

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



**EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Cistus ladanifer* (JARA)
EN CEPAS *Staphylococcus aureus***

**Tesis para optar el título profesional de Químico
Farmacéutico y Bioquímico**

TESISTAS:

Bach. Linares Palomares Kiara Melina

Bach. Pérez Ramos Jenifer

ASESOR: Mg. Q.F. Jacinto Hervias Pedro

Lima – Perú

2019

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a Dios el creador de todas las cosas y a mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

Kiara Linares

Este trabajo está dedicado a Dios el creador de todas las cosas y a mi familia por el apoyo desinteresado principalmente a mi madre por la confianza, consejos, oportunidad y recursos para lograrlo.

Jenifer Perez

AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer en primer lugar a nuestra Universidad Inca Garcilaso de la Vega, quien abrió sus puertas para acogernos como estudiante en sus aulas y con la participación de los profesores supieron formarnos como buenos profesionales en el campo de las Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica .

A nuestros compañeros de promoción, con quienes compartimos agradables momentos en las aulas y fuera de ellas y nos ayudaron en los momentos difíciles en el aula de clase.

A nuestros familiares que siempre nos apoyaron y confiaron en nuestro éxito como estudiante y ahora como profesionales.

Kiara y Jenifer

ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Concentración Mínima Inhibitoria
CMB	Concentración Máxima Bactericida
FeCl ₃	Tricloruro Férrico
HCl	Ácido Clorhídrico
H ₂ O	Agua
lb/pg ²	Libra Pulgadas Cuadradas
MINSA	Ministerio de Salud
mL	Mililitros
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial de Hidrógeno
ufc	Unidades Formadoras de Colonias
µg	Microgramos
°C	Celsius

ÍNDICE

DEDICATORIA	AGRADECIMIENTO	ABREVIATURA	RESUMEN	
ABSTRACT	INTRODUCCIÓN			
1	CAPÍTULO I	PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN		3
1.1.	DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD	3	PROBLEMÁTICA	1.2.
	FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	4		
	1.2.1	Problema General		4
	1.2.2	Problema Específico		4
1.3	Objetivos			4
	1.3.1	Objetivo general		4
	1.3.2	Objetivo específico		5
1.4	Justificación			5
CAPÍTULO II	MARCO TEÓRICO			6
2.1	Antecedentes			6
	2.1.1	Nacionales		6
	2.1.2	Internacionales		9
2.2	BASES TEÓRICAS			14
	2.2.1	Antibacteriano		14
	2.2.2	Extractos		17
	2.2.3	<i>Cistus ladanifer</i> (Jara)		20
	2.2.4	<i>Staphylococcus aureus</i>		23
2.3	FORMULACIÓN DE HIPÓTESIS			24
	2.3.1.	Hipótesis general		25
	2.3.2	Hipótesis específica		25
2.4	VARIABLES			26
	2.4.1	Tabla de operacionalización de variables		26
	2.4.2	Marco conceptual		26
CAPÍTULO III	METODOLOGÍA			29
3.1	Tipo de estudio			29
3.2	Diseño de estudio			29
3.3.	Población			29

3.4	Muestra	29
	3.4.1 Técnica e instrumento de recolección de la muestra	30
3.5	Instrumentos de recolección de datos	44
3.6	Análisis estadísticos y procesamiento de datos	45
CAPÍTULO IV RESULTADOS		46
4.1	Resultados de la investigación	46
	4.1.1 Prueba de solubilidad	43
	4.1.2 Marcha fitoquímica	43
	4.1.3 Efecto antibacteriano	44
4.2	Contrastación de hipótesis	49
4.3	Discusión de resultados	51
CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		53
	5.1. Conclusiones	53
	5.2. Recomendaciones	53
Bibliografía		54
Anexos		58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación de las bacterias según la tinción Gram	15
Tabla 2	Clasificación de los antibióticos según su acción	16
Tabla 3	Prueba de solubilidad	35
Tabla 4	Marcha fotoquímica	37
Tabla 5		46
Tabla 6	Resultados de la prueba de solubilidad	47
Tabla 7	Resultados de la marcha fitoquímica	48
Tabla 8	Resultados del efecto antibacteriano	50
Tabla 9	Estadísticas descriptivas para los halos obtenidos a diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de <i>Cistus ladanifer</i> (Jara)	51
	Tamaño de los Halos de Inhibición	

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción	17
Figura 2	Elaboración de extractos vegetales	18
Figura 3	Método de concentración de extractos (Rotavapor)	20
Figura 4	Herborizado de <i>Cistus ladanifer</i> (Jara)	22
Figura 5	Placas Petri con <i>Staphylococcus aureus</i>	24
Figura 6	Infecciones causadas por <i>Staphylococcus aureus</i>	25
Figura 7	Mapa del Distrito de Oxapampa departamento de Pasco	30
Figura 8	Obtención del extracto Etanólico de las hojas de <i>Cistus ladanifer</i> (Jara)	33
Figura 9	Batería usada en prueba de solubilidad	34
Figura 10	Batería usada en la marcha fitoquímica	37
Figura 11	Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos	38
Figura 12	Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Federico Villareal Lima – Perú	38
Figura 13	Preparación de concentraciones con el extracto etanólico de las hojas de <i>Cistus ladanifer</i> (Jara)	39
Figura 14	Método de difusión con discos de Kirby- Bauer	40
Figura 15	Preparación de un medio de cultivo	40

Figura 16	Preparación de un inóculo bacteriano	41
Figura 17	Inoculación de placas con espátula de Drigalsky	42
Figura 18	Forma correcta de inocular discos en placas	43
Figura 19	Lectura del efecto antibacteriano	44
Figura 20	Diferencia de recorrido de los halos	46

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Formato de prueba de solubilidad	58
Anexo 2	Formato de marcha fitoquímica	58
Anexo 3	Formato de efecto antibacteriano	59
Anexo 4	Selección de la especie botánica hojas de <i>Cistus ladanifer</i> (Jara)	60
Anexo 5	Obtención del extracto etanólico de las hojas de <i>Cistus ladanifer</i> (Jara)	61
Anexo 6	Obtención del extractos seco de las hojas de <i>Cistus ladanifer</i> (Jara)	62
Anexo 7	Prueba de solubilidad	63
Anexo 8	Marcha fitoquímica	64
Anexo 9	Efecto antibacteriano	65
Anexo 10	Certificado de la cepa de estudio	69
Anexo 11	Certificado de la especie botánica	70
Anexo 12	Matriz de consistencia	71

