

ANEXOS

ANEXO N° 1 Matriz de consistencia

EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) SOBRE CEPAS DE *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615'

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPOTESIS GENERAL	OPERACIONALIZACION DE VARIABLES			METODOLOGÍA
			V1: INDEPENDIENTE	DIMENSIONES	INDICADORES	Tipo: - <i>In vitro</i> - Transversal - Prospectivo Diseño: - Experimental <i>in vitro</i> Nivel: - Aplicativo Población: Población vegetal: hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) Población Microbiológica: cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615 Muestra: Muestra vegetal: 500ml de extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze Porcon alto – Cajamarca. Muestra Microbiológica: placas petri con agar sangre cultivadas con cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615.
PROBLEMAS ESPECIFICOS	OBJETIVOS ESPECIFICOS	HIPOTESIS ESPECIFICAS	EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (Pachachamcua)	MARCHA FITOQUIMICA	- muy soluble (+++) - Poco soluble (++) - Débilmente soluble (+) - Insoluble (-)	
1. ¿El extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) que grupos de metabolitos secundarios poseerá?	1. Identificar los grupos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (Pachachamcua).	1. Existen metabolitos secundarios en el extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) como posibles responsables del efecto antibacteriano sobre cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615.			-Alcaloides -Triterpenos / esteroides -Carbohidratos -Almidones y polisacáridos -Azúcares reductores -Aminoácidos y proteínas -Fenoles -Taninos	
2. ¿Cuál será la concentración de extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) con efecto antibacteriano sobre cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC19615?	2. Determinar que concentración del extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) tiene efecto antibacteriano sobre cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC19615.	2. Existe una concentración óptima del extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) con efecto antibacteriano sobre cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615.		Concentración del extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze.	<ul style="list-style-type: none"> • 100 % • 75 % • 50 % 	
3. ¿El efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) será comparable a Bacitracina 0,04 mg sobre cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC19615?	3. El extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) tiene efecto antibacteriano comparable a Bacitracina 0,04 mg sobre cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC19615.	3. Existe efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (Pachachamcua) comparable con la Bacitracina 0,04 mg sobre cepas de <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615.	V2: DEPENDIENTE	DIMENSIONES	INDICADORES	Instrumentos : Ficha de recolección de datos a. Prueba de solubilidad b. Marcha fitoquímica c. Efecto antibacteriano
			EFFECTO ANTIBACTERIANO SOBRE CEPAS DE <i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	Método de Difusión en Agar Cilindro - Placa	Distancia de halo de inhibición con relación al desplazamiento de la bacteria y el punto de siembra de la muestra de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze.	

ANEXO N°2 Certificación Botánica



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



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N°206-USM-2018

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 **Rubí Orfelinda Pérez Huamán, Galo Narciso Ginocchio Flores**, estudiantes de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega; **Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica** ha sido estudiada y clasificada como: ***Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze** y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: ASTERIDAE

ORDEN: LAMIALES

FAMILIA: LAMIACEAE

GENERO: *Clinopodium*

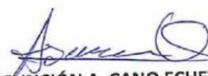
ESPECIE: *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze

Nombre vulgar: "Pachachamcua"
Determinado por Mag. Asunción A. Cano Echevarría

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

Lima, 21 de mayo de 2018




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

Av. Arenales 1256, Jesús María
Apdo. 14-0434, Lima 14, Perú

Teléfono:
619-7000 anexo 5701, 5703, 5704

E-mail: museobn@unmsm.edu.pe
<http://museobn.unmsm.edu.pe>

ANEXO N°3 Certificado de la cepa *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615



Instituto Nacional de Salud

B35860050743 CEPA STREPTOCOCCUS PYOGENES ATCC® 19615™

Denominación CEPA STREPTOCOCCUS PYOGENES ATCC® 19615™

Principal

Presentación Unidad

Documento(s):

- Hoja de datos de seguridad (Safety Data Sheet)
- Hoja de datos del producto (Product Sheet).
- Certificado de análisis del mismo lote

Características

- Cepas de cultivo inicial (pasaje cero)
- Número ATCC: 19615
- Presentación: Vial. Conteniendo cultivo liofilizado.
- Vial con precinto de seguridad
- Condiciones de almacenamiento
- Congelado: -80°C o menos
- Liofilizado: 2°C a 8°C
- Condiciones de transporte: Transporte en contenedor de bioseguridad.

