

**UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA**

**NUEVOS TIEMPOS, NUEVAS IDEAS**



**FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA**

**Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de  
*Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” en cepas  
de *Salmonella enterica typhimurium* in vitro**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO Y BIOQUÍMICO**

**TESISTAS**

**Bach. Gamero Polleri, Marco Antonio**

**Bach. Martínez Alcalá, Karen Lilibeth**

**ASESOR**

**Mg. Q.F. Casana Vargas, Carlos**

**Lima – Perú**

**2 0 1 9**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, por darme la oportunidad para desarrollar mis capacidades, adquirir nuevos conocimientos, formarnos profesionalmente y también como persona; así mismo a todos los docentes de la Facultad de Farmacia y Bioquímica que durante esta etapa de nuestra vida nos guiaron brindándonos sus conocimientos para poder alcanzar la meta propuesta.

A nuestro asesor de tesis Mg. Carlos Casana Vargas por su valioso apoyo, orientación y generosidad; por compartir su experiencia para desarrollar y culminar el presente trabajo.

A nuestros compañeros que estuvieron con nosotros, nos dieron su amistad, apoyo acompañándonos durante la carrera y hasta estos días.

**Karen Martínez y Marco Gamero**

## **DEDICATORIAS**

A Dios por darme la vida, por darme las fuerzas en todo momento y de esta manera cumplir con este objetivo que es uno de los más importantes en mi vida.

A mi hermano José Luis, que me dio el ejemplo para seguir adelante que Dios lo tenga en su gloria.

A mis padres Nicanor y Luz Amelia por estar a mi lado en las buenas y en las malas, depositando su confianza en mí, por brindarme sus valores.

**Marco Gamero**

El presente trabajo es dedicado a Dios por mantenerme bien de salud y darme las fuerzas necesarias para continuar con mi mayor objetivo.

A mi esposo Martin y a mi hija Ariana por ser mi fuente de inspiración por estar conmigo en todo momento brindándome apoyo, fuerza y por sus sabios consejos.

A toda mi familia, en especial a mi madre Elvia por apoyarme en todo momento y estar a mi lado e incentivarme a conseguir mis metas propuestas.

**Karen Martínez**

## INDICE DE FIGURAS

Figura 01: Planta de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts panizara” .....	12
Figura 02: Estructura básica de terpenos.....	14
Figura 03: Biosíntesis de terpenos.....	15
Figura 04: Fenol estructura básica de compuestos fenólicos.....	16
Figura 05: Estructura básica de flavonoides.....	17
Figura 06: Mecanismo de acción de los antibacterianos.....	22
Figura 07: Procedimientos experimentales.....	31
Figura 08: Selección de hojas y obtención de extractos.....	33
Figura 09: Reactivación de cepa de <i>Salmonella enterica typhimurium</i> .....	36
Figura 10: Análisis microbiológico.....	39
Figura 11: Evaluación del efecto antibacteriano.....	42

## INDICE DE TABLAS

Tabla 01: Operacionalización de variable.....	26
Tabla 02: Tamizaje fitoquímico.....	34
Tabla 03: Diámetro de halos en milímetros.....	38
Tabla 04: Resultados del Tamizaje fitoquímico.....	40
Tabla 05: Comparación de tamaño de halos de inhibición.....	41
Tabla 06: Prueba de efectos inter-sujetos.....	44
Tabla 07: Prueba de efecto inter-sujetos.....	45

## INDICE DE ANEXOS

Anexo 01: Matriz de consistencia.....	54
Anexo 02: Ficha técnica de bacteria <i>Salmonella enterica typhimurium</i> .....	55
Anexo 03: Constancia de la clasificación taxonómica de panizara.....	57
Anexo 04: Ficha de observación AD-HOC de recolección de datos de.....	58
tamizaje fitoquímico	
Anexo 05: Ficha de validación por juicio de expertos .....	59
Anexo 06: Ficha de observación ad-hoc de recolección de datos de.....	62
estudio microbiológico.	
Anexo 07: Ficha de Validación por Juicio de Expertos.....	63
Anexo 08: Matriz de Validación por Juicio de Expertos.....	65
Anexo 09: Materia prima y extracción .....	66
Anexo 10: Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas.....	68
secas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts “panizara”.	
Anexo 11: Análisis microbiológico.....	69

## RESUMEN

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo principal determinar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” procedentes de Áncash. Se obtuvo un extracto hidroalcohólico de hojas secas mediante el método de maceración, el análisis microbiológico del efecto antibacteriano se analizó utilizando el método Kirby Bauer con cepas de *Salmonella enterica typhimurium* ATCC 14028 y utilizando el extracto en concentraciones preparadas de 33 por ciento, 43 por ciento y 50 por ciento; los cuales fueron contrastadas con medicamentos antibacterianos como cloranfenicol, ciprofloxacino y trimetoprima más sulfametoxazol. Se realizó un tamizaje fitoquímico para poder determinar de forma cualitativa la presencia de metabolitos. Se obtuvo como resultado la formación de halos de inhibición de las concentraciones de 33 por ciento, 43 por ciento y 50 por ciento siendo el diámetro de los halos de inhibición de 22 mm, 24 mm, 28 mm respectivamente; en el tamizaje fitoquímico se identificó la presencia de taninos, compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides, quinonas y azúcares. Se comprobó que la concentración al 50 por ciento presentó mayor efecto antibacteriano que las otras concentraciones, sin embargo el efecto antibacteriano fue menor en comparación con los medicamentos antibacterianos utilizados.

Palabras claves. Extracto hidroalcohólico, *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts, efecto antibacteriano, *Salmonella enterica typhimurium*.

## ABSTRACT

The main objective of this research was to determine the antibacterial effect of the hydroalcoholic extract of the dried leaves of *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” from Ancash. A hydroalcoholic extract of dried leaves was obtained by the maceration method, the microbiological analysis of the antibacterial effect was analyzed using the Kirby Bauer method with *Salmonella enterica typhimurium* ATCC 14028 strains and using the extract in prepared concentrations of 33 percent, 43 percent and 50 percent; which were contrasted with antibacterial drugs such as chloramphenicol, ciprofloxacin and trimethoprim plus sulfamethoxazole. Phytochemical screening was carried out in order to qualitatively determine the presence of metabolites. The result was the formation of halos of inhibition of the concentrations of 33 percent, 43 percent and 50 percent, with the diameter of the halos of inhibition being 22 mm, 24 mm, 28 mm respectively; in the phytochemical screening the presence of tannins, phenolic compounds, alkaloids, flavonoids, quinones and sugars was observed. It was found that the concentration at 50 percent had a greater antibacterial effect than the other concentrations, however the antibacterial effect was lower compared to the antibacterial drugs used.

Keywords. Hydroalcoholic extract, *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts, antibacterial effect, *Salmonella enterica typhimurium*



## INDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE TABLAS

INDICE DE ANEXOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	2
1.1. Descripción de la Realidad Problemática	2
1.2. Formulación del problema	3
1.2.1. Problema general	3
1.2.2. Problemas específicos	4
1.3. Objetivos	4
1.3.1. Objetivo general	4
1.3.2. Objetivos específicos	4
1.4. Justificación e importancia del estudio.	5
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	7
2.1. Antecedentes del estudio	7
2.1.1. Nacionales	7
2.1.2. Internacionales	9
2.2. Bases teóricas	12
2.2.1. Descripción de la planta de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts “panizara”.	12
2.2.2. Identificación taxonómica	13
2.2.3. Características de la planta	13
2.2.4. Usos medicinales	13

2.2.5. Metabolitos secundarios _____	13
2.2.6. Tipos de metabolitos secundarios _____	14
2.2.7. Extracción: _____	17
2.2.8. Proceso de maceración: _____	17
2.2.9. Enfermedades bacterianas alimentarias _____	18
2.2.10. Salmonella _____	18
2.2.11. Salmonelosis _____	18
2.2.12. Patogenia _____	18
2.2.13. Sintomatología de la salmonelosis: _____	19
2.2.14. Prueba de susceptibilidad _____	19
2.2.15. Antimicrobiano _____	19
2.2.16. Clasificación de antimicrobianos _____	19
2.2.17. Antibacterianos _____	20
2.2.18. Clasificación de antibacterianos según el mecanismo de acción _____	20
2.2.19. Cloranfenicol _____	22
2.2.20. Mecanismo de acción de Cloranfenicol _____	23
2.2.21. Toxicidad _____	23
2.2.22. Trimetoprima y sus asociaciones _____	23
2.2.23. Mecanismo de acción _____	23
2.2.24. Toxicidad _____	24
2.2.25. Ciprofloxacino _____	24
2.2.26. Mecanismo de acción _____	24
2.2.27. Método Kirby Bauer: _____	24
2.3. Formulación de las hipótesis _____	25
2.3.1. Hipótesis general _____	25
2.3.2. Hipótesis específicas _____	25
2.4. Variables _____	25
2.4.1. Operacionalización de Variables e indicadores _____	25
2.5. Marco Conceptual _____	26
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA _____	28
3.1. Tipo de estudio _____	28
3.1.1. Según su nivel _____	28

3.1.2. Según la planificación de toma de datos _____	28
3.2. Diseños de investigación _____	28
3.3. Población _____	28
3.4. Muestra _____	29
3.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos _____	29
3.6. Descripción de instrumentos _____	29
3.7. Procesamiento de datos _____	29
3.8. Equipos materiales y reactivos _____	30
3.8.1 Muestras biológicas _____	30
3.8.2 Materiales, instrumentos y equipos _____	30
3.8.3 Reactivos _____	30
3.9. Procedimientos experimentales _____	30
3.9.1. Recolección de las hojas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts “panizara”. _____	32
3.9.2. Obtención del extracto hidroalcohólico _____	32
3.9.3. Tamizaje fitoquímico _____	34
3.9.4. Preparación de las concentraciones del extracto _____	35
3.9.5. Reactivación de cepas de <i>Salmonella enterica typhimurium</i> _____	36
3.9.6. Análisis microbiológico _____	36
CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS _____	40
4.1. Procesamiento de resultados _____	40
4.1.1. Tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de secas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts “panizara”. _____	40
4.1.2. Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de secas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts “panizara”. _____	41
4.2. Contrastación de hipótesis _____	42
4.2.1. Contraste de hipótesis _____	46
4.2.2. Prueba de hipótesis _____	46
4.3. Discusión de resultados _____	46
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES _____	48

5.1. Conclusiones	48
5.2. Recomendaciones	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
ANEXOS	54

## INTRODUCCIÓN

Actualmente se utilizan plantas conocidas empíricamente por sus propiedades medicinales, en muchas ocasiones siendo este el principal o único tratamiento que conocen en diferentes zonas rurales del Perú, los cuales pueden resultar como un tratamiento opcional y con mayores beneficios frente a diversas enfermedades.

El uso de plantas medicinales en el tratamiento de diferentes patologías estomacales y respiratorias, utilizadas generalmente en forma de infusión o preparaciones artesanales, conlleva a realizar estudios sobre las diferentes propiedades farmacológicas propias de los metabolitos secundarios presentes en las plantas y desarrollar productos que sean eficaces y seguros en el tratamiento de infecciones y que puedan ser una mejor opción frente a los tratamientos antibacterianos convencionales. Se conoce que el Perú tiene una diversidad de recursos naturales; que requieren del interés científico, debido a que en muchas zonas la medicina tradicional es el único tratamiento que se conoce frente a diversas patologías, es importante continuar con las investigaciones sobre las posibles propiedades terapéuticas que nos ofrece la medicina natural. La finalidad de la presente investigación se basó en la necesidad de determinar la acción antibacteriana de la planta, siendo una solución natural y más segura en comparación con los medicamentos antibacterianos sintéticos.

En esta investigación se experimentó in vitro el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” mediante el método de Kirby Bauer en placas sembradas con la bacteria salmonella entérica con el objetivo de buscar una acción antibacteriana del fitofármaco a diferentes concentraciones, e identificación los metabolitos secundarios con mayor presencia en el extracto.

## CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

### 1.1. Descripción de la Realidad Problemática

El Perú cuenta con una amplia variedad de plantas medicinales, que poseen metabolitos secundarios con acciones farmacológicas, las cuales son utilizadas comúnmente para calmar malestares o como tratamientos de diferentes enfermedades en diferentes partes del país.

En la vía intestinal de los animales se encuentran diferentes tipos de bacterias, siendo la más común la Salmonella, la cual utiliza los intestinos de los animales como reservorios; la Salmonella es una bacteria de tipo Gram negativa G (-), esta bacteria también se puede encontrar en aguas, alimentos o suelos contaminados, si ésta bacteria entra en contacto con el hombre pueden desarrollar diferentes infecciones gastrointestinales; infecciones que se desarrollan mayormente en niños.

En el Perú el Ministerio de Salud por medio de Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades reportan los casos de salmonelosis producidos en el Perú. Mediante la notificación sanitaria se reporta en el Perú algún tipo de brote epidemiológico producido por Salmonella entérica, el cual es considerado como un patógeno que se encuentran frecuentemente en alimentos contaminados. <sup>(1)</sup>

Uno de las causas más comunes es el hacinamiento, falta de servicios básicos como el agua, siendo los niños menores de 5 años los más afectados con estas infecciones bacterianas; de la misma forma se considera la descomposición de los alimentos, mala manipulación de alimentos por parte del personal que sea portador de la bacteria y/o mala conservación de alimentos. <sup>(2)</sup>

De acuerdo a los reportes que se obtuvieron durante el año 2016 en el Perú, indicaron que durante los meses de Setiembre y Abril hubo un

número de 56 brotes, indicando las zonas de Lima, Callao y Cusco, donde hubo más incidencias, considerando a la *Salmonella* como el agente principal causante de estos brotes. (2)

Los medicamentos antibacterianos más utilizados actualmente presentan reacciones adversas que pueden afectar otros órganos, siendo este otra problemática en la salud del paciente, llevando a los investigadores a buscar nuevas opciones más seguras y menos costosas para lograr hacer frente a las infecciones bacterianas.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), nos informa que las enfermedades de transmisión alimentaria son considerables: indicando que el consumo de alimentos contaminados son la causa más común de las enfermedades diarreicas. La *Salmonella* es considerada una de las cuatro causas principales de enfermedades diarreicas a nivel mundial. (3)

Por tanto, se considera el uso del *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” como una opción de tratamiento en casos de infecciones bacterianas, siendo ya muy utilizada en diferentes partes del Perú debido a sus efectos curativos en casos de infecciones bacterianas, malestares estomacales y resfriados, consumido en forma de emoliente o infusión, siendo una alternativa antibacteriana de fácil acceso y bajo costo frente a medicamentos sintéticos que en muchos casos son de difícil acceso para poblaciones alejadas o de escasos recursos económicos.

## **1.2. Formulación del problema**

### **1.2.1. Problema general**

- ¿El extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” tendrá efecto antibacteriano en cepas de *Salmonella enterica typhimurium* in vitro?

### 1.2.2. Problemas específicos

- ¿El extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts (panizara) presentará metabolitos secundarios?
- ¿Cuál será la concentración óptima del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts (panizara) que presentará un mayor efecto antibacteriano en cepas de *Salmonella enterica typhimurium*, in vitro?
- ¿Cuál será el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts (panizara) comparado con antibióticos como cloranfenicol, ciprofloxacino y trimetoprima más sulfametoxazol en cepas de *Salmonella enterica typhimurium*, in vitro?

### 1.3. Objetivos

#### 1.3.1. Objetivo general

- Determinar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” en cepas de *Salmonella enterica typhimurium* in vitro.

#### 1.3.2. Objetivos específicos

- Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts.
- Determinar la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” con mayor efecto antibacteriano en cepas de *Salmonella enterica typhimurium*, in vitro.



- Comparar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” con antibióticos como cloranfenicol, ciprofloxacino y trimetoprima más sulfametoxazol en cepas de *Salmonella enterica typhimurium* in vitro.

#### 1.4. Justificación e importancia del estudio.

El manejo terapéutico de la enfermedad bacteriana ha sido motivo de interés en el campo farmacéutico. Durante muchos años, se han probado diferentes alternativas para tratar la sintomatología propia de las enfermedades producidas por bacterias, iniciando con métodos muy rudimentarios al usar infusiones de diversas plantas para tratar las infecciones causadas por bacterias. Posteriormente se dio paso al uso de antibióticos siendo el *penicillium notatum* el primer hongo que se utilizó para tratar infecciones bacterianas, luego se utilizaron antibióticos sintéticos tales como los sulfas, aminoglucósidos y quinolonas.

Con el paso del tiempo y el desarrollo constante de la ciencia y la tecnología los profesionales de salud buscan nuevas alternativas, debido a que las bacterias empiezan a crear resistencia antibacteriana y los antibióticos usados en mayores concentraciones son mucho más tóxicos para el paciente.

El objetivo de todo personal de salud es la búsqueda del fármaco ideal, aquel que logre combatir el cuadro infeccioso producido por bacterias, así como disminuir la resistencia bacteriana y principalmente que no presente alta toxicidad para el paciente.

Actualmente hay una alerta emitida por parte de la Organización Mundial de la salud en donde Tedros Adhanom Ghebreyesus, director general de la OMS, indicó que “la resistencia a los antibióticos se ha vuelto un gran retroceso en la medicina moderna, tornándose un problema de salud a nivel mundial. Las

inversiones en investigación y desarrollo deberían ser mayores para disminuir estas resistencias a antibióticos”. (4)

En el Perú se encuentra gran diversidad de productos naturales que son muy efectivos en el tratamientos de diversas enfermedades entre ellas tenemos al árbol de la Quina (*Cinchona officinalis*), la cual científicamente se comprobó su eficacia en el tratamiento del paludismo; así como la no menos conocida uña de gato (*Uncaria tomentosa*), ambas originarias de la Amazonía Peruana

Aún existe gran cantidad de plantas que empíricamente se indican para el tratamiento natural de algunas enfermedades o malestares gastrointestinales, observando una disminución de efectos no deseados, así como una disminución en los costos del tratamiento en comparación con medicamentos de origen sintético; llegando a ser una alternativa ideal y de costos reducidos.