RESUMEN

El presente estudio se desarrolló con la finalidad de determinar el efecto antibacteriano en cepas de *Staphylococcus aureus* del extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara). La muestra biológica fue proveniente del distrito de Oxapampa departamento de Pasco y las cepas fueron una donación de la Facultad de Medicina de la Universidad Federico Villareal. El estudio realizado fue de tipo experimental. La preparación del extracto y el efecto antibacteriano se llevó a cabo en la Facultad de ciencias Farmacéuticas de la Universidad inca Garcilaso de la Vega. Una vez obtenida el extracto, se determinó la prueba de solubilidad y la marcha fitoquímica, el efecto antibacteriano siguió la metodología diseñada Kirby – Bauer. La muestra resultó ser soluble en etanol y agua, la marcha fitoquímica evidenció la presencia de flavonoides, taninos y compuestos fenólicos, las soluciones preparadas con el extracto etanólico al 25% reportaron un halo de 11.60 mm, la solución al 50% reportó un halo de 14.55 mm y la concentración al 75% reportó un halo de 16.3 mm. El fármaco control reportó un halo de inhibición de 45.04 mm. Todas las muestras reportaron efecto antibacteriano sobre *Staphylococcus aureus* lo cual evidencia el potencial microbiológico de nuestra especie de estudio, sin embargo las concentraciones estudiadas no superaron al control positivo que fue amoxicilina. Se concluye que el extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) pose efecto antibacteriano. La presencia de metabolitos secundarios: compuestos fenólicos, flavonoides y taninos hallados en el extracto son posiblemente los responsables de esta actividad y pueden ser utilizados en otros procedimientos farmacológicos.

Palabras clave: Extracto etanólico, *Cistus ladanifer* (Jara), *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The present study was developed with the purpose of determining the antibacterial effect in *Staphylococcus aureus* strains of the ethanolic extract of the leaves of *Cistus ladanifer* (Jara). The biological sample was from the Oxapampa district of Junín department and the strains were a donation from the Federico Villareal University School of Medicine. The study was experimental. The preparation of the extract and the antibacterial effect was carried out in the Faculty of Pharmaceutical Sciences of the Inca University Garcilaso de la Vega. Once the extract was obtained, the solubility test and phytochemical gait were determined, the antibacterial effect followed the KirbyBauer designed methodology. The sample turned out to be soluble in ethanol and water, the phytochemical march evidenced the presence of flavonoids, tannins and phenolic compounds, the solutions prepared with the 25% ethanol extract reported a halo of 11.60 mm, the 50% solution reported a halo of 14.55 mm and the 75% concentration reported a halo of 16.3 mm. The control drug reported an inhibition halo of 45.04 mm. All samples reported an antibacterial effect on *Staphylococcus aureus* which evidences the microbiological potential of the study species, however the concentrations studied did not exceed the positive control that was amoxicillin. It is concluded that the ethanolic extract of the leaves of *Cistus ladanifer* (Jara) has an antibacterial effect. The presence of secondary metabolites found in the extract are possibly responsible for this activity and can be used in other pharmacological procedures.

Keywords: Ethanolic extract, *Cistus ladanifer* (Jara), *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCCIÓN

El ser humano tiene una estrecha relación con la flora y la fauna, de ella logró adquirir conocimientos y experiencia, haciendo que esta información fuera parte de su tradición aprendió a cultivar y respetar las propiedades terapéuticas y medicinales de las plantas. Hoy en la que la tecnología ha desplazado a las costumbres ancestrales, nuevamente los ojos de la ciencia enfocan su mirada en las plantas como recurso terapéutico y como posible solución a las enfermedades emergentes en la que los medicamentos ya están perdiendo su eficacia, la medicina tradicional y folclórica, no da una información valedera que necesariamente necesita ser validada desde el punto de vista científico.

El relanzamiento de los productos naturales por laboratorios importantes, han logrado que los institutos de investigación, universidades y asociaciones científicas, desarrollen investigaciones dirigidas al descubrimiento de nuevos componentes con acciones farmacológicas provenientes de origen natural. La mayoría de los estudios se encaminaron a descubrir propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes, cicatrizantes etc.

Las especies *Cistus ladanifer* podemos encontrarlas en España, Portugal donde son aprovechadas por la población en diferentes dolencias como inflamación, dolor, cicatrizante y en el tratamiento de algunas infecciones.

En nuestro país la producción silvestre de esta planta se ubica en la sierra y en la selva donde se le conoce con el nombre vulgar de “Jara” (1).

La parte útil de la planta son las hojas y los tallos, es muy apreciada como antiséptico, investigaciones refieren que esta planta presenta actividades antibacterianas, antiinflamatorias, antioxidante entre otras (2).

Los estudios pre clínicos de algunas de las especies de *Cistus ladanifer* han reportado propiedades sobre bacterias Gram positiva, como *Staphylococcus aureus*, y esto puede deberse a la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, taninos, saponinas, fenoles y compuestos antraquinónicos (3)

Debido al uso inadecuado de medicamentos, a la aparición de resistencia bacteriana y a la mutación de los agentes patógenos, se está a la búsqueda

de nuevos antibióticos naturales, y esta planta de estudio puede ser una alternativa de tratamiento.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) sostiene que “la resistencia a medicamentos para el tratamiento por infecciones de *Staphylococcus aureus* es prevalente en los hospitales y la población. Se estima que hay una probabilidad de mortalidad en un 64% en pacientes infectados con cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*” (4)

Por consiguiente; con la presente investigación se pretende demostrar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de la especie *Cistus ladanifer* “Jara” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y plantear una nueva alternativa de tratamiento o un tratamiento concomitante a esta bacteria.

CAPÍTULO I:

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la realidad problemática

La Organización Mundial de la Salud reportó que el número de pacientes que mueren por resistencia bacteriana o falta de medicamentos cada vez va en aumento y los suministros de salud son cada vez menor, esta sumado a una sobre actividad de los profesionales de la salud para apoyar en la primera línea de tratamiento.