Fecha de Vencimiento

No menor de 2 Años

ANEXO N°4 Protocolo de sangre de ovino



PROTOCOLO DE SANGRE DE OVINO DESFIBRINADA CONTROLADA

Investigar para Proteger la Salud

FECHA: 19/10/2018
PROTOCOLO DE ANALISIS N° 041-191018

Fecha de Extracción : 16/10/2018
Fecha de Vencimiento: 26/10/2018
Cantidad : 700 mL
Presentación: Frasco de Polipropileno por 50 mL.

CONSTANCIA: La Coordinación del Laboratorio de Vacunas Bacterianas deja constancia que el producto denominado "Sangre Controlada Desfibrinada" cumple con el Ensayo de Control de Contaminantes Microbianos, cuyo resultado a las 72 horas de sus controles está Libre de Contaminantes, dando la conformidad del mismo el que suscribe.

LABORATORIO VACUNAS BACTERIANAS
CENTRO NACIONAL DE
PRODUCTOS BIOLÓGICOS

Fecha	Descripción	CONTAMINANTES MICROBIANOS	RESULTADO
19-10-2018	LOTE N°: SOD - 220-161018-001	NEGATIVO	CONFORME
	LOTE N°: SOD - 221-161018-002	NEGATIVO	CONFORME
	LOTE N°: SOD - 222-161018-003	NEGATIVO	CONFORME

V°B° Coordinación de Vacunas Bacterianas

NOTA.- El presente Protocolo de Análisis certifica la calidad de los lotes arriba mencionados y es de uso exclusivo para clientes del INS.


M. V. Jorge Ruiz Alarcón
Coordinación de Laboratorio de Vacunas Bacterianas
DEPIN-CNPE/INS

Advertencia: El Laboratorio recomienda al cliente sobre el correcto transporte del producto y que se debe de considerar la cadena de frío y evitar movimientos bruscos ya que puede generar hemólisis y posible contaminación. Usar el contenido total de los frascos una vez abierto.

Recomendaciones:

T° de almacenamiento: 2° a 8° C

T° de transporte: 4° a 8° C.

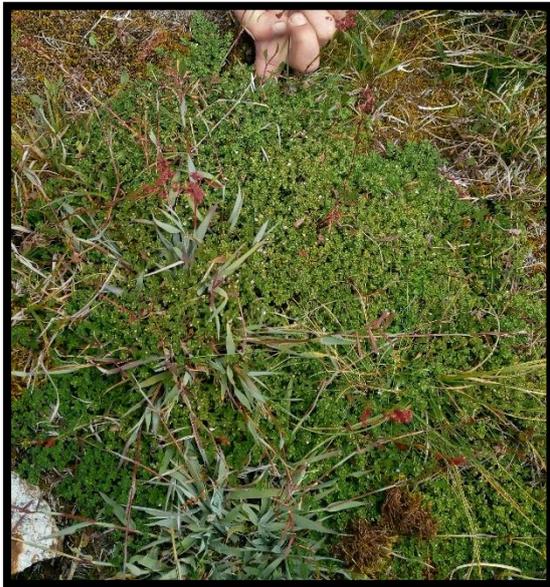
Posición Correcta de Transporte: Posición Vertical.

Se recomienda mantener las condiciones asépticas durante la manipulación para evitar la contaminación del producto.



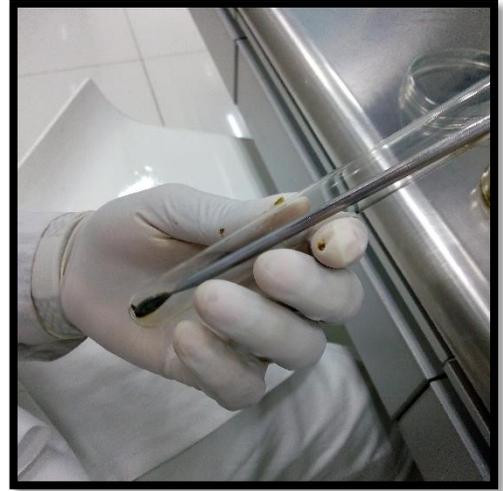
ANEXO N°5 Obtención y recolección de la muestra vegetal