En consecuencia, se considera que la propuesta de elaborar una solución de extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” se logrará un efecto antibacteriano en cepas de *Salmonella entérica typhimurium*, siendo una opción en el tratamiento de enfermedades infecciosas producidas por bacteria *Salmonella enterica typhimurium*.

## CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Antecedentes del estudio

Actualmente se encuentra diversos estudios científicos de los beneficios y propiedades de diversas plantas, los cuales son de gran ayuda en el área farmacológica, debido a que permiten ampliar el conocimiento de nuevas opciones terapéuticas.

En el caso de plantas oriundas del Norte del Perú, se encuentra una gran variedad de estudios científicos, para tratar de investigar y comprobar sus diferentes propiedades farmacológicas y de sus posibles efectos antibióticos. Una de las plantas que se investiga sus efectos terapéuticos es la especie de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”.que empíricamente lo utilizan para problemas gastrointestinales y de vías respiratorias.

#### 2.1.1. Nacionales

**Cahuapoma–Yance M, et al (2014).** En su investigación “Composición química, actividad antioxidante y toxicidad aguda del aceite esencial de *Satureja pulchella* “panizara”. Indica, que “obtuvieron aceite esencial de *satureja pulchella* mediante el método de arrastre de vapor, determinaron la actividad antioxidante con el método del radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo), y la determinación de la toxicidad aguda con el método de Dosis Límite, su resultado presentado fue que el aceite esencial de *Satureja pulchella* presenta actividad antioxidante y una ligera toxicidad aguda, esto debido a la estructura química del aceite esencial” (5)

**Mendoza Y, et al (2015).** En su tesis de pregrado “Efecto del aceite esencial de *Satureja pulchella* sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*”. Indica que “obtuvieron el aceite esencial de las hojas *Satureja pulchella* utilizando el método de hidrodestilación, determinaron la actividad antibacteriana utilizando diferentes concentraciones del aceite esencial obtenido y el método de difusión en agar en pocillo,

realizaron una comparación con los antibióticos cloranfenicol y vancomicina; obteniendo como resultado que el aceite esencial presentaba un efecto inhibitorio en todas las concentraciones, siendo la mayor la concentración al 100%, obteniendo los siguientes tamaños de halo en el caso de *E. coli* fue de 23,60 mm y el tamaño del halo para *B. cereus* fue de 57,40mm” (6)

**Valverde Rojas M, et al. (2015)** En su tesis de pregrado “Evaluación in vivo del efecto cicatrizante de una crema dérmica óleo/acuosa (o/w) elaborada a partir del aceite esencial obtenida de las hojas frescas de *Clinopodium pulchellum* "panizara" en la ciudad de Huacho de febrero a julio del 2015” Indican que “utilizaron el método de arrastre de vapor de agua para la obtención de aceite esencial; para verificar el efecto cicatrizante en ratones hembras utilizaron un dinamómetro para reabrir una herida, concluyeron que obtuvieron mejor efecto cicatrizante mediante estadística descriptiva e inferencial usando prueba de Levene, ANNOVA one way o de un factor y prueba post hoc de TUKEY con un nivel de confianza del 95% y error relativo del 5%”. (7)

**Toche Tuesta A et al. (2017).** En su investigación “Estructura química de compuestos fenólicos del extracto etanólico de hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panisara””. Indican que “para la identificación fitoquímica realizaron ensayos de solubilidad, tamizaje fitoquímico, cromatografía en capa fina y espectroscopía UV/VIS. Para determinar la actividad antioxidante usaron la prueba de 1,1-difenil-2-picrilhidracilo (DPPH)”, como resultado propusieron la estructura química de 7 metabolitos secundarios tipo flavonas que podrían explicar una posible acción antioxidante del extracto etanólico de hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panisara”. (8)

**Chipa A, Ruiz A et al,(2018)** en su investigación “Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro del extracto hidroalcoholico de las hojas y flores de *satureja pulchella* (panisara) en cepas de *staphylococcus aureus* y *staphylococcus epidermidis*” hallaron metabolitos secundarios como alcaloides, flavonoides y compuestos fenólicos. Mediante el

método de microdilución se determinó que en las 17 concentraciones del extracto investigado, solo la concentración más alta (presentó CMI =32768 µg/mL), frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228. Mediante el método de recuperación por contaminación directa se evidenció que si bien a la concentración de 100 mg/mL del extracto hidroalcohólico de las partes de la hoja y las flores de *Satureja pulchella* (Panisara), contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, hubo una disminución logarítmica de las concentraciones de niveles evaluados; dicha actividad antibacteriana si se encuentra limitada” (9)

### 2.1.2. Internacionales

**G. Opalchenova & D. Obreshkova (1999)** En su investigación “Acción antibacterial de extractos de planta curativa *Clinopodium vulgare* L. refiere que “las plantas curativas eran utilizadas durante las guerras con el fin de curar heridas, investigaron la actividad antibacteriana sobre bacterias gran positivas y gran negativas provenientes de un urocultivo y consideradas bacterias multiresistentes, obtuvieron un extracto realizado con etanol y propilenglicol, utilizándolo en una concentración al 5%. Sus resultados fueron positivos frente a estas bacterias”

**Martino, Virginia, et al (2000)** En su investigación “Los flavonoides como promisorios agentes preventivos y terapéuticos” Indica que los flavonoides presenta numerosas actividades biológicas tales como propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, etc; siendo de mayor interés sus actividades antioxidantes y antiinflamatorias de estos compuestos y sus metabolitos. Debido a sus propiedades biológicas podrían cumplir una importante función protectora sobre las enfermedades cardiovasculares y en ciertas formas de cáncer” (10)

**De la Cruz Paredes M; Gastelum F, et al (2007)** En la investigación “Efecto antimicrobiano del Orégano Mexicano (*lippia berlandierischauer*) y de su aceite esencial sobre cinco especies del género *vibrio*”, nos presentan una “determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias y bactericidas del orégano en polvo y de su aceite esencial con diferentes concentraciones de timol y carvacrol resultando un efecto antimicrobiano favorable sobre las cinco especies de *Vibrio*, las cuales no presentaron diferencias significativas entre ellas en las concentraciones inhibitorias y bactericidas de los aceites esenciales. Las concentraciones (CMI y CMB) obtenidas para el orégano fueron de 1.5 a 2.5 y de 100 a 200 mg L<sup>-1</sup> para los diferentes aceites esenciales” (11)

**Carrillo, ML; N. Castillo L; Mauricio R. et al. (2011)** En su investigación “Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México)” indican que utilizaron “extracto etanólico y acuosos de propóleos para determinar la actividad antimicrobiana. Utilizaron cepas de microorganismos Gram negativos: *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* y *Klebsiella pneumoniae*; y microorganismos Gram positivos: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Streptococcus agalactiae*. La concentración mínima bactericida (CMB) fue determinada mediante el método de dilución en tubo. Como resultados determinaron que la actividad antibacteriana fue mayor en el caso de extractos etanólico en comparación con los extractos acuosos, esta actividad bacteriana dependería de su procedencia y de la especie bacteriana analizada” (12)

**Musmeci R, Lezcano MT, et al. (2015)** en su investigación “Acción antimicrobiana del gel de áloe vera sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *candida albicans*” indicaron el uso del método Kirby Bauer en el estudio in vitro, utilizando 2 especies de Aloe (*Vera* y *Arborecens*), utilizaron “soluciones etanol/gel y agua/gel en diferentes concentraciones obteniendo como resultado que las soluciones agua/gel de ambas especies no evidenciaron inhibición bacteriana ni micótica en las muestras analizadas, sin embargo las

soluciones gel/etanol de la especie *Aloe vera* si se evidencio efecto inhibitorio en 10 muestras investigadas; mientras que la solución gel/etanol de *Aloe arborescens* no evidencio efecto inhibitorio en ninguna muestra analizada” (13)

**Junod López, TL, et al (2010)** en su tesis “Susceptibilidad a antibióticos en cepas de *Salmonella entérica* de origen animal y alimentario” realizaron investigaciones sobre salmonellas de origen animal y alimenticio; aislaron la bacteria con métodos microbiológicos tradicionales y determinaron la resistencia bacteriana utilizando el método Kirby-Bauer; así como la concentración mínima inhibitoria; obteniendo como resultado que la Oxitetraciclina presento mayor tasa de resistencia en ambas cepas aisladas, las cepas de alimentos predominantes fueron *S. Derby* y *S. Senftenberg* las cuales son frecuentes en alimentos para animales; mientras que los predominantes de origen animal son *S. Infantis* y *S. GRUPO E*” (14)

**Fonseca Chasipanta, EA, et al. (2016)** En su investigación “Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de sunfo (*Clinopodium nubigenum* (KUNTH) KUNTZE) frente a patógenos de enfermedades respiratorias (*Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC: 19615, *Streptococcus pneumoniae* ATCC: 49619 Y *Streptococcus mutans* ATCC: 25175” los investigadores realizaron la destilación por arrastre de vapor, para la obtención del aceite esencial; para determinar la actividad antibacteriana utilizaron cuatro tipos de bacterias que producen enfermedades respiratorias; prepararon diferentes concentraciones del aceite esencial y realizaron pruebas in vitro por difusión de pozos, como control positivo designaron la Penicilina Clemizol; obteniendo como resultados una formación de halo de inhibición para *S. aureus* ATCC: 25923 a 5% y 2.5% de aceite esencial, para *S. mutans* ATCC: 25175 al 0.15%, para *S. pyogenes* ATCC: 19615 al 2.5% y 0.3% y para *S. pneumoniae* ATCC: 49619 al 2.5% y 0.3% estadísticamente presentando una efectividad menor comparado con el control positivo” (15)

## 2.2. Bases teóricas

### 2.2.1. Descripción de la planta de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”.

La planta de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts conocida regularmente como “panizara o limoncillo” es un arbusto propio de la Cordillera Occidental de los Andes situada en el departamento de Áncash, este arbusto se encuentra entre 2800 a 3500 m.s.n.m.<sup>(16)</sup> <sup>(17)</sup>



Figura 01: Planta de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”.

Fuente: Panizara. plantas medicinales de Áncash. Instituto Superior de educación público Huaraz.



### 2.2.2. Identificación taxonómica

- DIVISIÓN: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Asteridae
- Orden: Lamiales
- Familia: Lamiaceae
- Género: Clinopodium
- Especie: *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts.
- Nombre Vulgar: “Panizara”

Sinónimos: *Gardoquia pulchella* Kunth (1818), *Satureja pulchella* (Kunt) (1896)

### 2.2.3. Características de la planta

*Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” es un arbusto que pertenece a la familia de Lamiaceae, presenta un tallo delgado muy ramificado con hojas pequeñas de forma acorazonada y dentadas de color verde, así como flores pequeñas con cinco pétalos; se encuentra distribuida en laderas rocosas. <sup>(16)</sup> <sup>(17)</sup>

### 2.2.4. Usos medicinales

La planta de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”, es conocida tradicionalmente por su efectividad para combatir trastornos digestivos, debido a su aroma los pobladores lo utilizan para el tratamiento de resfríos. <sup>(16)</sup>

### 2.2.5. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios juegan un rol importante en la supervivencia, proporcionando un medio químico de defensa y atracción hacia las especies polinizadoras; las plantas permanentes como los

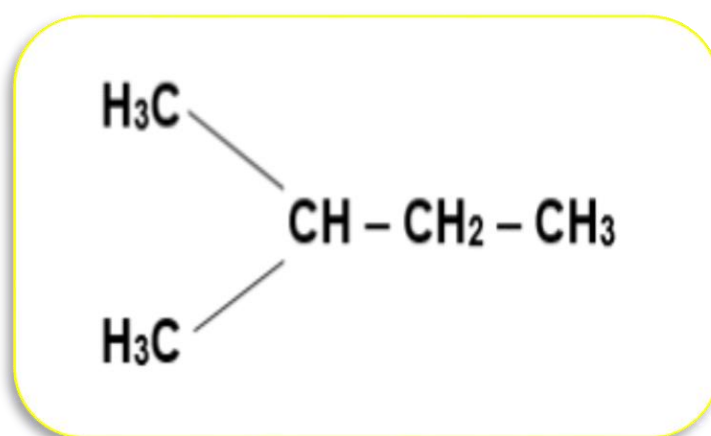
árboles y arbustos posees mayor cantidad de metabolitos secundarios.

(18)

### 2.2.6. Tipos de metabolitos secundarios

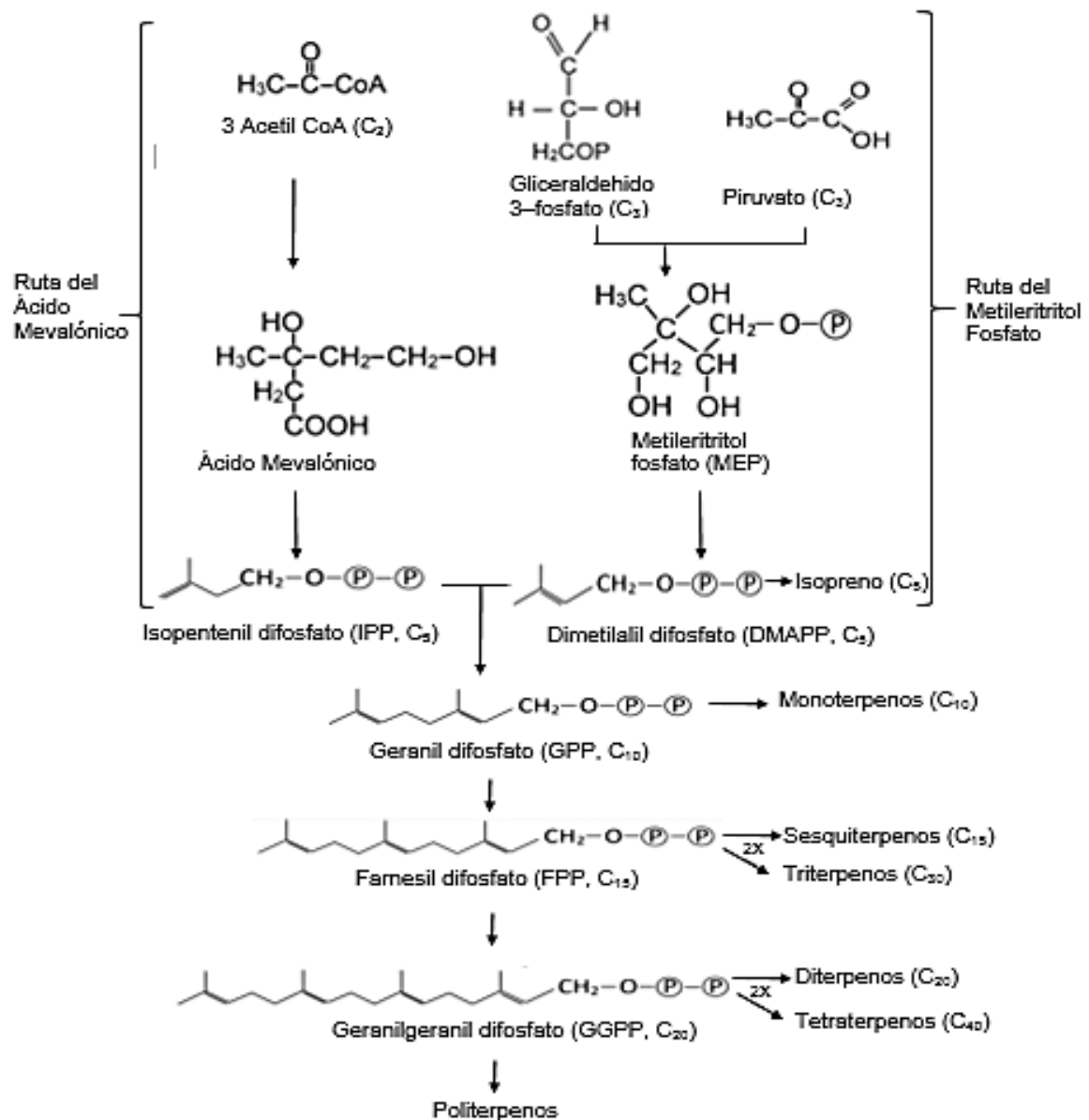
**Terpenos o terpenoides:** representan al mayor grupo de metabolitos secundarios, generalmente son insolubles en agua y biosintetizados a partir de acetilcoenzima A o de intermediarios glicolíticos. Los terpenos derivan de la unión de cinco carbonos que tienen el esqueleto carbonado ramificado del isopentano. Cláudio Viegas Júnior en su investigación “Terpenos con actividad insecticida: una alternativa para el control químico de insectos” hace referencia a la funcionalidad de los terpenos en la protección de la planta frente a diferentes plagas que amenazan su desarrollo. (19) considerando a los terpenos como una mejor opción de control ecológico de plagas.

(20)



**Figura 02:** Isopentano - Estructura básica de terpenos

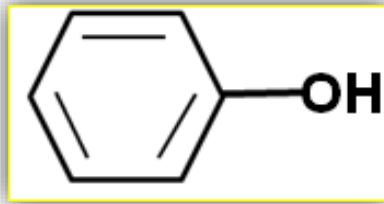
Fuente: Fisiología vegetal Taiz, L, Zeiger, E. pag 530



**Figura.03-** Biosíntesis de terpenos. Las unidades básicas de 5 carbonos de los terpenos pueden sintetizarse por dos rutas diferentes. Los intermedios fosforilados, IPP y DMAPP, se combinan para formar terpenos de 10, de 15 carbonos y mayores.