En los hospitales del Perú, las infecciones intrahospitalarias reportan un 30 a 40% de casos nuevos, y las medidas preventivas poco han hecho para revertir estas cifras, descubriéndose cada vez la manifestación de nuevos patógenos en los nosocomios. (4)

Según Martin Yanguí Moscoso el Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos de la Organización, denominado GLASS por sus siglas en inglés, ha revelado la presencia generalizada de resistencia a los antibióticos en muestras de 500 000 personas de 22 países en las que se sospechaban infecciones bacterianas. (4)

El Instituto Nacional de Salud, en su informe de resistencia antimicrobiana a nivel de los hospitales del Perú, manifiesta que los principales microorganismos infecciosos son: *S. aureus*, *S. coagulasa negativo*, *P. aeruginosa*, *Enterococcus*, *Enterobacter*, *E. coli*, *Candida albicans*, *Klebsiella*. Asimismo, mencionan que los pacientes con mayor probabilidad de adquirir infecciones por cepas resistentes son lo que se encuentran en las Unidades de Cuidados Intensivos, y como consecuencia de ello se observa la ineficacia al tratamiento establecido, existiendo riesgo de muerte.

El Ministerio de Salud informó que la automedicación, el uso inadecuado de los medicamentos, el aumento de la promoción por parte de los visitantes médicos que incumplen la normativa vigente, el desconocimiento del uso correcto de los fármacos, conducen a una resistencia bacteriana.

Staphylococcus aureus es un patógeno importante que afecta la salud humana. Esta problemática motiva a diseñar medidas de control

farmacoterapéutico a través del descubrimiento de principios activos de origen natural que reemplacen óptimamente a los fármacos antimicrobianos comúnmente empleados en el tratamiento, logrando así combatir la resistencia microbiana.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿El extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) tendrá efectos antibacterianos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* en estudio in vitro?

1.2.2 Problemas específicos

1. ¿Qué metabolitos secundarios están presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)?
2. ¿Cuál será la concentración del extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) que posee efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* en estudio in vitro?
3. ¿Qué nivel de eficacia presentará el extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) en comparación con la Amoxicilina frente a cepas de *Staphylococcus aureus* en estudio in vitro?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* en estudio in vitro

1.3.2 Objetivos específicos

1. Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de ***Cistus ladanifer*** (Jara)
2. Determinar la concentración del extracto etanólico de las hojas de ***Cistus ladanifer*** (Jara) que posee efecto antibacteriano frente a cepas de ***Staphylococcus aureus*** en estudio in vitro
3. Comparar el nivel de eficacia que presentará el extracto etanólico de las hojas de ***Cistus ladanifer*** (Jara) y la Amoxicilina frente a cepas de ***Staphylococcus aureus*** en estudio in vitro

1.4 Justificación e importancia del estudio

Este estudio es importante porque gracias a los resultados que se obtengan esta planta podrá ser usada como una nueva alternativa para el tratamiento de cepas resistentes a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Micobacterium tuberculosis*; desarrollando así el campo microbiológico.

Este estudio es importante porque se podrá difundir a *Cistus ladanifer* (Jara) como un recurso terapéutico para ser usado en todas las regiones del país.

Este estudio es importante porque se podrá poner a disposición los recursos naturales del Perú y sus plantas medicinales en el contexto científico a fin de que sean estudiadas por más profesionales en todo el mundo empleando mejores y más sofisticadas técnicas analíticas y cubrir no solo la fase pre clínica sino también la fase clínica y si es posible elucidar los metabolitos y patentar un nuevo compuesto con propiedades antibacterianas.

Este estudio revaloriza el trabajo de los agricultores que se dedican al cultivo de esta planta la cual por los resultados obtenidos, alcanzará un valor agregado en la venta del mismo, mejorando la economía de los agricultores.

CAPÍTULO II

MARCO TEORICO

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 Nacionales

Calcina J. Pachas D. (2018) Actividad antibacteriana in vitro de antibióticos de uso común en combinación con extractos de plantas frente a bacterias patógenas farmacorresistentes. El objetivo de evaluar la actividad antibacteriana in vitro de antibióticos de uso común en combinación con extractos de plantas frente a bacterias patógenas farmacorresistentes. Metodología, la parte experimental se desarrolló en el laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNA-Puno, para lo cual se aplicó el método de maceración, microdilución en caldo, pozo-placa de Kirby-Bauer y difusión en disco de Kirby-Bauer, se usó el ANOVA para analizar los datos. Los resultados para concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos metanólicos del ajo, kiñón, manzanilla y eucalipto frente a *E. coli* farmacorresistente fueron de 32, 16, 8 y 4 µg/ml respectivamente; la CMI para los extractos del ajo, kiñón, eucalipto y manzanilla frente a cepas de *S. aureus* farmacorresistente fueron de 8, 0.5, 0.25 y 0.06 µg/ml respectivamente. Según los halos de inhibición el extracto metanólico del eucalipto mostró el mejor efecto antibacteriano con un promedio de 26.98 mm frente a *S. aureus* farmacorresistente, respecto de la vancomicina que fue de 13 mm; a su vez el extracto de eucalipto mostró un promedio de 8.6 mm de halos de inhibición frente a *E. coli* farmacorresistente respecto de la gentamicina que fue de 20 mm. En las combinaciones de los extractos con los antibióticos frente a *S. aureus* farmacorresistente, el mejor efecto antibacteriano mostrado por la penicilina (7 mm/sin combinación) fue con el extracto de eucalipto con 29 mm; la amoxicilina (7 mm) con el extracto de eucalipto con 29 mm; el cloranfenicol (28 mm) con el extracto de ajo con 34.075 mm; así mismo el sulfametoxazol/trimetoprim (27 mm) con el extracto de ajo 33.58 mm; el ciprofloxacino (17 mm) con el extracto de eucalipto con 28.5 mm de halos de inhibición. El cloranfenicol (28 mm) en combinación con el extracto de kiñón mostró la mejor inhibición con 29.23 mm frente *Escherichia coli* farmacorresistente. (33)