Planta de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua), Porcon Alto - Cajamarca

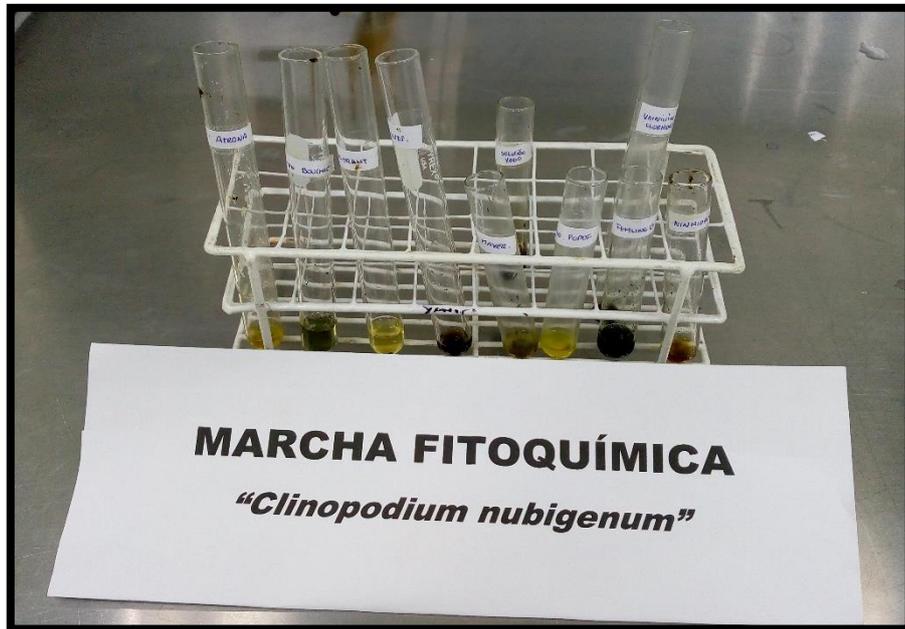


ANEXO N°6 Prueba de Solubilidad

Extracto seco de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze



ANEXO N°7 Marcha fitoquímica



ANEXO N°8 Formulación de las concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua).

Concentración	Extracto de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> (Kunth) Kuntze (mL)	NaCl (0.09%) mL
50%	2.5 mL	2.5 mL
75%	3.75 mL	1.25 mL
100%	5mL	0 mL

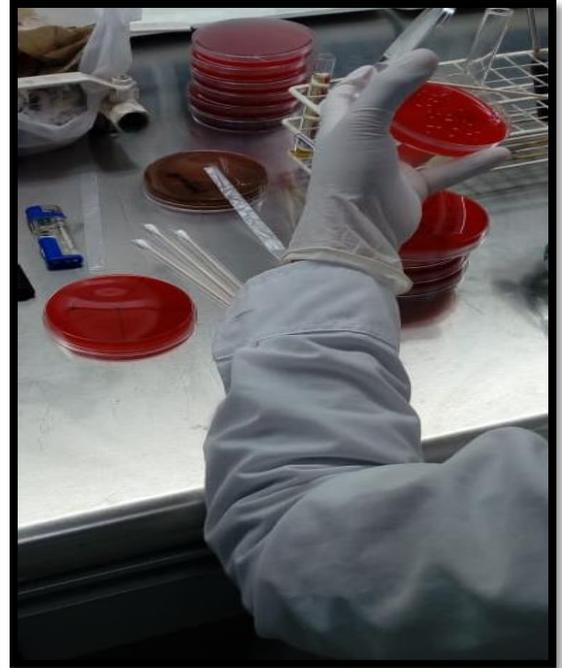


Concentraciones del extanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua)

ANEXO N°9 Efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Kunth) Kuntze (Pachachamcua). Por el método de difusión en agar cilindro- placa