Fuente: Fisiología vegetal Taiz, L, Zeiger, E. pag 531

**Compuestos fenólicos:** son sustancias que contienen un grupo fenol, un grupo funcional hidroxilo en un anillo aromático. Algunos compuestos fenólicos son solubles solo en solventes orgánicos, mientras otros son solubles en agua. Por su diversidad química a los fenoles se le atribuyen diversas funciones en la defensa de las plantas contra herbívoro o patógeno; así como la polinización de los frutos o reducción de plantas cercanas. (20)

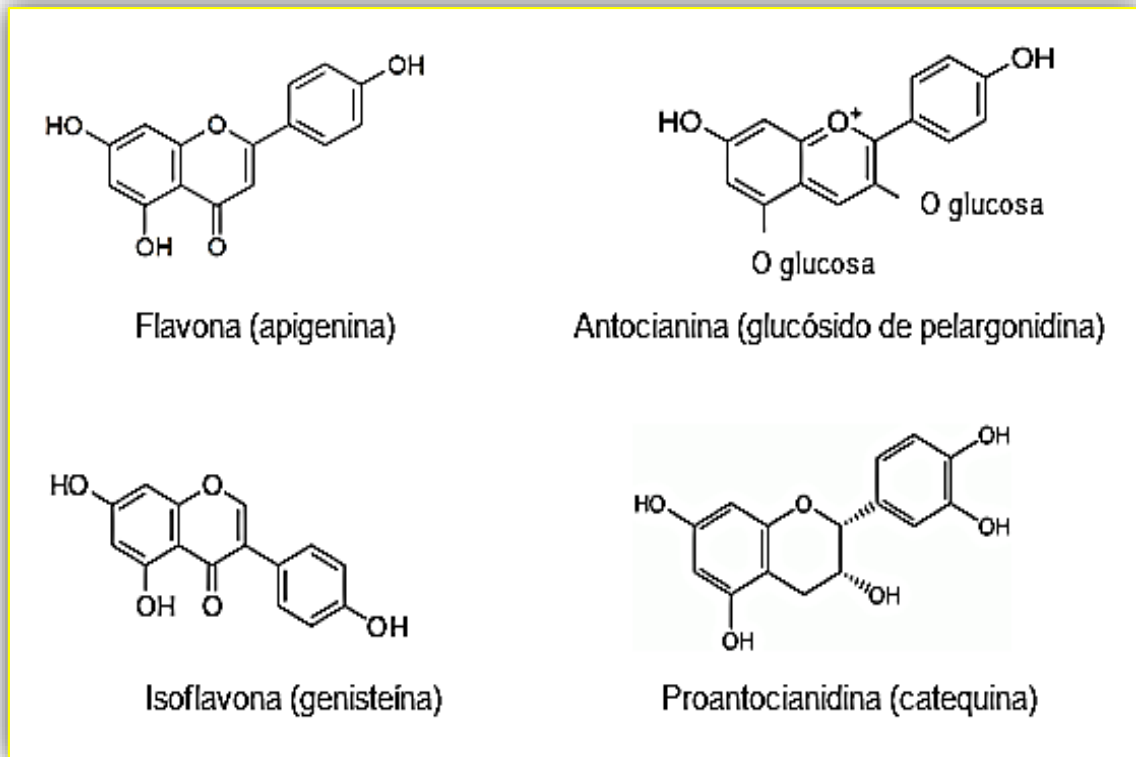


**Figura. 04 FENOL**

Estructura básica de compuestos fenólicos

Fuente: Fisiología vegetal Taiz, L, Zeiger, E. pag 533

**Flavonoides:** son las sustancias responsables de una gran parte de la pigmentación de los vegetales. Poseen dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono. Las flavonas son los flavonoides más comunes, los antocianos se encuentran como glucósidos y los isoflavonoides se encuentran en menor cantidad en las plantas. Sus principales funciones de los flavonoides son para el desarrollo y defensa frente a microorganismos tanto de bacterias, hongos o virus, insectos u otros animales herbívoros. (20)



**Figura. 05:** Estructura básica de flavonoides.

Fuente: Fisiología vegetal Taiz, L, Zeiger, E. pag 534

### 2.2.7. Extracción:

La extracción implica la separación de fracciones ya sea de tejidos animales o vegetales, utilizando solventes selectivos; con la finalidad de obtener las drogas activas. (21)

### 2.2.8. Proceso de maceración:

Consiste en poner en contacto el solvente con la parte del vegetal de la cual se desea obtener la droga, este proceso es durante varios días, con agitación ocasional, la cual puede realizarse a temperatura ambiente dando como resultado un equilibrio de concentración entre la droga y el solvente y depende de algunos factores que se

encuentran unidos a la droga; una gran desventaja de este método es la lentitud del proceso y el hecho de no ser posible alcanzar la extracción total de la droga deseada. (22)

### **2.2.9. Enfermedades bacterianas alimentarias**

Las enfermedades bacterianas de tipo alimentario resultan de la presencia de bacterias o toxinas presentes en un alimento y actúan cuando son ingeridas, estas bacterias pueden multiplicarse invadiendo el organismo del huésped. (23)

#### **2.2.10. Salmonella**

Las salmonellas son bacterias gram negativas flageladas que causan una gastroenteritis auto limitada, transmitida por alimentos y por agua (*S. enteritidis*, *S. typhimurium* y otros). Las principales fuentes de Salmonella son las carnes de vaca y de pollo, contaminadas con heces e insuficientemente lavadas y cocinadas. (28)

#### **2.2.11. Salmonelosis**

La salmonelosis es considerada una de las causas más importantes de gastroenteritis, siendo los animales los principales reservorios, así como, la fuente de infección más frecuente son sus derivados de estos animales. (24) Las personas que presentan más susceptibilidad frente a la *Salmonella* son los infantes, ancianos y personas inmunocomprometidas. (25)

#### **2.2.12. Patogenia**

Salmonella invade las células epiteliales intestinales. La invasión de las células epiteliales intestinales está controlada por genes de invasión, inducidos por la baja tensión de oxígeno presente en el intestino. El sistema nervioso entérico también es un regulador crítico de la secreción de líquido en el intestino normal. Las vías reflejas

neurales aumentan la secreción de líquido epitelial en respuesta a los patógenos entéricos, como Salmonella. (28)

#### **2.2.13. Sintomatología de la salmonelosis:**

Los síntomas como los cuadros febriles generalmente aparecen entre las 12 y 36 horas luego de ingerir un alimento contaminado; existen datos de salmonelosis con periodos de incubación entre 3 a 5 horas, estos periodos cortos se asocian con altas dosis de especie *Salmonella* o con una mayor sensibilidad del individuo afectado.(23)

#### **2.2.14. Prueba de susceptibilidad**

Los resultados de la prueba de susceptibilidad antimicrobiana in vitro son realizados para seleccionar los agentes quimioterápicos activos contra el germen causal. Los estudios in vitro son un reflejo del efecto del antibiótico frente a los microorganismos en condiciones de laboratorio. La selección de antibióticos y su efecto en el paciente están influidos por una variedad de factores interrelacionados entre sí, que incluyen las propiedades farmacocinéticas del fármaco, la toxicidad, la enfermedad y la situación clínica general del paciente. (28)

#### **2.2.15. Antimicrobiano**

Los antimicrobianos son sustancias que pueden producir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias, virus u hongos (30), Son activos ante los microorganismos en bajas concentraciones y tener una toxicidad mínima para el hospedador. (30)

#### **2.2.16. Clasificación de antimicrobianos**

Para la clasificación de los antimicrobianos se consideran diferentes criterios, por su origen están los antibióticos o quimioterápicos, por su estructura química, por su actividad, por su efecto antimicrobiano o por su mecanismo de acción. (30)

### 2.2.17. Antibacterianos:

Son las sustancias que ejercen su acción sobre las bacterias. Si actúan selectivamente sobre alguna especie, género o grupo reducido de géneros se consideran de espectro reducido, los que son activos frente a un amplio número de microorganismos son de amplio espectro. Por su efecto antibacteriano pueden ser bacteriostáticos o bactericidas. (30)

### 2.2.18. Clasificación de antibacterianos según el mecanismo de acción:

Se pueden agrupar según su mecanismo de acción:

- **Antibacterianos que inhiben la síntesis de la pared celular:** La droga se fija a la pared celular de la bacteria cuando se encuentra en proceso de división, de esta forma inhibe los sistemas enzimáticos encargados de la formación del peptidoglucano (componente principal de la pared bacteriana), la bacteria se hace osmóticamente sensible penetrando líquido en el interior de la célula produciendo lisis celular. En este grupo se encuentran las penicilinas, cefalosporinas, bacitracina, cicloserina y vancomicina. (31)
- **Los que alteran la permeabilidad de la membrana celular:** En la membrana celular existen sistemas enzimáticos vitales que regulan la entrada y salida de elementos nutritivos, el antibacteriano al fijarse a la membrana produce el escape de proteínas y nucleótidos vitales para la bacteria, lo cual produce daño o muerte celular. Los antibacterianos con este mecanismo de acción son polimixina B, colistina, nistatina y anfotericina B. (31)
- **Los que actúan en el ribosoma inhibiendo la síntesis proteica:** Estas drogas actúan sobre los ribosomas bloqueando la síntesis de proteínas, afectando la sobrevivencia de la bacteria. En este grupo se



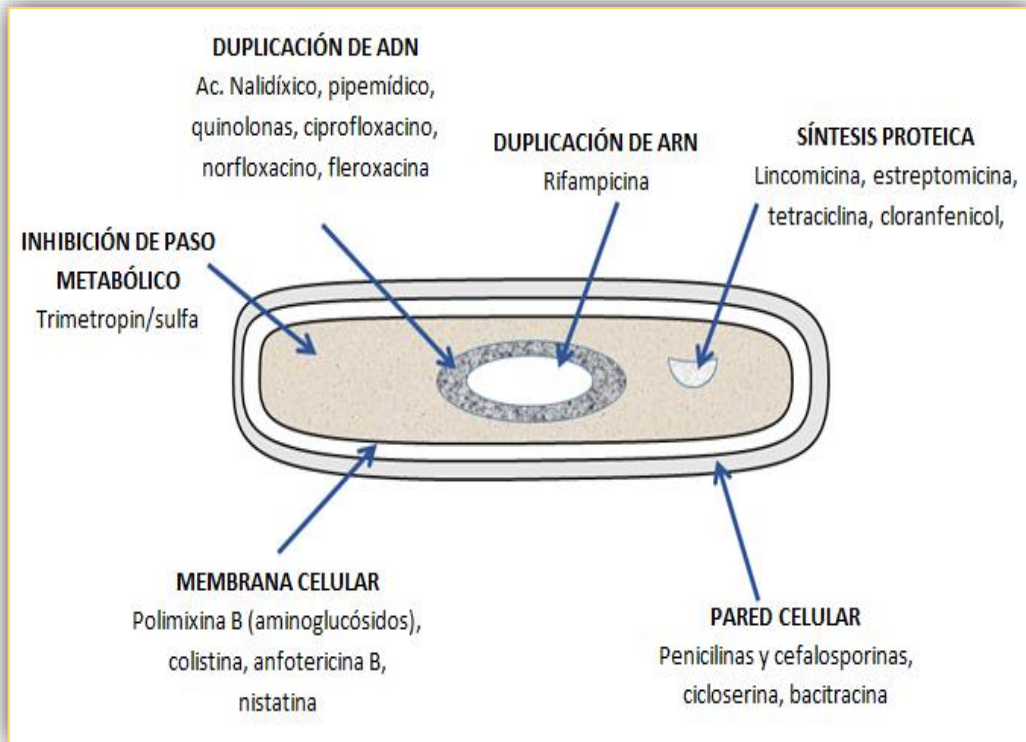
encuentran cloranfenicol, tetraciclinas, aminoglucósidos, rifampicina, eritromicina y lincomicina. (31)

- **Los que bloquean la síntesis de los ácidos nucleicos:** la droga ingresa al interior de la célula inhibiendo la formación de los ácidos nucleicos, especialmente el ADN, esenciales para la vida celular. Griseofulvina y ácido nalidíxico presentan este mecanismo de acción.

(31)

- **Los que inhiben la duplicación del ARN:** El ácido ribonucleico es el encargado de transcribir la información del ADN, el cual es necesario para una síntesis proteica normal; la droga inhibe la enzima RNAPolimerasa bacteriana fundamental en la síntesis de RNAmensajero, impidiendo de esta forma la etapa de transcripción de la síntesis proteica bacteriana.(31)

- **Inhibición del paso metabólico:** La Trimetoprima y sulfonamidas actúan como anti metabolito de los folatos e inhibe la enzima dihidrofolatorreductasa y se combina con ella en competición de sustrato, de manera que se produce una carencia de tetrahidrofolato y de coenzimas necesarias para la formación del ADN, indispensable para el crecimiento microbiano. Estas drogas actúan a diferentes niveles en la misma vía metabólica en forma secuencial y en distintas fases; lo cual explica el sinergismo de potenciación.



**Figura 06:** Mecanismo de acción de los antibacterianos

Fuente: Elaboración propia

### 2.2.19. Cloranfenicol:

Identificados como antibióticos de amplio espectro. Es activo sobre cocos gram positivos como: estroptococo hemolítico beta, enterococo, neumococo, estafilococo: bacilos grampositivos como: *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium diphtheriae*: bacilos gram negativos como: meningococo y gonococo; bacilos gramnegativos como los del género *Brucella*, *Shigella*, salmonella. Posee acción bacteriostática, aún en concentraciones elevadas solo suprime el crecimiento de los microorganismos y permite que las defensas antimicrobianas del huésped lleven a la curación. Posee actividad especial contra Las infecciones experimentales y clínicas producidas por la *Salmonella typhi*. Existe sinergismo con tetraciclinas. (31)

### **2.2.20. Mecanismo de acción de cloranfenicol**

Actúa por inhibición de síntesis proteica, en el proceso de translación al unirse a la subunidad 50S de los ribosomas impide la unión del complejo aminoácido-ácido ribonucleico de transferencia al ribosoma, al inhibir la enzima peptidiltransferasa y por consiguiente la transferencia de la nueva cadena polipeptídica al complejo, es así que el cloranfenicol interrumpe la formación de los polipéptidos, los cuales originan las proteínas indispensables para el crecimiento bacteriano. (31)

### **2.2.21. Toxicidad**

En raras ocasiones o en pacientes susceptibles pueden provocar la depresión o supresión medular reversible que está en relación con la dosis y es una reacción inmediata. (31)

### **2.2.22. Trimetoprima y sus asociaciones**

Se utiliza junto al sulfametoxazol, clotrimoxazol y con el sulfamoxol, debido a que existe sinergismos de potenciación, la acción es principalmente bacteriostática, es activa sobre cocos grampositivos como el *Streptococcus pyogenes* o estreptococo hemolítico beta, alfa, enterococo; bacilos grampositivos como: *Corynebacterium diphtheriae*; cocos gramnegativos como: gonococo, *Neisseria meningitidis* o meningococo; bacilos gramnegativos como: *Escherichia coli*, *enterobacter aerogenes*, *Vibrio cholerae*, *pseudomonas aeruginosa*, los géneros salmonella y shigella. La trimetoprima tiene la propiedad que unida a las sulfonamidas aumenta su acción antibacteriana de forma tal que dicha acción es mayor que la suma de las acciones de las dos por separado presenta sinergismo de potenciación. (31)

### **2.2.23. Mecanismo de acción**

La trimetoprima actúa como antimetabolito de los folatos e inhibe la enzima dihidrofolatorreductasa y se combina con ella en competición de sustrato, de manera que se produce una carencia de tetrahidrofolato y por tanto de las coenzimas necesarias para la formación del ADN, indispensable para

el crecimiento microbiano. Por otra parte, las sulfonamidas también intervienen en el metabolismo de los folatos, pero a distinto nivel, de forma que la asociación de ambas drogas actúe sobre la misma vía metabólica en forma secuencial, lo cual explicaría el sinergismo de potenciación. (31)

#### **2.2.24. Toxicidad**

Pueden presentarse náuseas, vómitos y diarreas; hepatitis con ictericia, leucopenia, agranulocitosis, trombocitopenia. Se han descrito algunos casos de anemia aplásica. (31)

#### **2.2.25. Ciprofloxacino**

Es uno de los derivados de las fluoroquinolonas más potente. Es bactericida y tiene un amplio espectro extendido contra la mayoría de las bacterias aeróbicas gramnegativas, incluso *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Neisseria*.(31) El ciprofloxacino es considerado fluoroquinolona de primera generación.(33)

#### **2.2.26. Mecanismo de acción**

Actúa inhibiendo la enzima ADN – girasa bacteriana, una enzima esencial en la replicación del ADN.(32) encargada de abrir la doble hebra de ADN, introduce superhélices negativas y luego resella los extremos abiertos, siendo necesario para evitar el excesivo superenrollamiento positivo de las hebras cuando se separan para permitir la replicación o la transcripción. La acción bactericida probablemente se debe a la digestión del ADN por exonucleasas cuya producción está señalizada por el ADN dañado. En lugar del ADN girasa. (33)

#### **2.2.27. Método Kirby Bauer:**

En el método se emplean discos de papel absorbente impregnados con una solución de concentración conocida del antibacteriano; los discos se colocan sobre una superficie de una placa conteniendo Agar Mueller-Hinton de mm de espesor, donde anteriormente se ha inoculado una suspensión

de la cepa a probar. Al humedecer el disco el antibacteriano se difunde radialmente creando un gradiente de concentración por disco, de esta forma el antimicrobiano se encuentra en alta concentración cerca del disco y disminuye a medida que se aleja del disco. El diámetro del anillo de inhibición va a depender de la sensibilidad o resistencia de microorganismo, así como la solubilidad de la droga. (26)

## **2.3. Formulación de las hipótesis**

### **2.3.1. Hipótesis general**

- El extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts (panizara) influye directamente en el efecto antibacteriano en cepas de *Salmonella enterica typhimurium in vitro*.

### **2.3.2 Hipótesis específicas**

- El extracto hidroalcohólico de hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” presenta metabolitos secundarios.
- La concentración del extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” es directamente proporcional con el efecto antibacteriano en cepas de *Salmonella enterica typhimurium in vitro*.
- El extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” tiene un efecto antibacteriano superior, igual o menor comparado con antibióticos como cloranfenicol, ciprofloxacino y trimetoprima más sulfametoxazol en cepas de *Salmonella enterica typhimurium*.