Barrientos A. (2017) el objetivo de esta investigación fue conocer la actividad antibacteriana del aceite esencial de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) en comparación a la clorhexidina al 0.12% sobre cepas de *Streptococcus mutans* ATCC 25175. Estudio *in vitro*. El estudio fue de tipo experimental, prospectivo y longitudinal. El aceite esencial se obtuvo utilizando el método de destilación por arrastre de vapor de agua utilizando la corteza de *Cinnamomum zeylanicum* (canela). Para el análisis microbiológico se utilizó el aceite esencial de canela al 100% y se aplicó el método de agar en pozo; para ello, se prepararon 30 placas Petri con agar Muller Hinton; cada placa tenía un pozo de 6 mm de diámetro saturados con aceite esencial de canela y clorhexidina al 0.12 % (DENTODEX®). Las muestras se incubaron a 37°C, y fueron retiradas únicamente para medir y registrar los halos de inhibición bacteriana al cabo de 72 y 120 horas. El aceite esencial fue comparado con clorhexidina al 0.12 % como control positivo para *Streptococcus mutans* ATCC 25175; como control negativo se utilizó agua destilada estéril. Los datos fueron procesados en el programa SPSS y se aplicó la prueba estadística T – Student. Concluyéndose que el aceite esencial de *Cinnamomum zeylanicum* (canela) mostró estabilidad y actividad antibacteriana “*in vitro*” en cultivos de *Streptococcus mutans* ATCC 25175 a las 72 horas y 120 horas. La clorhexidina al 0.12% tuvo una mayor actividad antibacteriana que el aceite esencial frente a esta cepa bacteriana a las 120 horas. (34)

Arauco k. (2016). Realizó un estudio en el cual tuvo como objetivo evaluar el efecto antiinflamatorio y analgésico del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica (Benth) endlicher* (mullaca). Evaluó la presencia de metabolitos secundarios del extracto alcohólico de la planta mencionada mediante la marcha fitoquímica. Se demostró la presencia de taninos, quinonas, compuestos fenólicos, grupos aminos libres, flavonoides, terpenos y/o esteroides. La actividad antiinflamatoria se evaluó *in vivo* empleando el método de granuloma según Sedwicks, inducido por carragenina y en sangre, fue evaluado por histopatología. Trabajaron con cuatro concentraciones 50 mg/kg, 250 mg/kg, 750 mg/kg y 2,000 mg/kg llegando a obtener resultados sin efectos tóxicos y adversos al ser comparados con el control, concluye que se ha evidenciado que el extracto etanólico si posee efecto antiinflamatorio y analgésico en ratas y no presenta efectos tóxicos en ratones. (6)

Huapaya J et al (2012), en el artículo científico titulado: “Control microbiológico y evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de ***Croton lechleri*** (Sangre de grado)”, El objetivo fue determinar la actividad antibacteriana del látex de *Croton lechleri* frente a *Staphylococcus aureus*. Las muestras fueron 47, obtenidas en diferentes mercados de los distritos de Lima Metropolitana (Lima cercado, Lince, Magdalena y Comas) Además, se examinaron 3 muestras del látex de las regiones de Huánuco (Tingo María), Ucayali (Pucallpa) y San Martín (Moyobamba). En este estudio se empleó el método de excavación en placa de cultivo, en diluciones 10%, 25%, 50% y 100% y como control positivo (Ciprofloxacino, 5mg/mL), negativos (suero fisiológico), con dos repeticiones por tratamiento; las cuales fueron incubadas a 37°C por 24 horas. Los resultados concluyen que hay mayor actividad antimicrobiana en concentraciones del 50% y 100% del látex de *Croton lechleri*, observándose halos de inhibición similares al control positivo en las cepas de *S. aureus* (7).

Guevara, J. (2012), artículo, realizó el estudio de “acción in vitro de diez plantas medicinales sobre diez cepas diferentes de *streptococcus pneumoniae*”, Perú. el objetivo del investigador fue determinar la efectividad de diez plantas medicinales frente a *streptococcus pneumoniae*. los extractos de 10 plantas medicinales fueron puestos en contacto in vitro con 10 cepas de *streptococcus pneumoniae*, los resultados de actividad de las plantas medicinales sobre las cepas de *streptococcus pneumoniae* son el almendro y bellaco caspi fueron las únicas plantas que dieron pequeño halo de inhibición con algunas cepas; “con almendro se inhibió dos cepas y con bellaco caspi, se inhibió siete cepas y tres resultaron resistentes”. estos resultados no tuvieron relación con el serotipo de neumococo ni con los antibióticos utilizados en los antibiogramas realizados previamente. “su conclusión es que el bellaco caspi podría ser una alternativa para atacar al neumococo en la nasofaringe”. Pero, por haber presentado resistencia a tres cepas de *streptococcus pneumoniae*, antes de usarlo sería conveniente desarrollar un antibiograma de los neumococos contra las plantas medicinales (8)

Kloucek, P. (2005). Al desarrollar una investigación sobre efecto antibacteriano con extractos etanólicos al 80% de nueve plantas obtenidos por maceración durante 5 días, una de las muestras ensayadas fue la *C. spinosa* (vainas); se utilizaron cinco cepas Gram positivas y tres Gram negativas usando el método de microdilución del caldo de cultivo (*broth microdilution*) con resultados poco relevantes para la muestra mencionada a excepción del ensayo contra *Enterococcus faecalis* en el que se observó una CIM de 0,5 µg/ml, mientras que para *Bacillus cereus* fue de 8 µg/ml y 18 de 16 µg/ml para *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacteroides fragilis* (5)

Rivas E. (2005) Realizó una investigación cuyo objetivo fue estudiar la actividad analgésica de *Maytenuskrukovii* (chuchuhuasi), *Alchornea castaneifolia* (hiporuro), *Sambucusnigra* (saúco) y *Aristeguietia discolor* (pulmonaria), utilizando para ello la forma del extracto metanólico, se utilizó el método de estiramiento por inyección de ácido acético en ratones albinos, el cual se administró por vía intraperitoneal, con una concentración de solución del 3% en la dosis de 2ml/Kg en agua desionizada. Se encontró actividad analgésica con las siguientes concentraciones de 1000 mg/kg, 250 mg/kg, 250 mg/kg, y 750 mg/kg, por vía oral; posteriormente se estableció que el resultado era comparable al obtenido con ibuprofeno. Por lo tanto, se demostró por completo la actividad analgésica de los extractos metanólicos de *Maytenuskrukovii* (chuchuhuasi), *Alchornea castaneifolia* (hiporuro), *Sambucusnigra* (saúco) y *Aristeguietia discolor* (pulmonaria).