Plaqueo de Agar Sangre



Preparación del cultivo y siembra de *Streptococcus pyogenes* ATCC

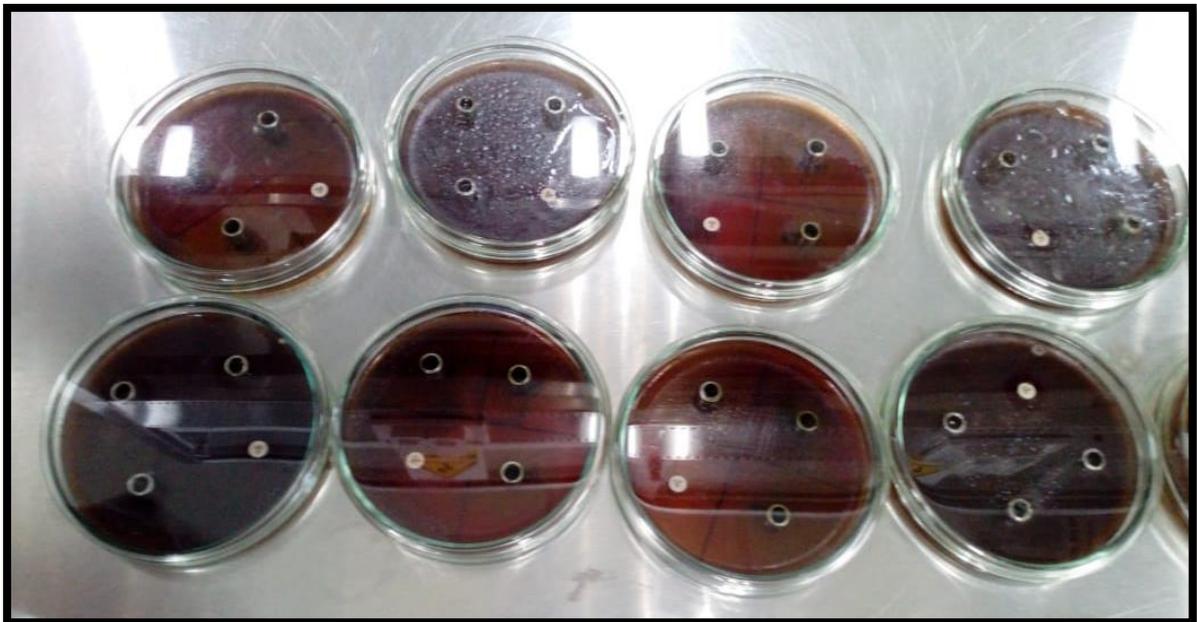
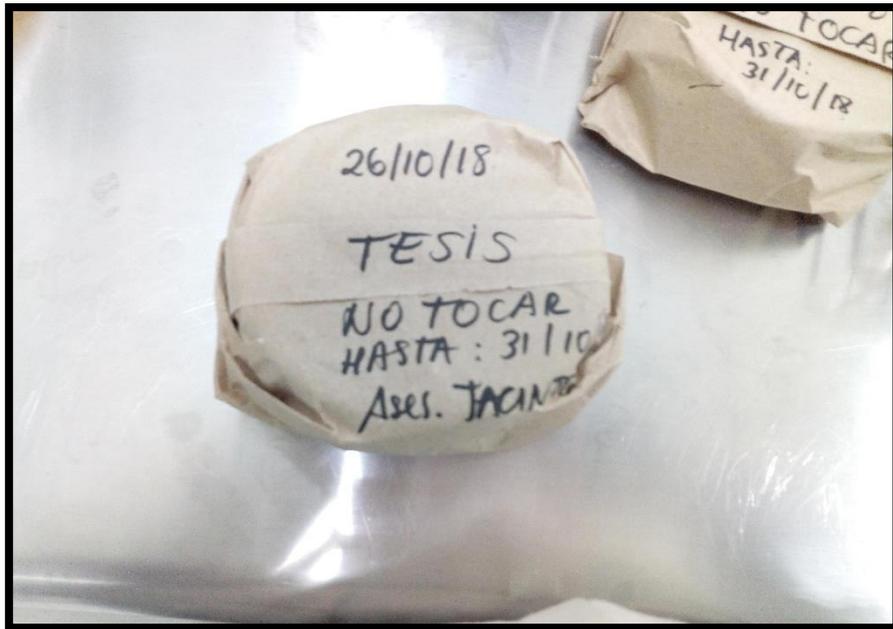