## **2.4. Variables**

### **2.4.1. Operacionalización de Variables e indicadores**

En la presente investigación participan las siguientes variables con sus respectivos indicadores:

**TABLA 01: OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES**

<b>Variable independiente</b>	<b>Dimensiones</b>	<b>Indicadores</b>
Extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts “panizara”	Fitoquímico	Concentración del extracto a evaluar <ul style="list-style-type: none"> <li>• Concentración al 33 por ciento.</li> <li>• Concentración al 43 por ciento.</li> <li>• Concentración al 50 por ciento.</li> </ul>
<b>Variable dependiente</b>	<b>Dimensiones</b>	<b>Indicadores</b>
Efecto antibacteriano en cepas de <i>Salmonella enterica typhimurium</i>	Microbiológico	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tamaño del halo: Medición en milímetros, realizado con regla milimetrada.</li> <li>• Tiempo de medición: 12 horas.</li> </ul>

## 2.5. Marco Conceptual

**Agar xilosa lisa Desoxicolato (XLD):** Medio diferencial y selectivo utilizado para con la finalidad de aislar y diferenciar bacterias entero patógenas de muestras clínicas. (29)

**Antibiograma:** Estudios de la sensibilidad a los antibióticos. (29)

**Antibiótico:** Cuando la sustancia es obtenida como productos naturales sintetizados por ciertos microorganismos, en general hongos. Algunos son semisintéticos porque se obtienen por modificaciones de las moléculas naturales, siendo modificados con el fin de mejorarlos y ampliar el espectro de acción o disminuir la toxicidad.(30)

**Bacteriostáticos:** Son antibacterianos que impiden el desarrollo y multiplicación de las bacterias sin destruirlas.(30)

**Bactericidas:** Son antibacterianos que producen la muerte bacteriana con efectos irreversibles.(30).

**Dosis:** Es la cantidad de droga que debe suministrarse para producir un cierto efecto. (31)

**Extracto:** Son soluciones extractivas de fitocomplejos de plantas medicinales, obtenidos por diferentes métodos de extracción. (27)

**Sinergismo:** Es el aumento de la acción farmacológica de una droga por el empleo de otra, regularmente cuando se trata de drogas de acción farmacológica similar.(31)

**Quimioterápicos:** cuando la sustancia es obtenida por síntesis química en el laboratorio. (30)

**Toxinas bacterianas:** Son sustancias tóxicas elaboradas por las bacterias durante su crecimiento, distinguiéndose dos clases; endotoxinas y exotoxinas. (23)

## CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

### 3.1. Tipo de estudio

La investigación que realizaron los evaluadores será de tipo “analítico”, ya que se analizó la causa y efecto que generaron las variables propuestas en el presente estudio.

#### 3.1.1. Según su nivel

La presente investigación fue de nivel “experimental”, puesto que se empleó una serie de instrumentos de medición para registrar los procesos que se generen al manipular una de las variables; así como modificar las variables de estudio a fin de evaluar la repercusión en el efecto.

#### 3.1.2. Según la planificación de toma de datos

Prospectivo: el estudio se realizó con los datos obtenidos por los investigadores, según planificación.

### 3.2. Diseños de investigación

El diseño de la presenta investigación fue experimental, debido a que la investigación se realizó con dos grupos, uno experimental y el otro grupo control.

Prospectivo: la investigación se llevó a cabo en los datos recolectados por los responsables del estudio, según la planificación realizada.

### 3.3. Población

La población de estudio estará conformada por:

Cepas certificadas ATCC 14028 de *Salmonella enterica typhimurium*, con certificados emitidos por Bruker.Corporation

Plantas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts obtenidas de la ciudad de Áncash.



### **3.4. Muestra**

Se utilizó cinco colonias de cepas certificadas de *Salmonella enterica typhimurium*, las cuales se sembraron en placas Petri y fueron divididas en dos grupos.

Grupo control

Grupo positivo

Para obtener el extracto solo se utilizó las hojas secas de la planta *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts.

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

En el presente estudio se llevará a cabo mediante la técnica de observación estructurada, no participante, colectivo, por lo cual se realizó la evaluación de las muestras de estudio, dichos datos serán registrados en ficha de observación AD-HOC de recolección de datos para tamizaje fitoquímico y análisis microbiológico.<sup>(35)</sup>

### **3.6 Descripción de instrumentos**

El instrumento utilizado fue una ficha de observación Ad- hoc elaborada para los fines objetivos del estudio, en este instrumento se registró cada uno de los resultados que se llevó a cabo en el estudio propuesto, se utilizó “manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión”<sup>(35)</sup>, como guía referencial para realizar dicho instrumento.

### **3.7 Procesamiento de datos**

Al concluir la recolección de datos se continuó con la organización de las fichas y su posterior enumeración, luego fueron procesadas e ingresadas en la base de datos en Microsoft Excel 2010.

El procesamiento de datos se realizó en una laptop de marca TOSHIBA, C845-SP4332SL, de 4GB de memoria RAM con sistema operativo Windows 8

Para el diseño estadístico se utilizó análisis de varianza (ANOVA)

La información que los investigadores obtuvieron fue analizada y procesada con el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Science), última versión

### **3.8 Equipos materiales y reactivos**

#### **3.8.1 Muestras biológicas**

- Hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts (panizara)
- Cepas certificadas de *Salmonella enterica typhimurium* ATCC 14028

#### **3.8.2 Materiales, instrumentos y equipos**

Pipetas, pizetas, Beacker, probetas, goteros, matraz Erlenmeyer, placas petri, frascos color ámbar, capilares, tubos de ensayo, espátulas, asa de siembra, gradillas, cocinillas, balanzas analíticas y mecánicas

#### **3.8.3 Reactivos**

Ácido clorhídrico concentrado, ácido sulfúrico concentrado, Dragendorff, limas de magnesio, Molish, Ninhidrina, tricloruro férrico, alcohol 96°, agua destilada, gelatina – sal, Mayer, Wagner, Bortanger

### **3.9. Procedimientos experimentales**

La extracción, concentración a sequedad, la marcha fitoquímica se realizó en los laboratorios de ciencias básicas y especialidad de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega. El estudio microbiológico se realizó en las instalaciones del Laboratorio Farmacéutico América bajo supervisión del químico farmacéutico Ignacio Loayza Palacios

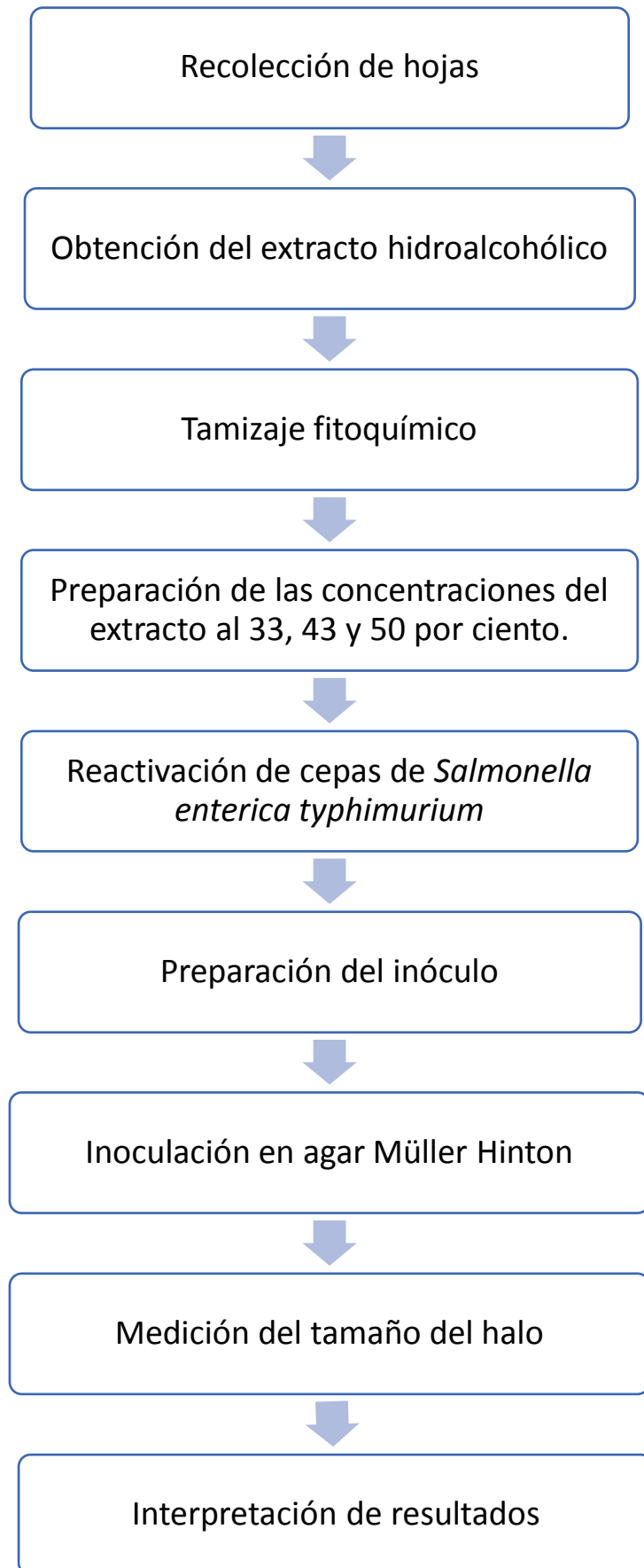


Figura 07: Procedimientos experimentales

### **3.9.1 Recolección de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”.**

Las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” fueron recolectadas en el distrito de Huacaschuque, provincia de Pallasca, capital Cabana, región Ancash ubicada a 3100 metros de altitud, durante el mes de setiembre de 2017. La clasificación taxonómica se realizó en el Museo de Historia Natural de la UNMSM.

### **3.9.2 Obtención del extracto hidroalcohólico**

#### **Selección y lavado de las hojas**

Se realizó una selección y separación solo de las hojas de la planta, luego se limpiaron para el secado.

#### **Secado**

Las hojas limpias se secaron mediante una deshidratación natural, realizada a temperatura ambiente por 4 días.

#### **Trozado de hojas**

Se realizó el trozado de las hojas secas de forma mecánica obteniendo 600 gramos de hojas secas, se envaso en frasco de vidrio de color ámbar de capacidad de 1 litro.

#### **Maceración**

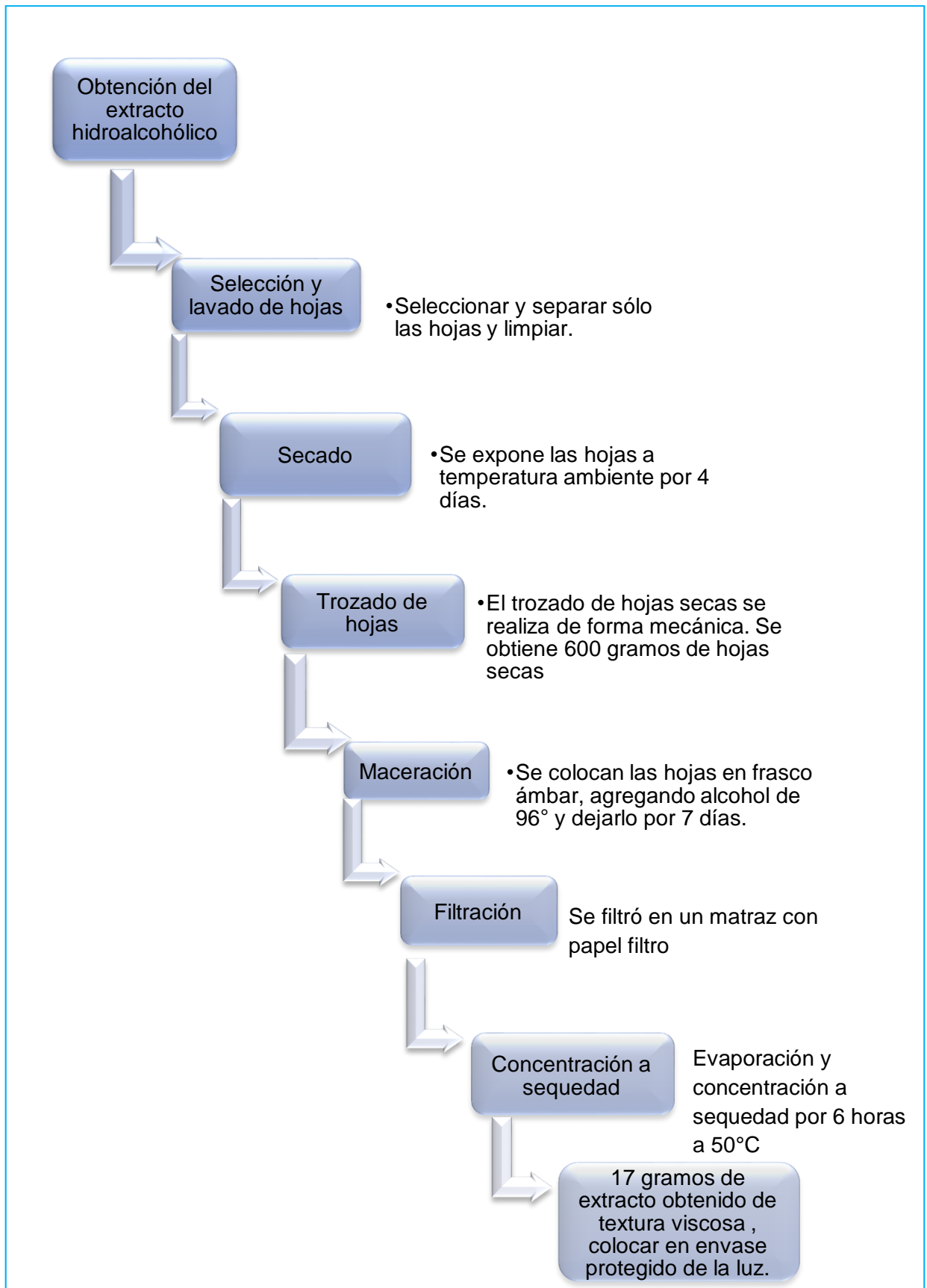
Se agregó alcohol etílico de 96° al frasco hasta cubrir las hojas trozadas, dejando macerar por 7 días y con una agitación de 3 veces al día.

#### **Filtración**

La filtración del macerado se realizó utilizando papel filtro con un embudo y en un matraz Erlenmeyer.

#### **Concentración a sequedad**

Se realizó la evaporación del solvente y concentración del extracto a sequedad en una cocinilla eléctrica a 50°C por 6 horas hasta obtener un extracto con una textura viscosa, el peso del extracto hidroalcohólico final obtenido fue de 17 gramos, se colocó en un envase protegido de la luz y del calor, para su posterior utilización.



**Figura 08: Selección de hojas y obtención de extracto**

### 3.9.3 Tamizaje fitoquímico

Se colocó 1 gramo del extracto seco en un tubo de ensayo limpio con ayuda de una bagueta, se añadió 15 mL de alcohol etílico 96°, con agitación constante para lograr una mezcla homogénea, el cual fue utilizada para realizar el tamizaje fitoquímico. La mezcla obtenida se dividió en diez tubos de ensayo limpios y secos, de los cuales nueve tubos se utilizaron para realizar el tamizaje y un tubo se dejó como muestra control, los tubos fueron enumerados con la finalidad de llevar un correcto orden en el momento de realizar la tamizaje fitoquímico y evitar confusiones que puedan alterar el resultado. En la tabla N°02 se observa el procedimiento y las reacciones observadas del tamizaje fitoquímico.

Tabla 02: Tamizaje fitoquímico

N° Tubo	Metabolito secundario a identificar	Reactivos	Procedimiento	Reacción
1	Taninos	Gelatina -sal	Agregar II gotas de reactivo gelatina-sal	Precipitado blanco
2	Aminoácidos Libres	Ninhidrina	Agregar II gotas de Ninhidrina	No se observó cambios
3	Compuestos fenólicos	Tricloruro férrico	Agregar II gotas de reactivo de tricloruro férrico.	Coloración marrón azulada
4	Alcaloides	Dragendorff	Agregar III gotas de reactivo de Dragendorff	Precipitado rojo ladrillo
5		Mayer	Agregar III gotas de reactivo Mayer	Precipitado rojo ladrillo
6		Wagner	Agregar III gotas de reactivo Wagner	Precipitado rojo ladrillo
7	Flavonoides	Shinoda	Agregar un pequeño trozo de limadura de Magnesio y III gotas de ácido clorhídrico concentrado.	Coloración rojo vino
8	Quinonas	Borntrager	Agregar II gotas de reactivo Borntrager	Coloración rojiza
9	Azúcares	Molish	Agregar II gotas de reactivo Molish y luego III gotas de ácido sulfúrico concentrado	Anillo de color violeta en la interfaz

Fuente: Elaboración propia

### 3.9.4. Preparación de las concentraciones del extracto

Para realizar las concentraciones del extracto se consideró la fórmula de peso en volumen <sup>(32)</sup>

$$\text{porcentaje en masa} = \frac{\text{masa de soluto}}{\text{masa de soluto} + \text{masa de disolvente}} \times 100\%$$

Fuente: Química. Raymond Chang. pág 597 <sup>(34)</sup>

**\*Soluto:** extracto hidroalcohólico.

Se pesó 2 gramos de extracto puro en 2 mililitros de agua y realizando los cálculos considerando el uso de la fórmula se obtuvo la concentración peso volumen de 50 por ciento del extracto.

$$\text{porcentaje en masa} = \frac{2 \text{ gramos}}{2 \text{ gramos} + 2 \text{ gramos}} \times 100\%$$

$$\text{porcentaje en masa} = 50 \%$$

Para la preparación de la concentración al 43 por ciento se pesó 1,5 gramos de extracto seco y se diluyó en 2 mililitros de agua destilada.

$$\text{porcentaje en masa} = \frac{1,5 \text{ gramos}}{1,5 \text{ gramo} + 2 \text{ gramos}} \times 100\%$$

$$\text{porcentaje en masa} = 43\%$$

Para la obtener la concentración al 33 por ciento se pesó 1 gramo de extracto seco y se diluyó en 2 mililitro de agua destilada.

$$\text{porcentaje en masa} = \frac{1 \text{ gramos}}{1 \text{ gramo} + 2 \text{ gramos}} \times 100\%$$

$$\text{porcentaje en masa} = 33 \%$$

Los extractos se pesaron en balanza analítica.