2.1.2 Internacionales

Collaguazo E. (2019) El objetivo principal de este estudio fue evaluar la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Hedyosmum* sp. del bosque natural Jacarón frente a cinco especies bacterianas incluyendo

Staphylococcus aureus, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. El aceite fue obtenido a partir de las hojas frescas mediante el método de hidrodestilación usando la trampa de Clevenger y se obtuvo un rendimiento de 0,09%. La actividad antibacteriana fue detectada a través del método Kirby-Bauer o de difusión en agar e interpretada mediante las zonas de inhibición observadas. Se realizó un primer ensayo empleando el aceite puro y la concentración mínima inhibitoria (CMI) aproximada se determinó desde la concentración de 500000 µg/dL. *P. aeruginosa* fue la bacteria más sensible a la acción del aceite puro, seguida de *E. coli* y *K. pneumoniae*, y las bacterias grampositivas no mostraron susceptibilidad a este. La CMI aproximada del aceite frente *P. aeruginosa* fue de 250000 µg/mL, y para el resto de las cepas fue ≥ 500000 µg/mL. Se concluye que el aceite esencial de *Hedyosmum* sp. a las concentraciones ensayadas resultó ser activo solo frente a las bacterias gramnegativas empleadas en este estudio. (35)

Cushquicushma P. (2018) El presente trabajo de investigación tuvo como objetivo la determinación de la actividad antibacteriana de extractos metanólicos de la especie *Tanacetum* spp. frente a cepas ATCC tales como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Los extractos metanólicos se obtuvieron de las partes de la planta colectada es decir flores, hojas y tallos estas fueron sometidas a un proceso de secado, pulverización y maceración en metanol durante 72 horas y luego el metanol fue separado por rotaevaporación. Las pruebas de actividad antibacteriana se realizaron bajo la directriz de la técnica de antibiograma basado en Kirby Bauer. Se cargaron discos de sensibilidad con concentraciones de 100000, 50000, 25000, 12500, 6250 µg/mL de cada uno de las diferentes partes de la planta. Los extractos presentaron diferente actividad antibacteriana frente a las cepas en estudio, siendo así la concentración mínima inhibitoria (CMI) de las flores para *E. coli* y *S. aureus* de 25000 µg/mL, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* 100000 µg/mL. La CMI del extracto de las hojas para *E. coli* y *S. aureus* resultó en 50000 µg/mL; *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* no mostró inhibición. El extracto obtenido de los

tallos no mostró actividad antibacteriana frente a las bacterias en estudio a las concentraciones ensayadas. Se confirmó por medio de siembra en placas muestras de cada uno de las diferentes concentraciones para verificar la presencia o no de colonias bacterianas. (36)

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

Laura Tomás Menor (2015), realizó una investigación donde el objetivo era estudiar la actividad antimicrobiana, tanto a nivel bacteriostático como bactericida, frente a bacterias modelo Gram-positivas y Gram-negativas y relacionarla con su capacidad antioxidante y su contenido polifenólico a cuatro de las especies más abundantes de la familia Cistus localizadas en el territorio español (*Cistus salviifolius*, *C. clusii*, *C. albidus* y *C. ladanifer*), las cuales

fueron recolectadas y utilizadas para la obtención de un total de catorce extractos a través de diversos métodos de extracción sólido-líquido, fraccionamiento mediante cromatografía líquida y métodos de secado. Tras un análisis de la actividad antimicrobiana frente a microorganismos modelo, *E. coli* y *S. aureus*, y del contenido polifenólico de los mismos se seleccionaron aquellos extractos que presentaron la máxima capacidad antimicrobiana, así como un alto contenido polifenólico y un buen rendimiento de extracción;. Como resultado se obtuvo que la familia *Cistus* tiene poder antibacteriano pero esta selección ha permitido identificar la potencialidad como antimicrobiano del extracto acuoso de *C. salviifolius*, el cual fue caracterizado por HPLC acoplado a espectrometría de masas identificando un total de 48 compuestos polifenólicos entre los que destacaron los elagitaninos y los flavonoles. Por último, mediante la utilización de membranas modelo de *E. coli* y de *S. aureus*, se ha encontrado que el ácido elágico y las punicalaginas tienen un efecto directo desestabilizador de las membranas bacterianas mientras el mecanismo de acción de los flavonoles parece estar menos relacionado con este aspecto. (40)

De las Llagas, S. (2014) en su artículo: “Actividad antibacteriana del extracto etanólico crudo y fracciones solventes de hojas de *Ficus pseudopalma*”, pusieron a prueba el efecto antimicrobiano de las fracciones cloroformo, acuosa y de acetato de etilo las cuales se evaluaron a través del método de Kirby-Bauer (difusión en disco) y la concentración mínima inhibitoria. Se utilizaron bacterias Gram positivas como Gram negativas. Los resultados fueron que los fragmentos cloroformo y acetato de etilo mostraron efecto antimicrobiano contra *Bacillus subtilis* UST CMS 1011 con halos de inhibición de 14 a 19 milímetros, también mostraron parcial efecto antimicrobiano (10 a 13 milímetros) hacia *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. El extracto acuoso no presentó halos de inhibición mientras que los 3 extractos no presentaron inhibición en el desarrollo de las bacterias Gram negativas. De este estudio se puede concluir que el extracto de *F. pseudopalma* puede tener efecto antimicrobiano frente a bacterias Gram positivas. (9)