Dispensación de la muestra en las placas petri



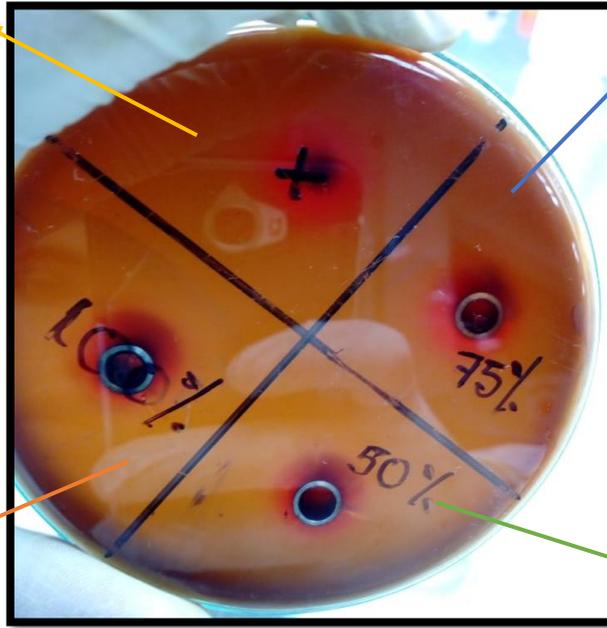
Incubación de las placas Petri a 37°C por 24 horas.

ANEXO N°10 Lectura de los resultados de los halos de inhibición



CONTROL POSITIVO
(+) Bacitracina 0,04

CONCENTRACIÓN
AL 75%

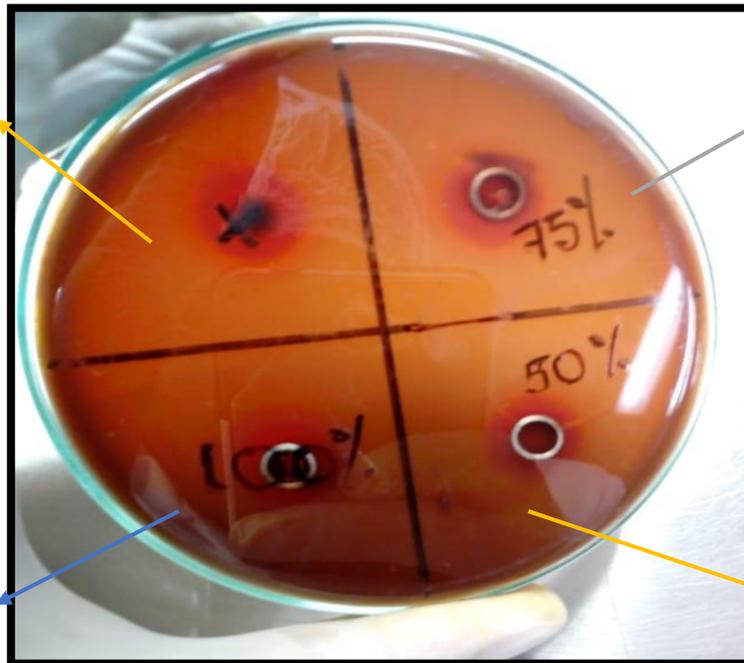


CONCENTRACIÓN
AL 100%

CONCENTRACIÓN
AL 50%

CONTROL POSITIVO
(+) Bacitracina 0,04

CONCENTRACIÓN
AL 75%



CONCENTRACIÓN
AL 100%

CONCENTRACIÓN
AL 50%

ANEXO N° 11 FICHA DE VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO (PRUEBA DE SOLUBILIDAD)



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

FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA
EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Clinopodium nubigenum* (Pachachamcua)
SOBRE CEPAS DE *Streptococcus pyogenes*.

(PRUEBA DE SOLUBILIDAD)

FUNDAMENTO: La solubilidad es una medida de la capacidad de disolver una determinada sustancia (Sólido) en un determinado medio (Solvente), implícitamente se corresponde con la máxima cantidad de sólido disuelto en una cantidad de solvente a una temperatura fija.

INSTRUCCIONES: Colocar en un tubo de ensayo 0.1mg de extracto seco y colocar 1ml de solventes que están en la tabla y observar con que solvente es soluble.