Se guardaron en envases de vidrio de color ámbar y se rotularon con las respectivas concentraciones, guardándolas en refrigeración (6°C).

### 3.9.5 Reactivación de cepas de *Salmonella enterica typhimurium*

Se utilizó placas previamente esterilizadas para realizar la incubación correspondiente de las cepas ATCC 14028 certificadas de *Salmonella enterica typhimurium*, las placas conteniendo agar XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato), agar selectivo para el correcto crecimiento de *Salmonella enterica typhimurium*; se dejó las placas en incubadora a 35°C por un lapso de tiempo de 48 horas. (01).

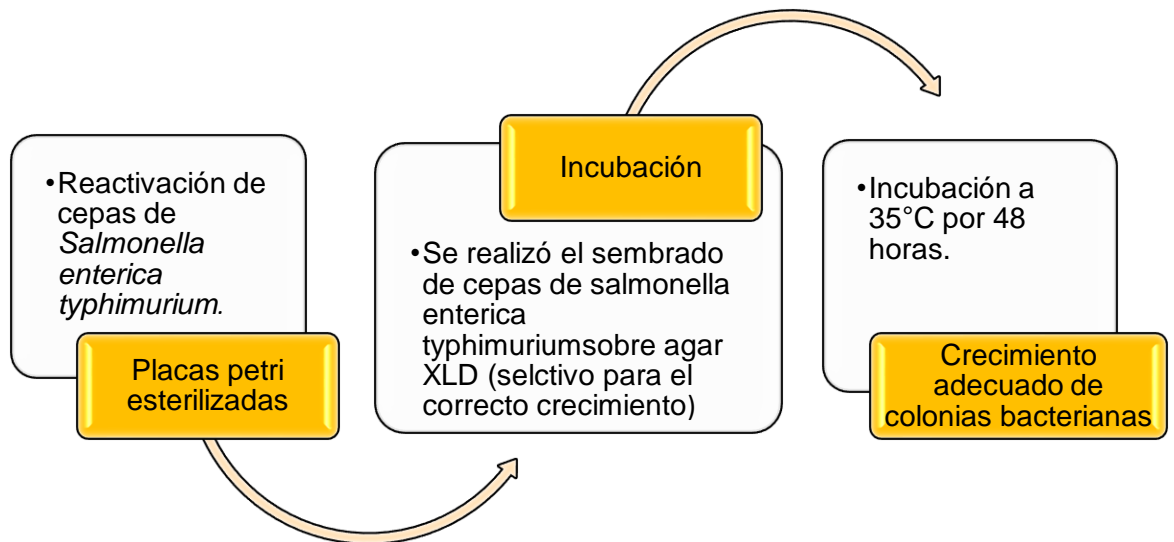


Figura 09: Reactivación de cepas de *Salmonella enterica typhimurium*.

### 3.9.6 Análisis microbiológico.

- **Preparación del Inóculo**

Se seleccionaron 5 colonias de las placas cultivadas, con la ayuda de un hisopo se tocó la superficie de 5 colonias de *Salmonella entérica typhimurium*, para posteriormente pasarlo a un tubo de ensayo conteniendo 5 mL de caldo tripticasa soja.



El tubo se incubó en una incubadora a 35°C por un lapso de 2 a 6 horas, los investigadores realizaron una comparación con la turbidez del estándar 0.5 escala de Mc. Farland; realizaron la comparación a contra luz utilizando un fondo de líneas blancas y negras.

- **Inoculación de placas**

Posterior al ajuste de turbidez se procedió a la inoculación de las placas; con ayuda de un hisopo estéril, el cual se humedeció con el caldo rotando el hisopo dentro del tubo, con el hisopo bien embebido se procedió a realizar la siembra en las placas conteniendo Agar Müller Hinton, la siembra la realizaron en forma estriada, asegurándose que la siembra sea uniforme y completa sobre las placas, asegurando el correcto y uniforme crecimiento de bacterias *Salmonella enterica typhimurium* en toda la placa.

Se dejó secar la placa, para evitar que la humedad.

- **Método Kirby Bauer**

Aplicación de discos

Se utilizó discos de papel impregnados con la muestra a analizar; así como de la muestra control.

Dichos discos de papel fueron colocados sobre las placas conteniendo el agar Müller Hinton con las cepas de *Salmonella enterica typhimurium* inoculadas, el cual es recomendado para realizar las pruebas de sensibilidad.

Se dejó las placas conteniendo agar Müller Hinton sin inocular y otras inoculadas con la bacteria *Salmonella enterica typhimurium*

- **Interpretación de resultados**

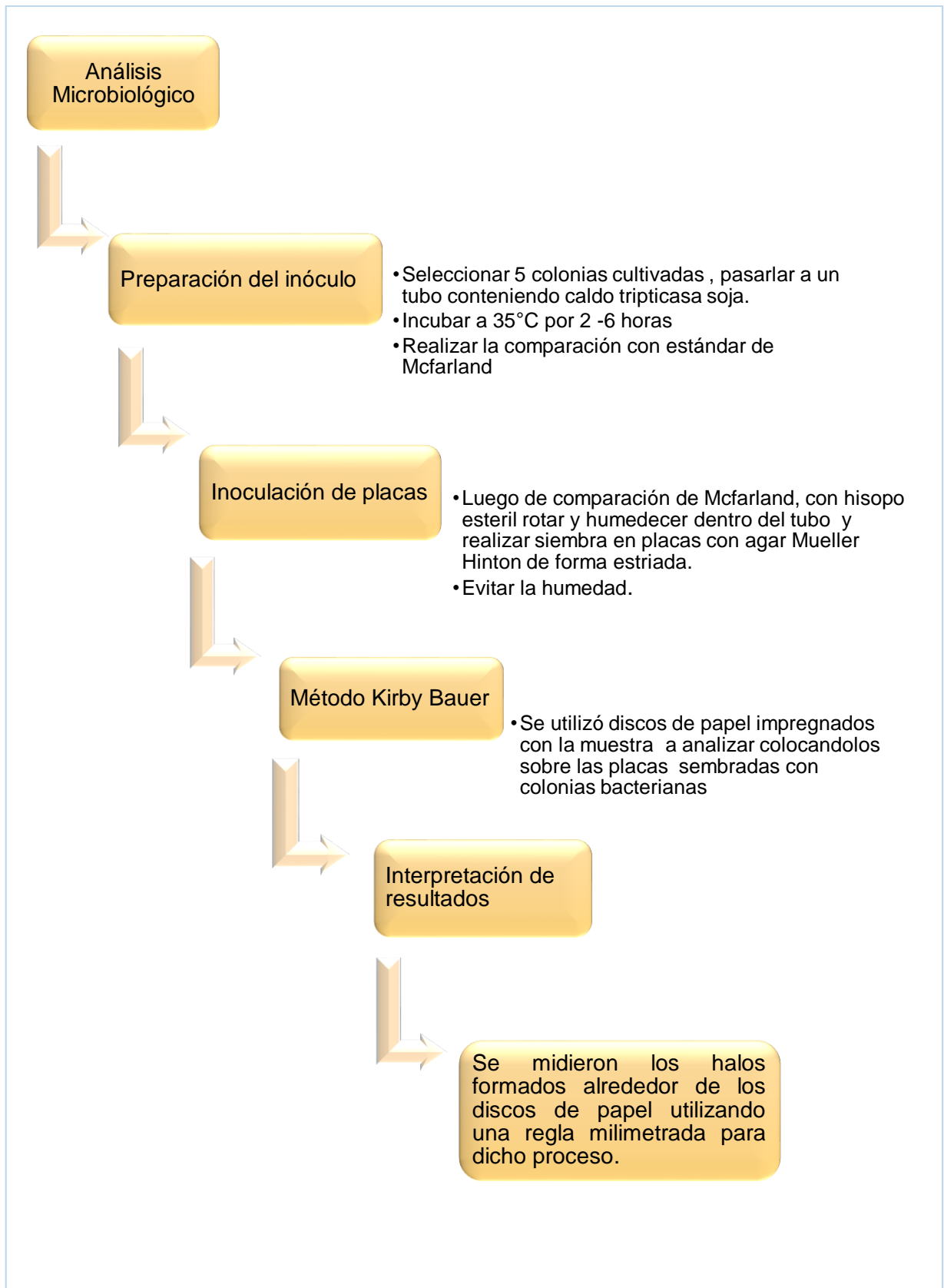
Para la interpretación de resultados se realizó basándose en la presencia y medición de los halos de inhibición formados alrededor de

cada disco de papel evidenciando de esta forma la actividad antibacteriana, utilizándose una regla milimetrada para la medición en milímetros de cada halo formado. Se utilizó la siguiente tabla del instituto nacional de salud como guía de referencia.

**Tabla 03: Diámetro de halos en mm**

Antibacteriano	Contenido del disco	Diámetro en mm		
		Resistente	Intermedio	Sensible
Cloranfenicol	30ug	<12	13-17	>18
Trimetroprima/sulfametoxazol	1.25/23.75ug	<10	11-15	>16
Ciprofloxacino	5ug	<15	16-20	>21

Fuente Instituto nacional de salud



**Figura 10: Análisis microbiológico**

## CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

### 4.1. Procesamiento de resultados

#### 4.1.1. Resultados del tamizaje fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”.

El tamizaje fitoquímico realizado con el extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”, evidenció una alta presencia de flavonoides y compuestos fenólicos a diferencia de quinonas o azúcares, los cuales evidencian una baja presencia en dicho extracto.

Los resultados del tamizaje fitoquímico se muestran en la tabla 04.

N° Tubo de Ensayo	Metabolito secundario	Reactivos	Reacción	Resultado
1	Taninos	Gelatina -sal	Precipitado blanco	++
2	Aminoácidos Libres	Ninhidrina	No se observó cambios	-
3	Compuestos fenólicos	Tricloruro férrico	Coloración marrón azulada	+++
4	Alcaloides	Dragendorff	Precipitado rojo ladrillo	++
5	Alcaloides	Mayer	Precipitado rojo ladrillo	++
6	Alcaloides	Wagner	Precipitado rojo ladrillo	++
7	Flavonoides	Shinoda	Coloración rojo vino	++++
8	Quinonas	Borntrager	Coloración rojiza	++
9	Azúcares	Molish	Anillo de color violeta en la interfaz	++

Fuente: Elaboración Propia

Leyenda:

(-) Negativo

(++) Presente en baja cantidad

(+++ Presente en moderada cantidad

(++++ Presente en alta cantidad

#### 4.1.2 Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”

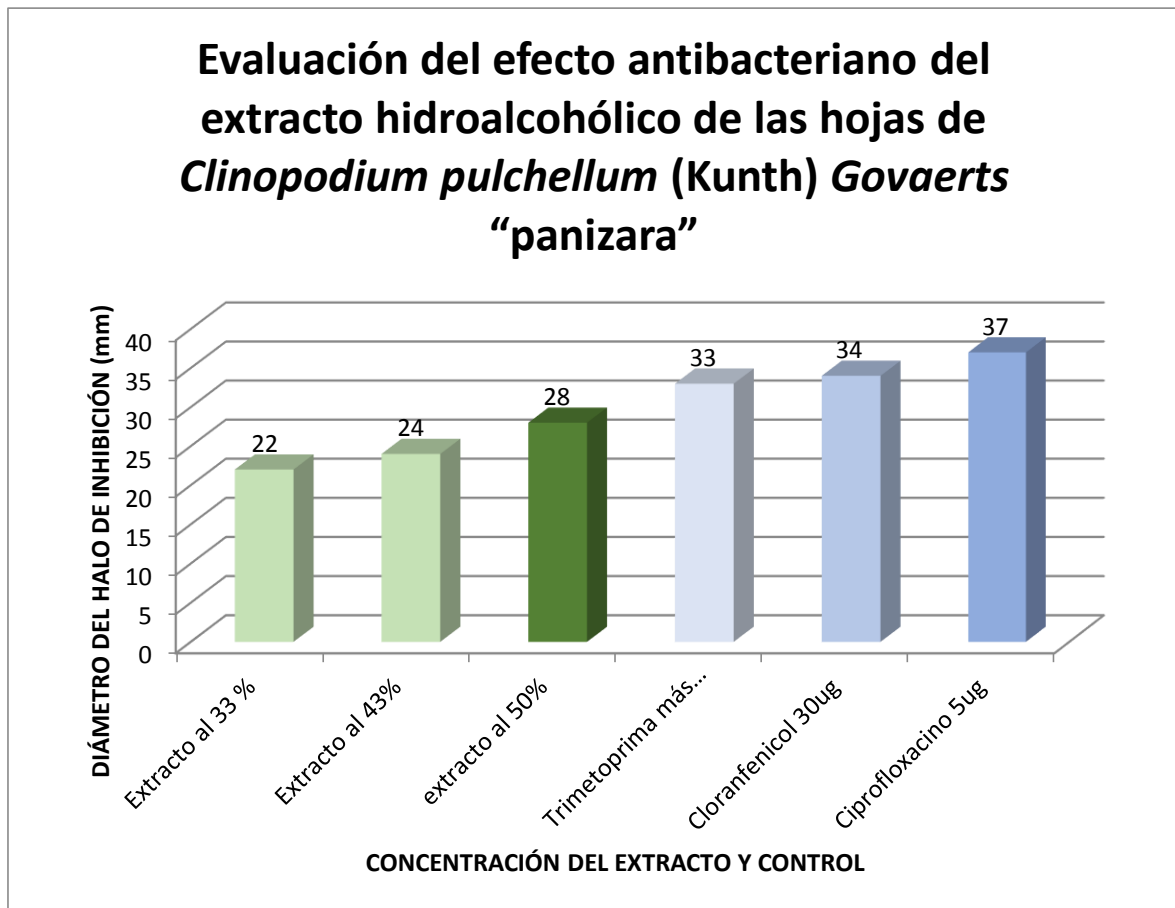
Las concentraciones de los extractos presentan formación de halos de inhibición los cuales son comparados con los halos formados por el grupo control. De esta forma se evidencia el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”.

En la tabla 05 se presenta el tamaño de los halos de inhibición formados por la acción de cada concentración (33, 43 y 50%); así como del grupo control conformados por los medicamentos Trimetropin más sulfametoxazol, cloranfenicol 30ug y ciprofloxacino 5ug. Siendo el extracto de 50 por ciento el que evidencia un mayor tamaño en el halo de inhibición, sin embargo en comparación con los medicamentos de control la diferencia es muy significativa.

<b>Tabla 05: Comparación de tamaño de halos de inhibición</b>	
<b>Concentración y control</b>	<b>Tamaño de halo de inhibición</b>
Extracto al 33%	22 mm
Extracto al 43 %	24 mm
<b>Extracto al 50 %</b>	<b>28 mm</b>
Trimetoprima más sulfametoxazol 25ug	33 mm
Cloranfenicol 30ug	34 mm
Ciprofloxacino 5ug	37 mm

Fuente: elaboración propia

En la figura 11, se puede observar la diferencia entre los tamaños del halo de inhibición formados por el grupo control y las concentraciones del extracto analizadas.



**Figura 11: Evaluación del efecto antibacteriano**

## 4.2. Contratación de hipótesis

Diseño estadístico

Diseño en bloques incompletos aleatorizados

Nos interesa saber si los tratamientos influyen en el efecto antibacteriano, para ello realizamos el siguiente contraste de hipótesis:

$$H_0 = T_1 = T_2 = T_3 = T_4 = T_5 \quad \text{vs} \quad H_1 \equiv T_i \neq T_j \text{ para algún } i \neq j.$$

Es decir, contrastamos que no hay diferencia en las medias de las cinco placas (tratamientos) frente a la alternativa de que al menos una media difiere de otra.

Pero, previamente hay que comprobar si la presencia de las concentraciones está justificada. Para ello, realizamos el siguiente contraste de hipótesis:

$$H_0 = \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_6 \quad \text{vs} \quad H_1 \equiv \beta_i \neq \beta_j \text{ para algún } i \neq j.$$

Es decir, contrastamos que no hay diferencia en las medias de los 6 bloques frente a la alternativa de que al menos una media difiere de otra. Este experimento se modeliza mediante un diseño en bloques completos al azar. El modelo matemático es:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \beta_j + \mu_{ij}, \quad i=1, \dots, 5; j=1, \dots, 6. \quad \text{En general } i=1, \dots, I, j=1, \dots, J$$

La fórmula expresa simbólicamente la idea de que cada observación  $ij$  (Tamaño del halo en mm medida con el tratamiento  $i$ , de la concentración  $j$ ), puede subdividirse en cuatro

Componentes:

- a. Un efecto medio global  $\mu$
- b. Un efecto tratamiento  $T_i$  (efecto del factor principal sobre el tamaño del halo)
- c. Un efecto bloque  $\beta_j$  (efecto del factor secundario (concentración) sobre el tamaño del halo)
- d. Una desviación aleatoria debida a causas desconocidas  $\mu_{ij}$  (Perturbaciones o error experimental).

Este modelo tiene que verificar los siguientes supuestos:

1. Las 30 observaciones constituyen muestras aleatorias independientes, cada una de tamaño 5, de 30 poblaciones con medias  $\mu_{ij}$ ,  $i=1, \dots, 5$  y  $j=1, \dots, 6$
2. Cada una de las 30 observaciones es normal
3. Cada una de las 30 observaciones tiene la misma varianza
4. Los efectos de los bloques y tratamientos son aditivos; es decir, no existe interacción entre los bloques y tratamientos. Esto significa que si hay diferencias entre dos tratamientos cualesquiera, estas se mantienen en todos los bloques (concentraciones).
5. Variable respuesta: Tamaño del halo

Factor: Tratamiento que tiene seis niveles. Es un factor de efectos fijos ya que viene decidido que niveles concretos se van a utilizar.