Barrio Dueñas et. (2013). Se realizó un examen del potencial antifúngico de un extracto fenólico de *Cistus ladanifer* del noreste de Portugal, contra especies de *Candida*. Además, el extracto se caracterizó por HPLC-DAD-ESI / MS. Se encontraron en la muestra ácidos y derivados fenólicos (extracto de 3.96 mg / g), derivados de ácido elágico (extracto de 30.34 mg / g) y flavonoides (extracto de 4.15 mg / g), tales como catequinas, flavonoles y flavonas. El grupo más abundante fueron los derivados de ácido elágico en los que el galato de punicalagina, un derivado de punicalagina unido al ácido gálico, se encontró en la mayor cantidad ($15,99 \pm 0,02$ mg / g de extracto). Estos compuestos (es decir, elagitaninos) podrían estar relacionados con la fuerte inhibición del crecimiento de *Candida albicans*, *C. glabrata* y *C. parapsilosis* (MIC <0.05 mg / mL). Además, la mejor actividad antifúngica fue contra *C. glabrata*, donde el extracto estudiado pudo causar al menos 3 log de reducción a concentraciones inferiores a 0,05 mg / ml y una inhibición total del crecimiento a concentraciones superiores a 0,625 mg / ml. (42)

Fernández-Arroyo (2010). En este estudio, se determinó el contenido fenólico y de tanino de los extractos acuosos de hojas de *C. ladanifer* y *C. populifolius* y su actividad antioxidante y antimicrobiana se estudió completamente mediante varios ensayos in vitro. Sus compuestos principales se identificaron y cuantificaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento con detección de matriz de diodos acoplada a espectrometría de masas con trampa de iones por electroaspersión. También se determinó la citotoxicidad en un panel de células cancerosas humanas. El extracto de *C. populifolius* fue un antioxidante más fuerte que el extracto de *C. ladanifer* en los ensayos basados en la reacción de transferencia de electrones, pero el extracto de *C. ladanifer* fue más efectivo para inhibir los radicales peróxido. Los compuestos principales en ambos extractos fueron elagitaninos, especialmente derivados de punicalaginas, que muestran un mayor contenido de *C. populifolius*. *C. ladanifer* mostró una notable actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, mientras que *C. populifolius* fue eficaz contra *Escherichia coli*, con valores de MIC de 154 y 123 microg / ml, respectivamente. Por último, ambos extractos mostraron una notoria

capacidad para inhibir la proliferación de células de cáncer de páncreas M220 y células de cáncer de mama MCF7 / HER2 y JIMT-1. Las hojas de estas plantas suponen una fuente de extractos polifenólicos enriquecidos en elagitaninos solubles en agua con actividades antioxidantes y antimicrobianas. Su actividad citotóxica contra varias células cancerosas puede merecer más atención. (41)

Peláez P. y Herencia D. (2006), desarrollaron el estudio: "Determinación y Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de una crema de *Plantago major* L. (llantén) en *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Bacillus subtilis*", mediante el método de difusión con discos en Agar Nutritivo que la crema de llantén tiene efecto inhibitorio sobre los microorganismos en estudio a diferencia de los fármacos utilizados como la Sulfadiazina de Plata 1%, Gentamicina O, 1% y Tetraciclina 1%, en donde su efecto fue ligeramente menor. "Lo que permite confirmar que la crema de llantén, tiene actividad antibacteriana in vitro en porcentajes que oscilan entre 91.7% y 99.4%, valores muy próximos a lo evidenciado por los antibióticos en cuestión (100%). Quedando así demostrado los principios activos presentes en el extracto de las hojas" (11).

2.2. BASES TEORICAS

2.2.1. Antibacteriano

Son sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos, y originan su destrucción. En los últimos tiempos, el uso del término se ha ampliado para incluir compuestos sintéticos, como las sulfonamidas y las quinolonas, que presentan también actividad antibacteriana. (37)

Aunque los antibióticos están constituidos por clases muy diversas de compuestos, a menudo se clasifican en diferentes grupos. Las múltiples clasificaciones existentes presentan diferentes características y han sido realizadas basándose en disímiles criterios, por tal motivo es difícil determinar cuál es la ideal. De ellas las más utilizadas son las que se mencionan a continuación. (38)

Clasificación según la tinción de Gram de las bacterias

Según la actividad sobre las bacterias Gram positivas y Gram negativas, éstos pueden clasificarse en.

Tabla Nº 1 Clasificación de las bacterias según la tinción Gram

Antibióticos contra Gram +:	penicilinas, glicopéptidos, lincosamida, rifamicinas
Antibióticos contra Gram-:	aminoglucósidos, monobactámicos, aminociclitoles, polipéptidos
Antibióticos de amplio espectro:	cefalosporinas, carbapenémicos, amfenicoles, macrólidos, quinolonas, tetraciclinas. (37)

Clasificación según el efecto de su acción

Según el efecto de su acción sobre las bacterias, se clasifican en bacteriostáticos y bactericidas, y depende de si la acción consiste en inhibir el crecimiento o lisar la bacteria, respectivamente. Esta clasificación es bastante inexacta, pues estos términos varían en dependencia del tipo de germen y de la concentración del antibiótico, como es por ejemplo, el caso del cloramfenicol que se comporta como bacteriostático frente a la *E. coli* y otros microorganismos y como bactericida frente a algunas cepas de *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* y *H. influenzae*. Similar es el caso de la penicilina, la cual es bactericida frente a los cocos grampositivos, con excepción de los

enterococcus frente a los cuales se comporta como bacteriostático debido a que, a pesar de inhibir la formación de la pared bacteriana, no activa las enzimas autolíticas intrabacterianas; así como frente al *S. pneumoniae*, por un fenómeno de tolerancia, cuando la sepsis es respiratoria, se comporta como bactericida y, sin embargo, cuando es en el sistema nervioso central actúa como bacteriostático, debido a que no se puede lograr a ese nivel una concentración bactericida superior a la concentración inhibitoria mínima.(38)

Distribución de algunos antibióticos según su acción sobre las bacterias

Tabla Nº 2 Clasificación de los antibióticos según su acción

Bactericidas	Bacteriostáticos
Betalactámicos	Amfenicoles
Aminoglucósidos	Lincosamidas
Glicopéptidos	Macrólidos
Quinolonas	Sulfamidas
Rifampicinas	Tetraciclinas

Clasificación según su mecanismo de acción

En dependencia de la vía que utilizan para actuar sobre los microorganismos, los antibióticos se clasifican en: (39)