REACTIVO	COMPUESTO ACTIVO	RESULTADOS
Agua destilada	Extracto seco	
Alcohol 70°	Extracto seco	
Metanol	Extracto seco	
N-Butanol	Extracto seco	
Benceno	Extracto seco	
Eter dietílico	Extracto seco	
Ciclohexano	Extracto seco	
Cloroformo	Extracto seco	

Leyenda: Altamente soluble: +++; soluble: ++; levemente soluble: +; insoluble: -



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

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

VALIDACION DE INSTRUMENTOS

1. DATOS GENERALES

- 1.1. Apellidos y Nombres del experto: Pineda Perez, Newton Mario
 1.2. Cargo e institución donde labora: Docente UIGV
 1.3. Registro de colegio profesional: C.B.F.P. 18130
 1.4. Nombre de instrumento: instrumento de recolección de datos para determinar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Pachachamcua) frente a *Streptococcus pyogenes*.

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	PUNTUACION				
		1	2	3	4	5
1. Claridad	El instrumento esta formulado 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 relacionar las variables en mención				X	
7. Consistencia	Se basa en aspectos teóricos científicos de la farmacéutica como bioquímica.					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						X
Total						X

2. OPINIÓN DE APLICABILIDAD: Muy Aceptable
 3. PROMEDIO DE VALORACIÓN: 95%

Mario Pineda
Firma del Experto

Puntuación

41-60	NO VALIDO, REFORMULAR
61-70	NO VALIDO, MODIFICAR
71-80	VALIDO, MEJORAR
81-100	VALIDO, APLICAR



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

FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA
EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Clinopodium nubigenum* (Pachachamca)
SOBRE CEPAS DE *Streptococcus pyogenes*.

(PRUEBA DE SOLUBILIDAD)

FUNDAMENTO: La solubilidad es una medida de la capacidad de disolvente una determinada sustancia (Soluta) en un determinado medio (Solvente), implícitamente se corresponde con la máxima cantidad de soluto disuelto en una cantidad de solvente a una temperatura fija.

INSTRUCCIONES: Colocar en un tubo de ensayo 0.1mg de extracto seco y colocar 1ml de solventes que están en la tabla y observar con que solvente es soluble.

REACTIVO	COMPUESTO ACTIVO	RESULTADOS
Agua destilada	Extracto seco	
Alcohol 70°	Extracto seco	
Metanol	Extracto seco	
N-Butanol	Extracto seco	
Benceno	Extracto seco	
Eter dietílico	Extracto seco	
Ciclohexano	Extracto seco	
Cloroformo	Extracto seco	

Leyenda: Altamente soluble: +++; soluble: ++; levemente soluble: +; insoluble: -



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

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

VALIDACION DE INSTRUMENTOS

1. DATOS GENERALES

- 1.1 Apellidos y Nombres del experto: Oscar Flores López
 1.2 Cargo e institución donde labora: Docente UIGV
 1.3 Registro de colegio profesional: C.G.F.P. 1394
 1.4 Nombre de instrumento: Instrumento de recolección de datos para determinar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Pachachamca) frente a *Streptococcus pyogenes*.

Instrucciones: Luego de analizar el instrumento y cotajar 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	PUNTAJACION				
		1	2	3	4	5
1. Claridad	El instrumento esta formulado 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 relacionar las variables en mención.				X	
7. Consistencia	Se basa en aspectos técnicos científicos de la farmacéutica como bioquímica.					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						X
Total						X

2. OPINIÓN DE APLICABILIDAD: Muy Aceptable
 3. PROMEDIO DE VALORACIÓN: 95%

Firma del Experto: [Firma] Mg Oscar Flores López
394.

41-50	NO VÁLIDO, REFORMULAR
51-70	NO VÁLIDO, MODIFICAR
71-80	VÁLIDO, MEJORAR

ANEXO N° 12 FICHA DE VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO (MARCHA FITOQUÍMICA)



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

INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Clinopodium nubigenum* (Pachachamcua) SOBRE CEPAS DE *Streptococcus pyogenes*.

(RENDIMIENTO Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO)

OBJETIVO: Identificar los metabolitos secundarios que están presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Pachachamcua)

FUNDAMENTO: El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.