Bloque: Placas que tiene cinco niveles. Es un factor de efectos fijos ya que viene decidido que niveles concretos se van a utilizar.

Modelo incompleto: Los 5 tratamientos no se prueban en cada bloque exactamente una vez

Tamaño del experimento: Número total de observaciones 17.

**Tabla 06:** Prueba de efectos inter – sujetos

Variable dependiente: Halo en mm

Origen	Tipo I de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1629,871 <sup>a</sup>	9	181,097	4,093	,024
Intersección	14176,895	1	14176,895	320,395	,000
Concentración	879,105	5	175,821	3,974	,035
Placa	750,766	4	187,691	4,242	,033
Error	398,234	9	44,248		
Total	16205,000	19			
Total corregido	2028,105	18			

a. R al cuadrado = ,804 (R al cuadrado ajustada = ,607)

En la tabla 06 se muestra el valor del estadístico de contraste de igualdad de **Placa**,  $F = 4,242$  deja a su derecha un **p-valor 0.033**, menor que el nivel de significación del 5%, por lo que se rechaza la Hipótesis nula de igualdad de tratamientos. Por lo tanto la cantidad de contenido de la placa influye en el tamaño del halo de inhibición en mm.



De la tabla ANOVA (tabla 06) se deduce que las placas son una fuente de variación.

Para evaluar el efecto de los bloques, la suma de cuadrados de bloques debe ajustarse por los tratamientos (placa).

<b>Tabla 07: Pruebas de efectos inter - sujetos</b>					
Variable dependiente: Halo en mm					
Origen	Tipo I de suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	1629,871 <sup>a</sup>	9	181,097	4,093	,024
Intersección	14176,895	1	14176,895	320,395	,000
Placa	848,072	4	212,018	4,792	,024
Concentración	781,799	5	156,360	3,534	,048
Error	398,234	9	44,248		
Total	16205,000	19			
Total corregido	2028,105	18			

a. R al cuadrado = ,804 (R al cuadrado ajustada = ,607)

Se observa en la tabla 07 que hay diferencias reales entre las concentraciones medias obtenidas en las distintas placas ya que el p-valor es menor que 0.05.

El valor del estadístico de contraste de igualdad de **Concentración**,  $F = 3.534$  deja a su derecha un p-valor **0.048**, menor que el nivel de significación del 5%, por lo que se rechaza la Hipótesis nula de igualdad de bloques. Por lo tanto las placas en los que se realiza la prueba influyen en el tamaño del diámetro del halo de inhibición en mm.

#### 4.2.1. Contraste de hipótesis

H<sub>0</sub>: El extracto hidroalcohólico de hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” tiene un efecto antibacteriano superior o igual comparado con antibióticos específicos en cepas de *Salmonella enterica typhimurium*.

H<sub>1</sub>: La concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts (panizara) es directamente proporcional con el efecto antibacteriano en cepas de *Salmonella enterica typhimurium*, in vitro.

Decisión estadística: Como el p\_valor obtenido es menor que el nivel de significancia entonces se rechaza la hipótesis nula. Por lo tanto la hipótesis 1 “la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts (panizara) es directamente proporcional con el efecto antibacteriano en cepas de *Salmonella enterica typhimurium* in vitro” es aceptada de acuerdo al análisis estadístico del trabajo de investigación.

#### 4.2.2. Prueba de hipótesis

En la investigación se logró comprobar que “la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” es directamente proporcional con el efecto antibacteriano en cepas de *Salmonella enterica typhimurium* in vitro”.

#### 4.3. Discusión de resultados

En esta investigación del extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” se encontró compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, alcaloides, quinonas y azúcares. Resultados similares obtuvo Toche Tuesta en su investigación “Estructura química de compuestos fenólicos del extracto etanólico de hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panisara”,<sup>(8)</sup> al haber

encontrado compuestos fenólicos tipo flavonoides, alcaloides, quinonas y glicósidos.

Además Chipa y Ruiz, et al., en su investigación “Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *Satureja pulchella* (panisara) en cepas de *staphylococcus aureus* y *staphylococcus epidermidis*” analizaron el extracto hidroalcohólico de hojas y flores de *Satureja pulchella* (panisara) detectando alcaloides, flavonoides y compuestos fenólicos.<sup>(9)</sup> Confirmando la presencia de metabolitos secundarios.

El extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” presentó acción antibacteriana frente a cepas de *Salmonella enterica typhimurium*, de manera similar Chipa Avila y Ruiz Alvarado et al, comprueba la acción antibacteriana del extracto hidroalcohólico de hojas y flores contra *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*.

Mendoza et al, en su investigación “Efecto del aceite esencial de *Satureja pulchella* sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*”. comprueba la acción antibacteriana del aceite esencial de *Clinopodium pulchellum* sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*<sup>(6)</sup>. Evidenciando que el extracto hidroalcohólico y el aceite esencial de las hojas y flores de la planta de *Clinopodium pulchellum* presentan acción antibacteriana.

En esta investigación se evidenció alta cantidad de flavonoides. Refiriendo a Martino, Virginia et al, <sup>(10)</sup> que en su investigación indica que los flavonoides presentan actividades biológicas tales como antibacterianas, anti fúngicas, antivirales, antioxidantes y antiinflamatorias, <sup>(10)</sup> siendo corroborada la acción antibacteriana del extracto de hojas en el presente estudio.

## CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### 5.1. Conclusiones

- El extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” contiene flavonoides, fenólicos, taninos, alcaloides, quinonas y azúcares.
- El extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” al 50 por ciento (halo de inhibición 28 mm). presenta mayor efecto antibacteriano en cepas de *Salmonella enterica typhimurium*.
- El extracto hidroalcohólico de hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” al 50 por ciento fue menor comparado con los antibióticos trimetoprima más sulfametoxazol, cloranfenicol y ciprofloxacino.

## 5.2. Recomendaciones

- Por su efecto antibacteriano se recomienda realizar formulaciones tópicas antisépticas con extracto de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” y contrastarlo con formulaciones tópicas antibacteriales de origen sintético.
- Se recomienda la continuación de los estudios antibacteriales en diferentes microorganismos patógenos, siendo una excelente opción frente la resistencia bacteriana que se evidencia actualmente.
- Continuar con la investigación de otras acciones farmacológicas de diferentes partes de la planta *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Med. Soto Cabezas MG. Enfermedades transmitidas por alimentos, una importante causa de morbilidad en nuestro país. Boletín Epidemiológico (Perú). 2012 Diciembre; 21(50): p. 834 -835.
2. Mg. Ordóñez Ibargüen LÁ. Enfermedades transmitidas por alimentos. Boletín Epidemiológico del Perú. 2017 Febrero 12 - 18; XXVI(7): p. 1374 - 1375.
3. Salud OMD. [www.who.int](http://www.who.int). [Online].; 2017 [cited 2017 [Centro de prensa/notas descriptivas]. Available from: <http://www.who.int/mediacentr/factsheets/fs139/es/>.
4. Salud OMD. [www.who.int](http://www.who.int). [Online].; 2017. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/running-out-antibiotics/es/>.
5. Ynce C. Composición química, actividad antioxidante y toxicidad aguda del aceite esencial de *Satureja pulchella* "Panizara". Theorema - UNMSM. 2014 junio; I(1): p. 57 - 63.
6. Mendoza Yamashiro YL. Efecto del aceite esencial de *Satureja pulchella* sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*. Tesis para obtener el título profesional de biólogo - farmacobiólogo. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo, La Libertad; 2015.
7. Valverde Rojas M. Evaluación in vivo del efecto cicatrizante de una crema dérmica oleo/acuosa (O/W) elaborada a partir del aceite esencial obtenida de las hjas frescas de *Clinopodium pulchellum* "panizara" en la ciudad de Huacho de Febrero a Julio del 2015. Tesis doctoral. Huacho: Universidad Alas Peruanas, Huacho; 2015.
8. Toche Tuesta A. Estructura química de compuestos fenólicos del extracto etanólico de hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Goaerts "panisara". Revista Peruana de Medicina Integrativa. 2017 Setiembre; 2(3): p. 803 - 809.
9. Chipa Avila M, Ruiz Alvarado C. Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas y flores de *satureja pulchella* (panisara) en cepas de *staphylococcus aureus* y *staphylococcus epidermidis*. Tesis para optar al

Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico Lima. Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Lima. 2018.

10. MARTINO, Virginia. Los flavonoides como promisorios agentes preventivos y terapéuticos. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 2000, vol. 19, no 4, p. 303-308.

11. Mdlc PA, Gastélum-Franco. Efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*LIPPIA berlandierischauer*) y de su aceite esencial sobre cinco especies del género vibrio. *Revista Fitotecnia Mexicana* [internet]. 2007 Febrero; 30(3): p. 261-267.

12. María L. Carrillo L. Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Información Tecnológica*. 2011; 22(5): p. 21-28.

13. Musmeci R L. Acción antimicrobiana del gel de áloe vera sobre *staphylococcus aureus*, *escherichia coli*, *pseudomonas aeruginosa* y *candida albicans*. *Revista sobre estudios e investigaciones del saber académico*. 2013 Diciembre;(7): p. 23-27.

14. Junod López t. Susceptibilidad a antibióticos en cepas de salmonella entérica de origen animal y alimentario. Tesis Doctoral. Concepción Chile: Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Veterinarias; 2010.

15. Fonseca Chasipanta EA. Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana del aceite esencial de sunfo (*clinopodium nubigenum (kunth) kuntze*) frente a patógenos de enfermedades respiratorias (*staphylococcus aureus* ATCC: 25923, *streptococcus pyogenes* ATCC: 19615, *streptococcus p.* Tesis pregrado. Quito Ecuador: Universidad Politecnica Salesiana; 2016.

16. Plantas Medicinales de Áncash. Panisara. Instituto Superior de Educación Publico Huaraz. <http://pmedicinal.webcindario.com/eve/panisara.html>

17. Rodriguez Maritza. Lamiaceae endémicas del Perú. *Rev. Perú biol.* [Internet]. 2006 Dic [citado 2018 Nov 19]; 13( 2 ): 371-379.

Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1727-99332006000200064&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-99332006000200064&lng=es)

18. Galbis Perez, Juan Antonio. Panorama actual de la química farmacéutica. Universidad de Sevilla. España Sevilla. 2º Edición. 2004.
19. Viegas Júnior, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Química Nova*, 390-400. Editor Scielo Brasil. 2003. Vol 26. (3). p. 390 - 400
20. Taiz, L, Zeiger, E. Fisiología vegetal I. Vol 1. Universitat Jaume I .2007 p. 535.
21. Gennaro, AR Remington Farmacia. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires. 20º ed. 2003. Vol 1 p. 872.
22. Sharapin Nikolai. Fundamentos de Tecnología de productos fitoterapéuticos. Colombia. 2000. p. 41-42
23. Anderson M.R.P. Enfermedades de origen alimentario: su prevención. Ed. Diaz de santos S.A. 2005. España. p 22
24. Uribe, C, Suárez, MC. Salmonelosis no tifoidea y su transmisión a través de alimentos de origen aviar. Colombia Médica [Internet]. 2006; 37(2):151-158. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=28337211>
25. Zambrano F. Hatzumi, Lucas L. Juan, Vilca L. Miguel, Ramos D. Daphne. Determinación de salmonella SPP en centros de beneficio clandestino de pollos de engorde en Lima, Perú. Rev. investig. vet. Perú [Internet]. 2013 Ago [citado 2018 Nov 25] ; 24( 3 ): 337-345. Disponible en: [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1609-91172013000300010&lng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172013000300010&lng=es).
26. Cavallini, E.R. Bacteriología general. Principios y practicas de laboratorio.Ed. Universidad de Costa Rica.
27. Serrano, A.J.B. Cruz, N.S.A Tecnología farmacéutica. Vol 1 Ed. Club Universitario. 2012
28. KUMAR, V. ABBAS, AK. FAUSTO, N. Patología Estructural y Funcional: Robbins y Cotran. Elsevier España S.A; 2005.p. 42



29. Prats, G. Microbiología Clínica. 1° edición. Ed. Médica Panamericana Madrid - España. 2006 p. 30.
30. Ausina R, Moreno G. Tratado SEIMC de enfermedades infecciosas y microbiología clínica. Ed. Médica Panamericana. Madrid - España 2006. p 97
31. Litter M. Compendio de Farmacología. Ed Ateneo. 5°ed. Buenos Aires – Argentina. 2001. p 681
32. Ashok Garg, John D. Sheppard, Eric D. Donnenfeld, Mitchell Friedlaender. Tratamiento antibiótico y antiinflamatorio en oftalmología. Ed. Médica Panamericana, Argentina. 2010. p 192.
33. Tripathi. K. D. Farmacología En Odontología: Fundamentos. Ed. Médica Panamericana, Argentina. 2008. p 392.
34. Chang R. Química. McGraw-Hill Interamericana. 9° Edición. China. 2007 p.507.
35. Contreras R, Sacsquispe R, Velásquez J. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de Disco Difusión. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud. Lima, 2002.

## ANEXOS

### Anexo 01. Matriz de consistencia

Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts "panizara" en cepas de <i>Salmonella</i> entérica typhimurium, in vitro						
PROBLEMA S	OBJETIVOS	HIPÓTE S I S	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLE S			METODOLOGÍA
GENERAL	GENERAL	GENERAL	VARIABLE INDEPENDIENTE	DIMEN SIONE S	INDICADORE S	
¿El extracto hidroalcohólico de hojas secas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts "panizara" tendrá efecto antibacteriano en cepas de <i>Salmonella</i> entérica typhimurium, in vitro?	Determinar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas secas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts "panizara" en cepas de <i>Salmonella</i> entérica typhimurium in vitro.	El extracto hidroalcohólico de hojas secas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts "panizara" influye directamente en el efecto antibacteriano en cepas de <i>Salmonella</i> entérica typhimurium in vitro.	Extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts "panizara"	FITOQUÍMICO	Concentración del extracto a evaluar: Concentración al 33 por ciento. Concentración al 43 por ciento. Concentración al 50 por ciento.	<p>diseño: Experimental tipo: Análisis</p> <p>NIVEL: Experimental</p> <p>POBLACIÓN Y MUESTRA. La población de estudio estará conformada por cepas certificadas ATCC 14028 de <i>Salmonella</i> entérica, obtenidas en laboratorios Bruker y las plantas de <i>Clinopodium pulchellum</i>. Se utilizó cinco colonias de cepas certificadas de <i>Salmonella</i> entérica, las cuales se sembraron en placas Petri y fueron divididas en dos grupos.</p> <p>INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS. TÉCNICA: Observación estructurada no participante colectiva.</p> <p>INSTRUMENTO: Ficha de Observación Ad-hoc.</p> <p>PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS. Análisis descriptivo e inferencial con los programas SPSS, para el análisis de Varianza (ANOVA)</p>
ESPECÍFICO S	ESPECÍFICO S	ESPECÍFICO S	VARIABLE DEPENDIENTE	DIMEN SIONE S	INDICADORE S	
¿El extracto hidroalcohólico de hojas secas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts "panizara" presentará metabolitos secundarios?	Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts "panizara"	El extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts "panizara" presenta metabolitos secundarios.				
¿Cuál será la concentración óptima del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts "panizara" que presentará un mayor efecto antibacteriano en cepas de <i>Salmonella</i> entérica typhimurium, in vitro?	Determinar la concentración del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts "panizara" con mayor efecto antibacteriano en cepas de <i>Salmonella</i> entérica typhimurium, in vitro.	La concentración del extracto hidroalcohólico de hojas secas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts "panizara" es directamente proporcional con el efecto antibacteriano en cepas de <i>Salmonella</i> entérica typhimurium in vitro.	Efecto antibacteriano en cepas de <i>Salmonella</i> entérica typhimurium	MICROBIOLÓGICO	Tamaño del halo: Medición en milímetros, realizada con regla milimetrada Tiempo de medición: 12 horas.	
¿Cuál será el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts "panizara" comparado con antibióticos como cloranfenicol, ciprofloxacino y trimetoprim más sulfametoxazol en cepas de <i>Salmonella</i> entérica typhimurium, in vitro?	Comparar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts "panizara" con antibióticos como cloranfenicol, ciprofloxacino y trimetoprim más sulfametoxazol en cepas de <i>Salmonella</i> entérica typhimurium in vitro.	El extracto hidroalcohólico de hojas secas de <i>Clinopodium pulchellum</i> (Kunth) Govaerts "panizara" tiene un efecto antibacteriano superior, igual o menor comparado con antibióticos como cloranfenicol, ciprofloxacino y trimetoprim más sulfametoxazol en cepas de <i>Salmonella</i> entérica typhimurium.				

## Anexo 02. Ficha Técnica de la Bacteria *Salmonella enterica* typhimurium

### Brucker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



#### Meaning of Score Values

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

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

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

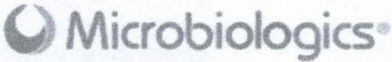
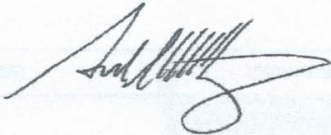
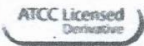

**Analyte Name:** *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium  
**Analyte Description:** 0363  
**Analyte ID:** 363-257  
**Analyte Creation Date/Time:** 2016-10-06T16:31:27.322 MB  
**Applied MSP Library(ies):** BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, IVD, Listeria  
**Applied Taxonomy Tree:**

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value
A5( +++ ) ( A )	363-257	<i>Salmonella</i> sp	2.351

#### Comments:

Salmonella can only be identified on genus level.