1. Agentes que inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana, y afectan la formación del polímero peptidoglicano
2. Agentes que afectan la síntesis de proteínas a nivel ribosomas entre los cuales se encuentran los que actúan sobre la subunidad 30s y 50s
3. Agentes que afectan el metabolismo de los ácidos nucleicos
4. Agentes anti metabolitos que antagonizan los pasos metabólicos en la síntesis de ácido fólico
5. Agentes que actúan en forma directa sobre la membrana celular del microorganismo

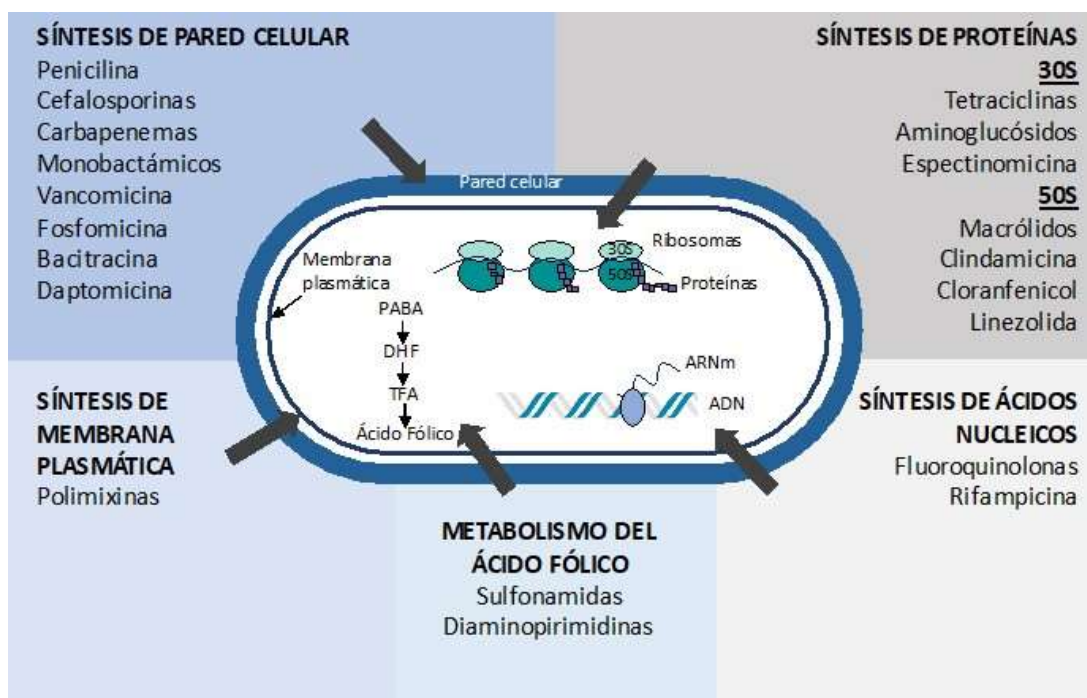


Figura 1 Clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción

Fuente: puentesdigitales.com/2018/11/18/

2.2.2 Extractos

Estos preparados pueden tener una consistencia, sólida, semisólida o líquida, son elaborados a partir de las drogas vegetales para obtener un producto altamente concentrado utilizando un solvente adecuado, el cual será evaporado total o parcialmente para dar lugar al extracto, que puede ser: fluido, seco, blando o crioextracto. (22) El objetivo principal de la preparación de un extracto, es la obtención de un concentrado que nos servirá para su estudio o en la aplicación terapéutica de diversos problemas de salud. (23)

Tipos de Extractos

Extractos fluidos

Se obtienen por percolación, su preparación está diseñada de modo que una parte de droga equivale a una o dos partes del extracto fluido. (22)

Extractos secos

Estos se obtienen al evaporar el solvente y posteriormente desecar el residuo, de tal manera que la concentración de principio activo obtenida es mucho

mayor al de la droga en su estado original. La cantidad de humedad permitida en este tipo de extractos no debe ser mayor al 5% y suelen ser bastante estables y fáciles de manipular. (22)

Extractos blandos

La concentración de los principios activos supera a la concentración que se encuentra en la droga original. Se suele utilizar como solvente el agua o alguna otra mezcla hidroalcohólica. No son comúnmente utilizados puesto que son muy inestables y difíciles de manipular. (22)



Figura 2 Elaboración de extractos vegetales

Fuente: farmacocompany.es 2018

Obtención de extractos a partir de plantas medicinales

Para lograr un proceso correcto de extracción de principios activos de una determinada planta, es necesario tomar en cuenta la importancia del secado de la planta, puesto que de este paso dependerá la disminución o permanencia de la calidad de principios activos extraídos y que serán posteriormente analizados. Se suele permitir no más de 10% de humedad. Los métodos comúnmente utilizados en este proceso son: secado en estufa, secado al sol y secado a sombra. (24)

También se realiza el proceso de disminución del tamaño de la muestra, lo cual implica la utilización de diferentes tipos de molino, como: los molinos de

rodillo, molinos de cuchilla y de martillo. Tras lo cual se procede a almacenar la muestra para emplear luego un método de extracción. (24)

Métodos de Extracción

Maceración simple y fraccionada

Para realizar este procedimiento la droga se debe colocar en un recipiente cerrado herméticamente, de modo que al realizarse agitaciones frecuentes mientras se mantiene en el recipiente. Este proceso debe durar no más de 48 horas si lo que se ha colocado en el recipiente es agua; este procedimiento resulta de mucha utilidad cuando los principios son fácilmente solubles en frío y/o cuando la temperatura los afecta. En la maceración simple se usa una única alícuota del menstuo; mientras que en la maceración fraccionada se divide el menstuo en un mayor número de alícuotas, de las cuales se le dará el tratamiento de la maceración simple con una disminución en el tiempo. (25)

Digestión

Es bastante similar a la maceración, pero suele tomar mucho menos tiempo, esto sucede gracias a la ayuda del calor utilizado para lograr este proceso. Se emplea este método cuando los principios activos son poco solubles en frío y cuando el solvente en ebullición corre el riesgo de causar alteraciones en el producto. Los extractos obtenidos suelen ser medianamente estables y fáciles de manipular. (25)