INSTRUCCIONES: Colocar una pequeña muestra del extracto seco en un tubo de ensayo y emplear los reactivos mencionados en la tabla para identificar los metabolitos secundarios de *Clinopodium nubigenum* (Pachachamcua)

N°	Metabolito	Ensayo	Resultado
1	Alcaloides	Bertrand	
		Mayer	
		Popoff	
2	Triterpenos y esteroides	Lieberman – Burchard	
3	Carbohidratos	Antrona	
4	Almidones y polisacáridos	Solución de yodo	
5	Azúcares reducidas	Fehling A y B	
6	Aminoácidos y proteínas	Ninhidrina	
7	Compuesto fenóles y taninos	FeCl ₃	
8	Indoides	Vainilla clorhídrico	

Legenda: Abundante: +++; Regular: ++; leve: + ausencia: -



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

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

VALIDACION DE INSTRUMENTOS

1. DATOS GENERALES

- 1.1. Apellidos y Nombres del experto: Puente Perez, Nelson Mario
 1.2. Cargo e institución donde labora: Docente UIGV
 1.3. Registro de colegio profesional: C.R.F.P. 18120
 1.4. Nombre de instrumento: instrumento de recolección de datos para determinar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Pachachamcua) frente a *Streptococcus pyogenes*.

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	PUNTUACION				
		1	2	3	4	5
1. Claridad	El instrumento esta formulado 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 relacionar las variables en mención				X	
7. Consistencia	Se basa en aspectos teóricos científicos de la farmacéutica como bioquímica.					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						X
Total						X

2. OPINIÓN DE APLICABILIDAD: Muy Aceptable
 3. PROMEDIO DE VALORACIÓN: 95%

Mario P. Puente
Firma del Experto

Puntuación

41-60	NO VALIDO, REFORMULAR
61-70	NO VALIDO, MODIFICAR
71-80	VALIDO, MEJORAR
81-100	VALIDO, APLICAR



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

INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Clinopodium nubigenum* (Pachachamcua) SOBRE CEPAS DE *Streptococcus pyogenes*.

(RENDIMIENTO Y TAMIZAJE FITOQUÍMICO)

OBJETIVO: Identificar los metabolitos secundarios que están presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Pachachamcua)

FUNDAMENTO: El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.

INSTRUCCIONES: Colocar una pequeña muestra del extracto seco en un tubo de ensayo y emplear los reactivos mencionados en la tabla para identificar los metabolitos secundarios de *Clinopodium nubigenum* (Pachachamcua)

Nº	Metabolito	Ensayo	Resultado
1	Alcaloides	Bertrand	
		Mayer	
		Popoff	
2	Triterpenos y esteroides	Lieberman – Burchard	
3	Carbohidratos	Antrona	
4	Almidones y polisacáridos	Solución de yodo	
5	Azúcares reducidas	Fehling A y B	
6	Aminoácidos y proteínas	Ninhidrina	
7	Compuesto fenóles y taninos	FeCl ₃	
8	Indoides	Vainilla clorhidrico	

Leyenda: Abundante: +++; Regular: ++; leve: + ausencia: -



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

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

VALIDACION DE INSTRUMENTOS

1. DATOS GENERALES

- 1.1. Apellidos y Nombres del experto: Oscar Flores López
 1.2. Cargo e institución donde labora: Docente UIGV
 1.3. Registro de colegio profesional: C.Q.F.P. 1394
 1.4. Nombre de instrumento: Instrumento de recolección de datos para determinar el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Pachachamcua) frente a *Streptococcus pyogenes*.

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	PUNTUACION				
		1	2	3	4	5
1. Claridad	El instrumento esta formulado 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 relacionar las variables en mención				X	
7. Consistencia	Se basa en aspectos teóricos científicos de la farmacéutica como bioquímica.					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					X
	Total					X

2. OPINIÓN DE APLICABILIDAD: Muy Aceptable

3. PROMEDIO DE VALORACIÓN: 95%

Firma del Experto: Oscar Flores López Puntuación: 394

41-60	NO VALIDO, REFORMULAR
61-70	NO VALIDO, MODIFICAR
71-80	VALIDO, MEJORAR

ANEXO N° 13 FICHA DE VALIDACIÓN DE INSTRUMENTO (ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO)



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

INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS PARA DETERMINAR EL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DE *Clinopodium nubigenum* (Pachachamcua) FRENTE A *Streptococcus pyogenes*.

FICHA DE OBSERVACION

OBJETIVO: Identificar la sensibilidad del *Streptococcus pyogenes* frente a la concentración de 50%, 75% y 100% del extracto etanolico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Pachachamcua).