## Anexo 02. Ficha Técnica de la Bacteria *Salmonella enterica typhimurium*

	
<b>Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release</b>	
<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>typhimurium</i> <b>Catalog Number:</b> 0363 <b>Lot Number:</b> 363-257 <b>Reference Number:</b> ATCC® 14028™ <b>Purity:</b> > 99.9% of Total Pellet CFU <b>Recovery:</b> > 1000 CFUs per Pellet <b>Passage from Reference:</b> 2	<b>Expiration Date:</b> 2018/9/30 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Mary L Bowman <b>Release Date:</b> 2016/10/11
<b>Performance</b>	
<b>Macroscopic Features:</b> Medium, gray/white, circular, slightly irregular edges, convex colonies <b>Microscopic Features:</b> Gram negative straight rods	<b>Medium:</b> SBAP <b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> MALDI-TOF See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Oxidase (Kovacs): negative Hektoen Enteric agar: good growth, blue-green colonies with black centers (1) <i>Salmonella</i> O antiserum Factor O:4 (Included in group B): positive (1) <i>Salmonella</i> O antiserum Factor O:5 (Included in group B): positive (1) <i>Salmonella</i> O antiserum Factor O:12 (Included in group B): positive
 Brad Goskowitz, President AUTHORIZED SIGNATURE	
<small>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small>	
<small>Note for Vitabid®: Although the Vitabid® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small>	
<small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small>	
<small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small>	
	<small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small>
 TESTING CERT #2655.01	<small>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small>
<small>© 2012 Microbiologics, Inc. All Rights Reserved. 200 Cooper Avenue North Saint Cloud, MN 56303</small>	
<small>Page 1 of 1</small>	
<small>DOC.286</small>	

## Anexo 03. Constancia de la Clasificación taxonómica de la planta "panizara"

  <p>VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO</p>	<p><b>UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS</b> Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO <b>MUSEO DE HISTORIA NATURAL</b></p>	 <p>Museo de Historia Natural USM</p>
---	--	--

---

**"Año del Buen Servicio al Ciudadano"**

**CONSTANCIA N° 244-USM-2017**

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

La muestra vegetal (tallo, hojas) recibida de **Karen Lilibeth MARTINEZ ALCALA y Marco Antonio GAMERO POLLERI**, estudiantes de la Facultad de Ciencias Farmacológicas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilazo de la Vega. y ha sido estudiada y clasificada como: ***Clinopodium pulchellum*** (Kunth) Govaerts y *tiene* posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

**DIVISION: MAGNOLIOPHYTA**

**CLASE: MAGNOLIOPSIDA**

**SUBCLASE: ASTERIDAE**

**ORDEN: LAMIALES**

**FAMILIA: LAMIACEAE**

**GENERO: *Clinopodium***

**ESPECIE: *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts.**

Nombre vulgar: "panizara"  
Determinado por Blgo. Severo Baldeon Malpartida

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

Lima, 30 de octubre de 2017

  
**Mg. Asunción A. Cano Echevarría**  
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)



**Anexo 04: FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE  
TAMIZAJE FITOQUÍMICO**

Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de  
*Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara” en cepas de  
*Salmonella enterica typhimurium* in vitro

**INSTRUCCIONES**

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

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

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

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

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

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

**Tabla 01: Tamizaje fitoquímico de extracto hidroalcohólico de hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”.**

<b>N° Tubo de Ensayo</b>	<b>Metabolito secundario</b>	<b>Reactivos</b>	<b>Reacción</b>	<b>Resultado</b>
<b>1</b>	Taninos	Gelatina -sal		
<b>2</b>	Aminoácidos Libres	Ninhidrina		
<b>3</b>	Compuestos fenólicos	Tricloruro férrico		
<b>4</b>	Alcaloides	Dragendorff		
<b>5</b>	Alcaloides	Mayer		
<b>6</b>	Alcaloides	Wagner		
<b>7</b>	Flavonoides	Shinoda		
<b>8</b>	Quinonas	Borntrager		
<b>9</b>	Azúcares	Molish		

Anexo 05.- Ficha de Validación por Juicio de Expertos.



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

Nº: \_\_\_\_\_

**HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO**

**FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS**  
**Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de**  
*Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts "panizara" en cepas de *Salmonella*  
*enterica typhimurium* in vitro

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

	MENOS DE					
	50	60	70	80	90	100
1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuesto? .....	( )	( )	( )	( )	( )	(X)
2. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidos a los conceptos del tema? .....	( )	( )	( )	( )	(X)	( )
3. ¿Qué porcentaje de los ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos? .....	( )	( )	( )	( )	( )	(X)
4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de ejecución viable? .....	( )	( )	( )	( )	( )	(X)
5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia lógica? .....	( )	( )	( )	( )	( )	(X)
6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrían datos similares si se aplicara en otras muestras? .....	( )	( )	( )	( )	( )	(X)

**SUGERENCIAS**

1. ¿Qué preguntas considera usted que deberían agregarse?

.....  
 .....  
 .....

2. ¿Qué preguntas estima que deberían eliminarse?

.....  
 .....

3. ¿Qué preguntas considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

.....  
 .....

Validado por: Dr. Gilmer, Solís Sánchez

Firma:



HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS  
Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de  
*Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts "panizara" en cepas de *Salmonella*  
*enterica typhimurium* in vitro

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

	MENOS DE					
	50	60	70	80	90	100
1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos?.....	( )	( )	( )	( )	( )	(X)
2. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidos a los conceptos del tema?.....	( )	( )	( )	( )	( )	(X)
3. ¿Qué porcentaje de los ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos?.....	( )	( )	( )	( )	( )	(X)
4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de ejecución viable?.....	( )	( )	( )	( )	(X)	( )
5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia lógica?.....	( )	( )	( )	( )	( )	(X)
6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrían datos similares si se aplicara en otras muestras?.....	( )	( )	( )	( )	( )	(X)

SUGERENCIAS

1. ¿Qué preguntas considera usted que deberían agregarse?

.....  
.....  
.....

2. ¿Qué preguntas estima que deberían eliminarse?

.....  
.....  
.....

3. ¿Qué preguntas considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

.....  
.....  
.....

Validado por: Q.F. Ignacio Loayza Palacios

Firma: \_\_\_\_\_



Matríz de Validación por Juicio de Expertos.



## UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA

### FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

#### Matriz de Validación de Contenido por Juicio de Expertos de la Ficha de Observación Ad-Hoc para la Recolección de Datos

*" Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de Clinopodium pulchellum (Kunth) Govaerts "panizara" en cepas de Salmonella enterica typhimurium in vitro"*

JUEZ VALIDADOR	Efectividad	Pertinencia	Suficiencia	Viabilidad	Secuencialidad	Repetitividad	
Dr. Gilmer Solis Sanchez	100	90	100	100	100	100	98.3
Dr. Loayza Palacios, Ignacio	100	100	100	90	100	100	98.3
	100	95	100	95	100	100	<b>98.3</b>

\*Instrumento Válido (>70%)

**Anexo 06: FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS**  
**FICHA DE OBSERVACIÓN AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS DE ESTUDIO**  
**MICROBIOLÓGICO**

*" Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de Clinopodium pulchellum (Kunth) Govaerts "panizara" en cepas de Salmonella enterica typhimurium in vitro "*

**INSTRUCCIONES**

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

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

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

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

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

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

**a) DATOS GENERALES.-**

**NÚMERO DE PLACA:**.....

**FECHA DE LA EVALUACIÓN:**.....

**b) DATOS ESPECÍFICOS.-**

<b>Muestras</b>	<b>TAMAÑO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)</b>
<b>EXTRACTO DE HOJAS DE <i>Clinopodium pulchellum (Kunth) Govaerts "panizara"</i>. CONCENTRACIÓN 50 %</b>	
<b>CLORANFENICOL</b>	
<b>CIPROFLOXACINO</b>	
<b>SULFAMETOXAZOL + TRIMETROPIM</b>	

Anexo 07.- Ficha de Validación por Juicio de Expertos.



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

Nº: \_\_\_\_\_

HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

CUESTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts "panizara" en cepas de *Salmonella enterica typhimurium* in vitro

	MENOS DE
	50 - 60 - 70 - 80 - 90 - 100
1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos? .....	( ) ( ) ( ) <b>70</b> ( ) ( )
2. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidos a los conceptos del tema? .....	( ) ( ) ( ) ( ) <b>85</b> ( )
3. ¿Qué porcentaje de los ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos? .....	( ) ( ) ( ) <b>80</b> ( ) ( )
4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de ejecución viable? .....	( ) ( ) ( ) ( ) <b>85</b> ( )
5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia lógica? .....	( ) ( ) ( ) ( ) <b>85</b> ( )
6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrían datos similares si se aplicara en otras muestras?.....	( ) ( ) ( ) ( ) <b>85</b> ( )

SUGERENCIAS

1. ¿Qué preguntas considera usted que deberían agregarse?

.....  
.....  
.....

2. ¿Qué preguntas estima que deberían eliminarse?

.....  
.....  
.....

3. ¿Qué preguntas considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

.....  
.....  
.....

Fecha: 11 de abril del 2015

Validado por: Dr. Jorge, Huamanchumo Flores

Firma:  .....



HOJA DE VALIDACIÓN DEL INSTRUMENTO

CUESTIONARIO AD-HOC DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts "panizara" en cepas de *Salmonella enterica typhimurium* in vitro

Después de revisar el instrumento, se valida su opinión acerca de lo siguiente

	MENOS DE
	50 - 60 - 70 - 80 - 90 - 100
1. ¿En qué porcentaje estima que con este instrumento se lograrán los objetivos propuestos? .....	( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ✓
2. ¿En qué porcentaje considera que los ítems están referidos a los conceptos del tema? .....	( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( )
3. ¿Qué porcentaje de los ítems planteados cree que son suficientes para lograr los objetivos? .....	( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ✓
4. ¿En qué porcentaje estima que los ítems del instrumento son de ejecución viable? .....	( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ✓
5. ¿Qué porcentaje de los ítems considera usted que siguen una secuencia lógica? .....	( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ✓
6. ¿En qué porcentaje valora usted que con este instrumento se obtendrían datos similares si se aplicara en otras muestras? .....	( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ( ) ✓

SUGERENCIAS

1. ¿Qué preguntas considera usted que deberían agregarse?

*Ninguna*

2. ¿Qué preguntas estima que deberían eliminarse?

*Ninguna*

3. ¿Qué preguntas considera que deberán reformularse o precisarse mejor?

*Ninguna*

Fecha: 11 de abril del 2015

Validado por: Dr. Gilmer, Soledad Sánchez

Firma: \_\_\_\_\_

Anexo 08.-Matríz de Validación por Juicio de Expertos.



## UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA

### FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

#### Matriz de Validación de Contenido por Juicio de Expertos de la Ficha de Observación Ad-Hoc para la Recolección de Datos

*" Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de Clinopodium pulchellum (Kunth) Govaerts "panizara" en cepas de Salmonella enterica typhimurium in vitro"*

JUEZ VALIDADOR	Efectividad	Pertinencia	Suficiencia	Viabilidad	Secuencialidad	Repetitividad	
Dr. Gilmer Solis Sanchez	100	100	100	100	100	100	100
Dr. Jorge Huamanchumo Flores	80	90	80	90	90	90	86.6
	90	95	90	95	95	95	<b>93.3</b>

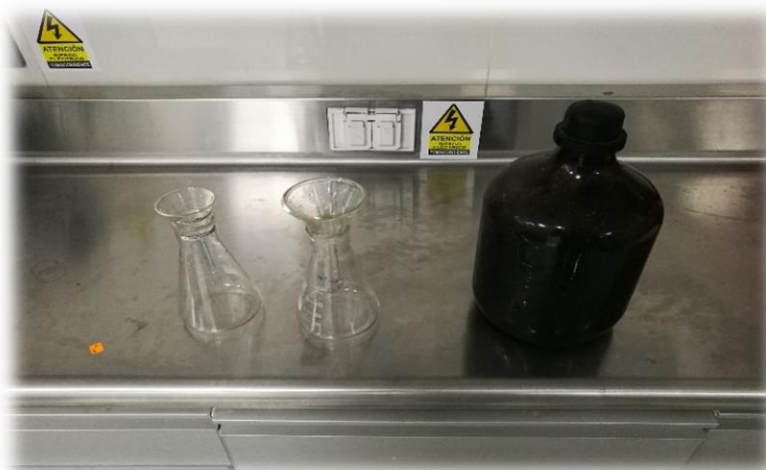
\*Instrumento Válido (>70%)

**Anexo 09: Materia prima y extracción.**

**Fotografía 01:** Hoja seca de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”.



**Fotografía 02:** Maceración de hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”.



**Fotografía 03:** Filtración y obtención del extracto.



**Fotografía 04:** Concentración a sequedad del extracto

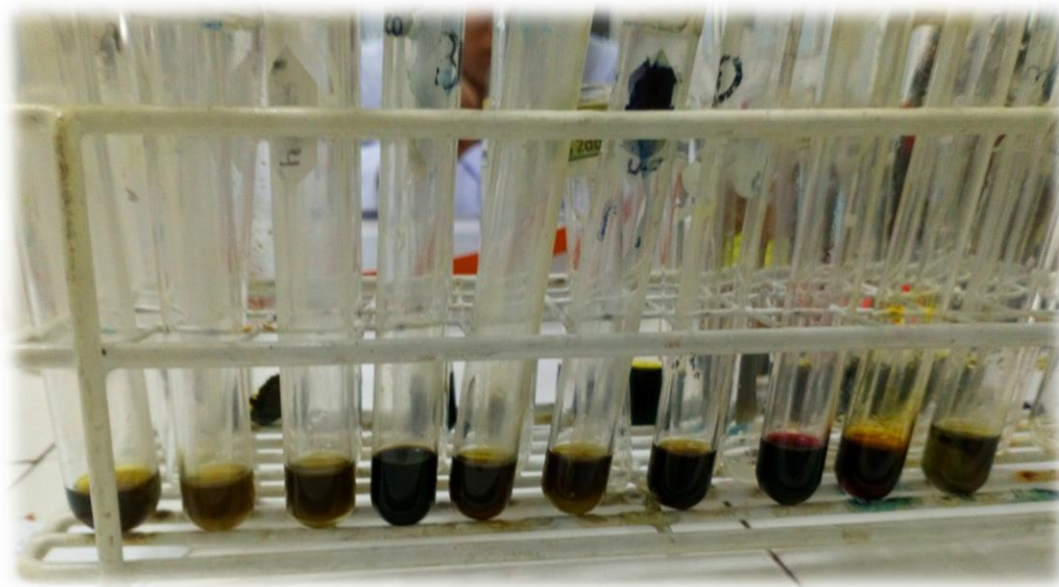


**Anexo 10:** Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas secas de *Clinopodium pulchellum* (Kunth) Govaerts “panizara”.

**Fotografía 05:** Reactivos utilizados en identificación de metabolitos secundarios.



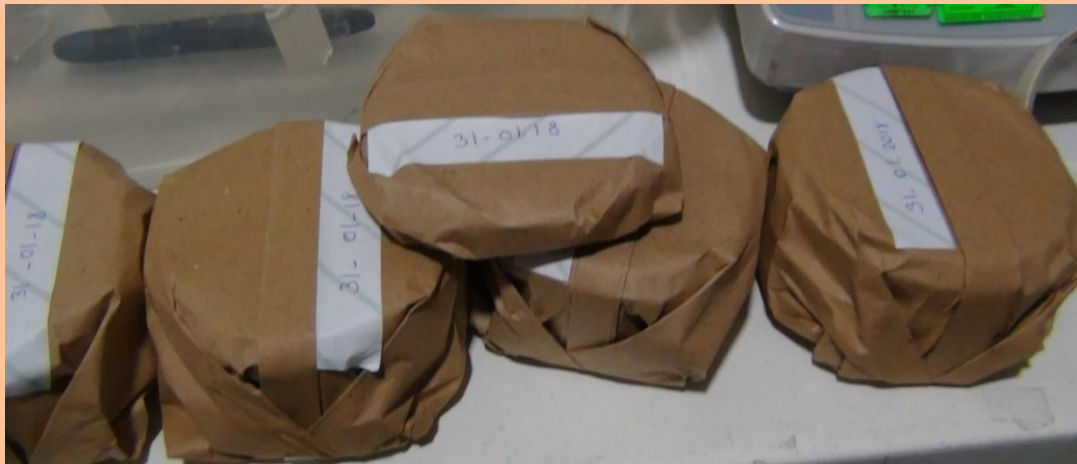
**Fotografía 06:** Evaluación cualitativa de metabolitos secundarios..



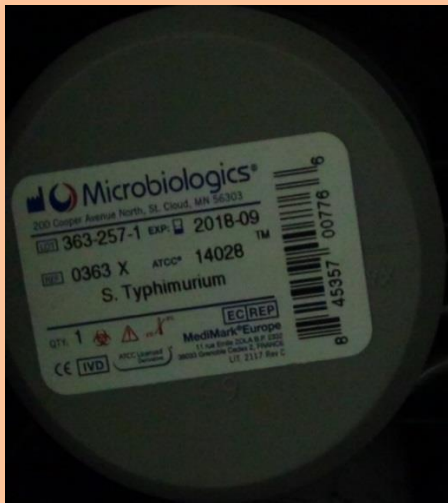


**Anexo 11:** Análisis microbiológico.

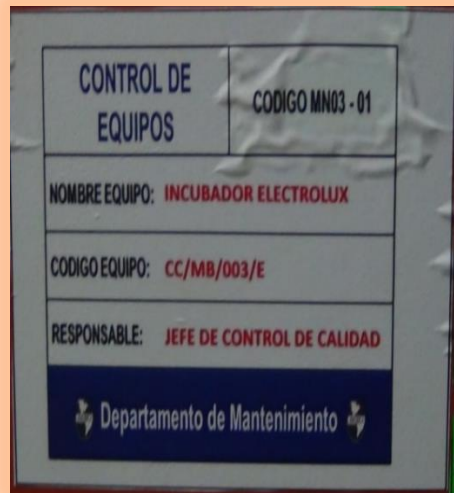
**Fotografía 07:** Placas Petri esterilizadas



**Fotografía 08:** Bacterias certificadas de *salmonella entérica typhimurium* cepas ATCC 14028



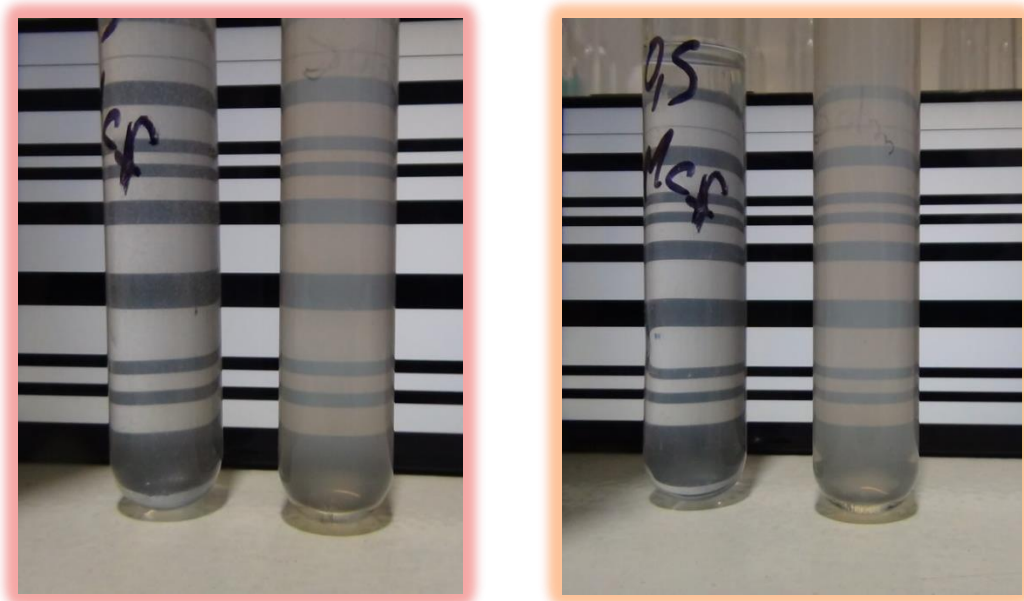
**Fotografía 09:** Equipo de incubación de bacterias



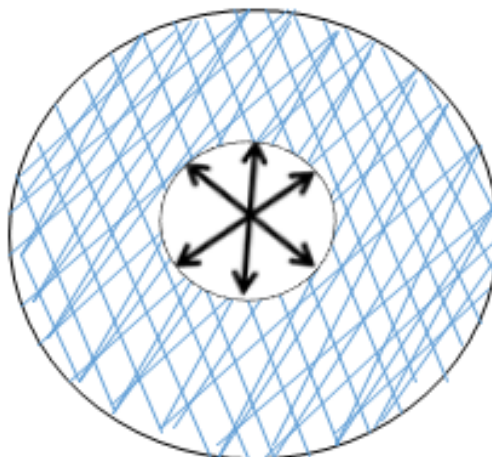
**Fotografía 10:** Bacteria *Salmonella entérica* typhimurium activada en agar XLD armonizado.



**Fotografía 11:** Comparación de turbidez Mcfarland.



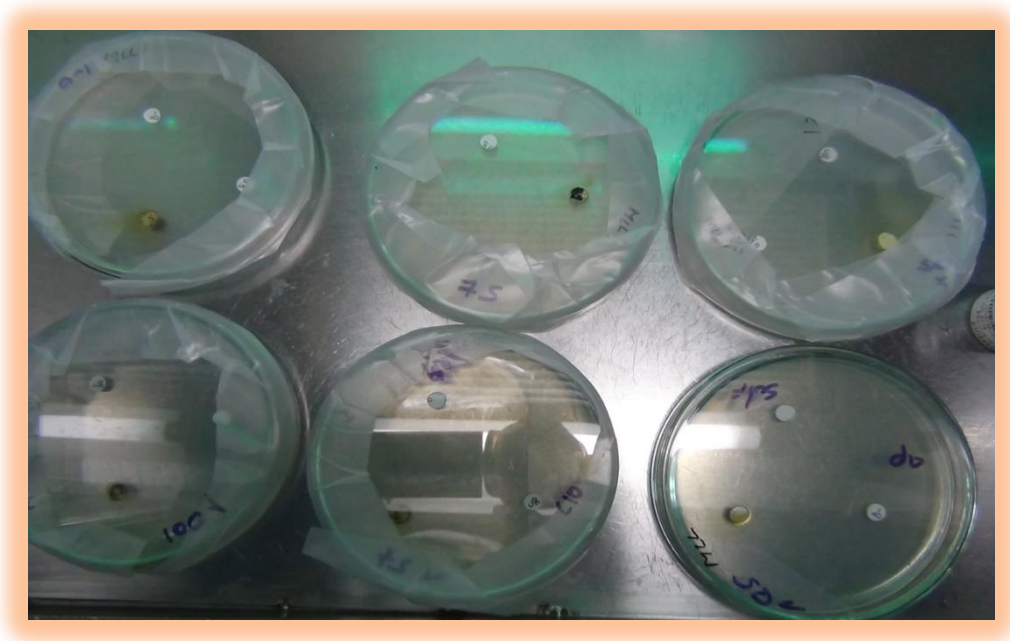
**Fotografía 12:** Direcciones en el sembrado del inóculo sobre la superficie del agar.

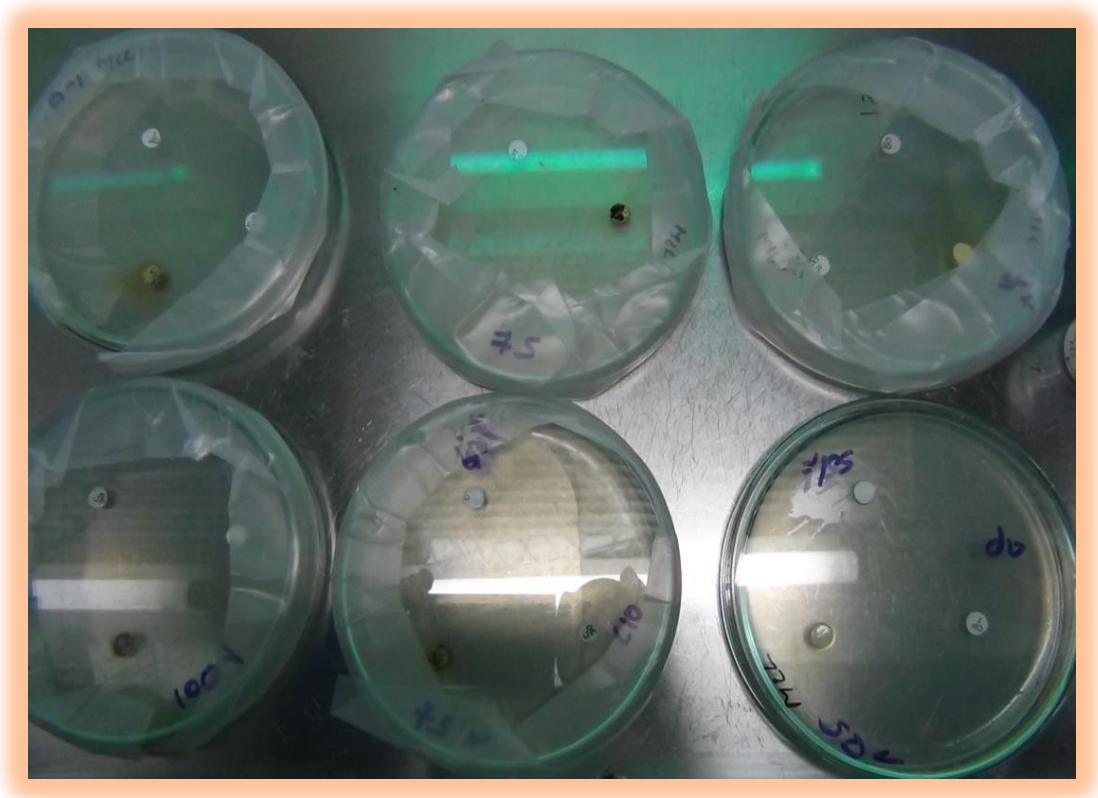


**Fotografía 13:** Placa Petri conteniendo agar sin sembrado de bacterias (BLANCO)

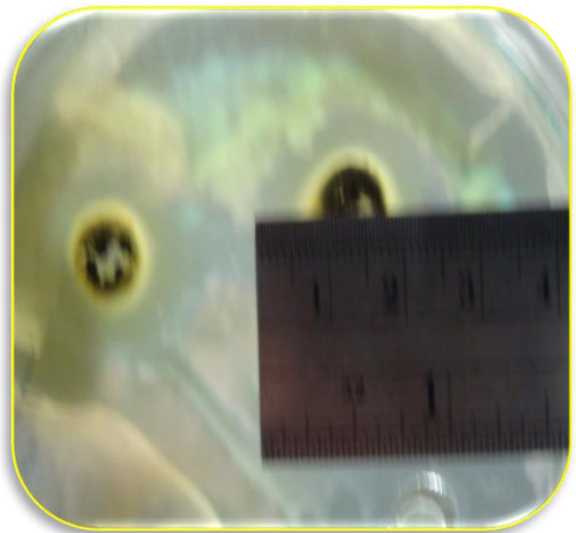
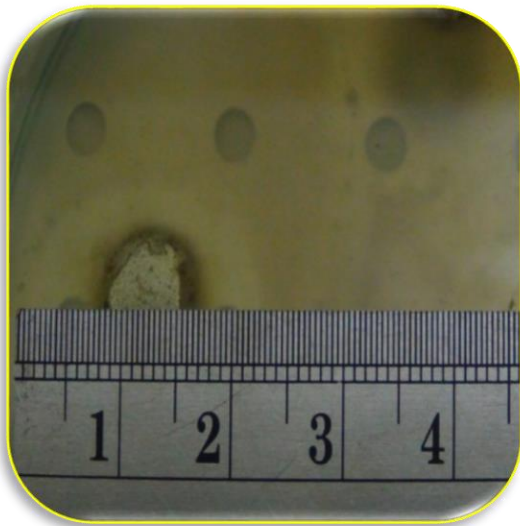


**Fotografía 14:** Placas inoculadas con colonias de bacterias *salmonella enterica typhimurium* antes de incubarse

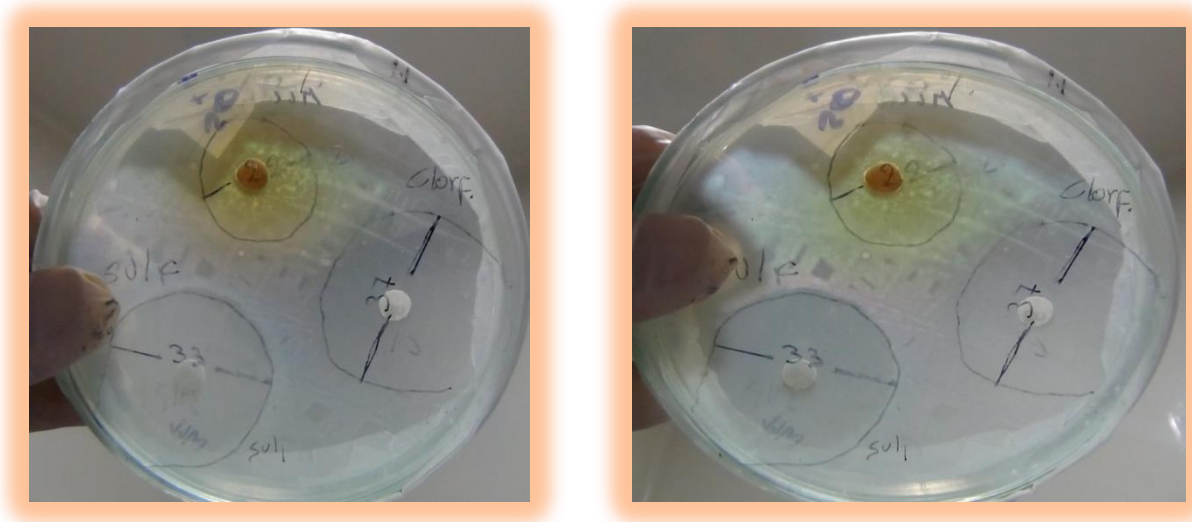




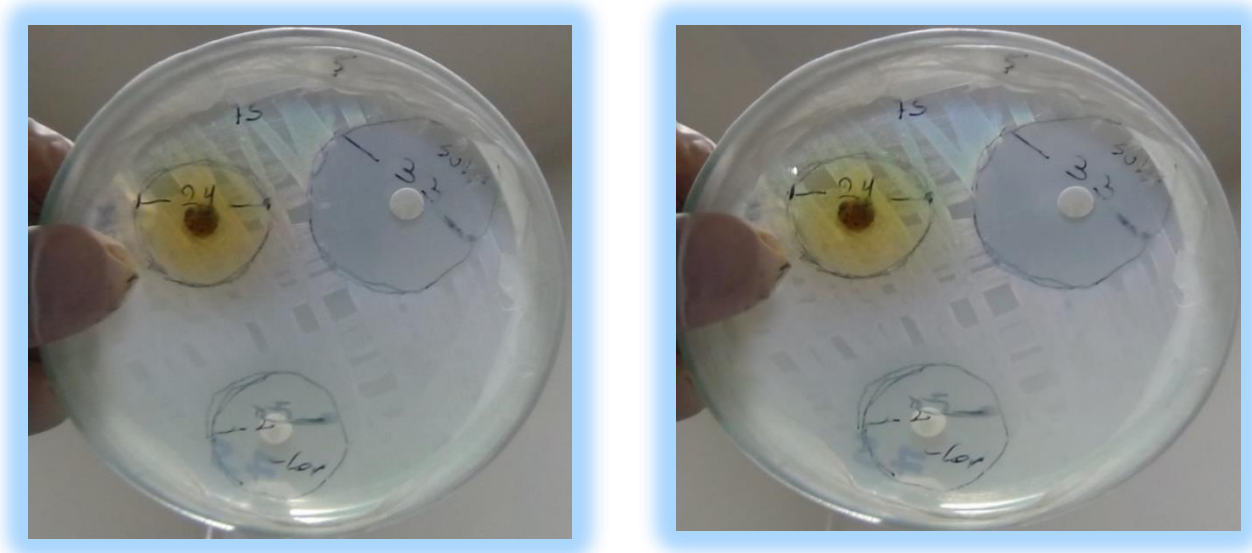
**Fotografía 15:** Medición de halos de inhibición formadas en placas.



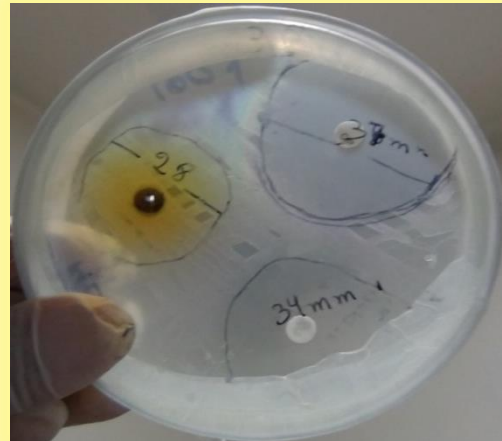
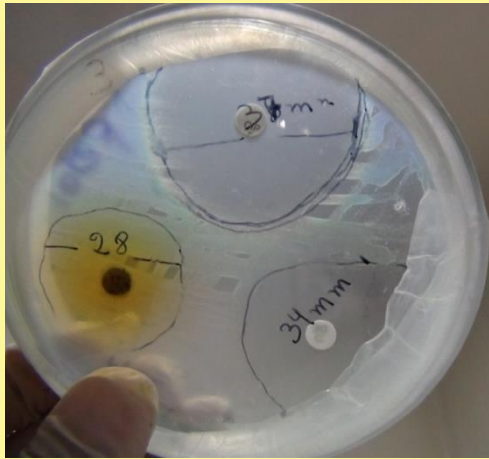
**Fotografía 16 PLACA 4:** Concentración al 50% en comparación con sulfametoxazol y cloranfenicol.



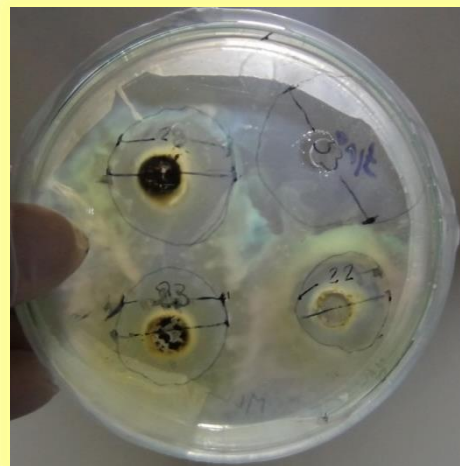
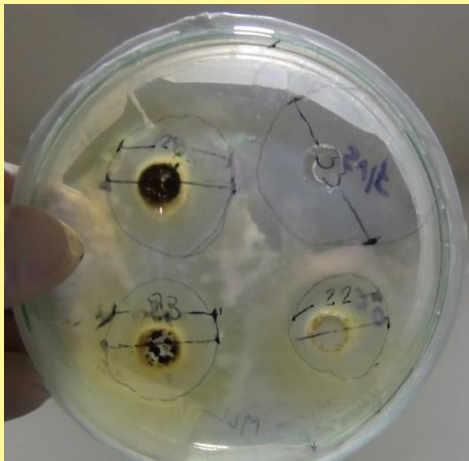
**Fotografía 17 PLACA 5:** Concentración de 43% comparado con Cloranfenicol y sulfametoxazol mas Trimetropin.



**Fotografía 18 PLACA 3:** Concentración de 50%.



**Fotografía 19 PLACA 1:** Concentración del extracto 33, 43, 50%



Fotografía 20 PLACA 2: Concentración de 33, 43, 50%