FUNDAMENTO: El método de difusión en agar cilindro – placa, basado en el trabajo de Kirby Bahuer, validado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) es utilizado para determinar el efecto antibacteriano de los antibióticos, como lo estipula la USP 40, en su apartado de pruebas biológicas (antibióticos valoración microbiológica).

INSTRUCCIONES: Realizar la medición con una regla o vernier en mm los halos de inhibición correspondiente de cada concentración de las placas y registrar los datos.

N° DE ENSAYOS	Concentración (%) del extracto etanolico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> 100 ul			Control (+) Bacitracina 0.04
	50	75	100	
	Longitud de halo de inhibición (mm)			
1				0.04
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
Promedio				



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

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA

VALIDACION DE INSTRUMENTOS

1. DATOS GENERALES

- 1.1. Apellidos y Nombres del experto: Piña Paz, Neuron Mario
 1.2. Cargo e institución donde labora: Docente UIGV
 1.3. Registro de colegio profesional: C.A.F.P. 18130
 1.4. Nombre de instrumento: instrumento de recolección de datos para determinar el efecto antimicrobiano del extracto etanolico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Pachachamcua) frente a *Streptococcus pyogenes*.

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	PUNTUACION				
		1	2	3	4	5
1. Claridad	El instrumento esta formulado 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 relacionar las variables en mención				X	
7. Consistencia	Se basa en aspectos teóricos científicos de la farmacéutica como bioquímica.					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					X
	Total					X

2. OPINIÓN DE APLICABILIDAD: Muy Aceptable

3. PROMEDIO DE VALORACIÓN: 95%

Mario Piña Paz
Firma del Experto

Puntuación

41-60	NO VALIDO, REFORMULAR
61-70	NO VALIDO, MODIFICAR
71-80	VALIDO, MEJORAR
81-100	VALIDO, APLICAR



INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS PARA DETERMINAR EL EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DE *Clinopodium nubigenum* (Pachachamcua) FRENTE A *Streptococcus pyogenes*.

FICHA DE OBSERVACION

OBJETIVO: Identificar la sensibilidad del *Streptococcus pyogenes* frente a la concentración de 50%, 75% y 100% del extracto etanolico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Pachachamcua).

FUNDAMENTO: El método de difusión en agar cilindro – placa, basado en el trabajo de Kirby Bahuier, validado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) es utilizado para determinar el efecto antibacteriano de los antibióticos, como lo estipula la USP 40, en su apartado de pruebas biológicas (antibióticos valoración microbiológica).

INSTRUCCIONES: Realizar la medición con una regla o vernier en mm los halos de inhibición correspondiente de cada concentración de las placas y registrar los datos.

N° DE ENSAYOS	Concentración (%) del extracto etanolico de las hojas de <i>Clinopodium nubigenum</i> 100 ul			Control (+) Bacitracina 0.04
	50	75	100	
1				0.04
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
Promedio				

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

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACEUTICAS Y BIOQUIMICA
VALIDACION DE INSTRUMENTOS

1. DATOS GENERALES

1.1 Apellidos y Nombres del experto: Oscar Flores López

1.2 Cargo e institución donde labora: Docente, UIGV

1.3 Registro de colegio profesional: C.O.F.P. 1394

1.4 Nombre de instrumento: Instrumento de recolección de datos para determinar el efecto antimicrobiano del extracto etanolico de las hojas de *Clinopodium nubigenum* (Pachachamcua) frente a *Streptococcus pyogenes*.

Instrucciones: Luego de analizar el instrumento y cotajar 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	PUNTUACION				
		1	2	3	4	5
1. Claridad	El instrumento esta formulado 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 relacionar las variables en mención				X	
7. Consistencia	Se basa en aspectos técnicos científicos de la farmacia como bioquímica.					X
8. Coherencia	Existe coherencia y relación de los items, 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					X
	Total					X

2. OPINIÓN DE APLICABILIDAD: Muy Aceptable

3. PROMEDIO DE VALORACIÓN: 95%

Firma del Experto: [Firma] M^o Oscar Flores López

41-50	NO VALIDO, REFORMULAR
61-70	NO VALIDO, MODIFICAR
71-80	VALIDO, MEJORAR