Decocción

En este método el solvente actúa a ebullición durante unos 20 minutos aproximadamente para extraer los principios solubles de la droga. Es necesario evitar, mientras se realiza este procedimiento, que el solvente se evapore por completo y eso afecte a la naturaleza de la droga; por lo cual, se necesita añadir más cantidad de agua conforme se realice este método. (25)

Lixiviación

Para realizar este procedimiento se utiliza la planta cruda, sin desecar, esta materia prima se coloca en una cantidad suficiente de solvente que cubra la materia prima. Una vez que ambos se encuentren dentro del tanque

percolador, se realizará la renovación del solvente asegurando que este disolvente puro se encargará de enviar hacia afuera a aquel que ya ha sido utilizado sin utilizar la presión; sino más bien gracias a la gradiente de concentración. Finalmente, el fluido obtenido se combina con el percolado para obtener una mayor concentración del extracto. (26)



Figura 3 Método de concentración de extractos (Rotavapor)

Fuente: Scielo.sid.cu 2018

2.2.3 *Cistus ladanifer* (Jara)

Clasificación taxonómica

- División: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida
- Subclase: Dilleniidae
- Orden: Malvales
- Familia: Cistaceae
- Género: *Cistus*
- Especie: *Cistus ladanifer* L.
- Nombre común: Jara

La jara pringosa es un arbusto ramoso, erecto, a veces procumbente, con leño duro y corteza pegajosa, pardo-rojiza, que no se desprende en tiras; ramillas y hojas, en general, impregnadas de una sustancia muy pegajosa y olorosa (ládano), con escasos pelos simples, caedizos, y pequeñas glándulas. Las hojas son sésiles, envainadoras y soldadas entre sí por la base, entre linear lanceoladas y lanceoladas, coriáceas, de margen algo revoluto, con el haz de color verde oscuro, glabra, y de nervios apenas visibles, y el envés totalmente cubierto de pelos estrellados. Las flores son solitarias, terminales, muy grandes y vistosas; pedúnculos cortos con pelos peltados amarillentos, caedizos; brácteas ciliadas, caedizas. Cáliz formado por 3 sépalos, ovalados, con pelos peltados verde-amarillentos y en los márgenes pelos simples, aislados o fasciculados, largos e hialinos, caedizos. Los pétalos son blancos, con una pequeña mancha amarilla en la base, y a veces otra purpúrea superpuesta. Estambres desiguales, más largos que el pistilo. Ovario tomentoso; estigma grande, sésil. El fruto en cápsula de 9-10 lóculos con mayor frecuencia, dehiscente en el mismo número de valvas que lóculos, globosa, con indumento denso de pelos peltados. Semillas c. 1 mm, globoso-poliédricas. Florece de marzo a junio.(16)

Composición química

Según los estudios realizados por García Marín y García Vallejo al evaluar la composición química de la gomorresina de esta planta, se pudo identificar la presencia de terpenos, posteriormente Pascual y col., aislaron e identificaron flavonoides. Proksch y Gulz al realizar una nueva evaluación de los componentes de esta planta encontraron también flavonoides. Posteriormente Chávez y col; realizaron una evaluación de espectrofotometría y masas y resonancia magnética nuclear elucidando ocho flavonoides entre los que destacan las flavonas y flavonoles así como diterpenos. Estos investigadores llegaron a la conclusión que la presencia de metabolitos a diferentes concentraciones, se debe a la presencia de las estaciones y los rayos ultravioletas, los cuales afectan de manera significativa en los compuestos formados por la planta.

Habitad y distribución

Esta especie suele crecer de manera natural en jarales, específicamente en las zonas donde predomine principalmente unas condiciones de clima seco y al mismo tiempo caluroso. Por lo general suele estar ubicado a unos 1500 metros de altura al nivel del mar. Suele estar distribuida en las zonas de la Península Ibérica y parte de lo que corresponde a Francia meridional. (17)



Figura 4 Herborizado de *Cistus ladanifer* (Jara)

Fuente: floraprotegida.es 2017

Beneficios

En cuanto a las propiedades y beneficios que puede aportar esta especie se encuentra que el ládano, es decir la especie de aceite que se puede encontrar recubriendo la superficie de la hoja trae beneficios si es usado como otro de los ingredientes en jarabes o remedios caseros para aliviar los síntomas de la tos.

Por otro lado, además de lo anterior es importante tener en cuenta que el mismo aceite también suele ser empleado como antiséptico e incluso es considerado en la preparación de algunas pomadas para el tratamiento de dolores reumáticos. Entre sus propiedades se conoce además que esta planta tiene efectos antibióticos, por lo cual suele ser considerada en la medicina natural, ya que suele cortar muy bien el sangrado (18)

Propiedades

- Las dos propiedades fundamentales de esta flor son fortalecer el sistema inmune y ayudar al organismo a generar defensas.
- Antioxidante, neutraliza radicales libres. (19)
- Antiinflamatorio.
- Antiviral y antibacteriana. Estudios científicos demuestran hasta efectos contra el Virus “H5N1” causante de la gripe aviar. (20)
- Anticancerígeno, estudios de la Universidad de Osnabrück (Alemania) demuestran que la infusión de *Cistus Incanus* inhibe el crecimiento rápido de las células del cáncer de pecho.
- Quelante especialmente del Cadmio y Plomo.
- Acción digestiva en caso de gastritis y úlceras (21)

2.2.4 *Staphylococcus aureus*

Pertenece al grupo Gram positivo conformado por cocos cuyo diámetro varía entre 0.5 a 1.5 μm , los cuales se pueden observar como células únicas o por lo general se agrupan en pares, tétradas, cadenas cortas o incluso llegando a formar racimos de uvas. Este tipo de bacterias no presentan cápsula (aunque algunas desarrollan cápsula de limo), no son esporuladas, no tienen movilidad y son anaerobias facultativas (12)

La mayoría de bacterias de este grupo elaboran catalasa (enzima capaz de separar el peróxido de hidrógeno y convertirlo en oxígeno y agua); esta característica permite reconocer al género *Staphylococcus* sobre los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*, los cuales no pueden producir este desdoblamiento (catalasa negativos) (12)

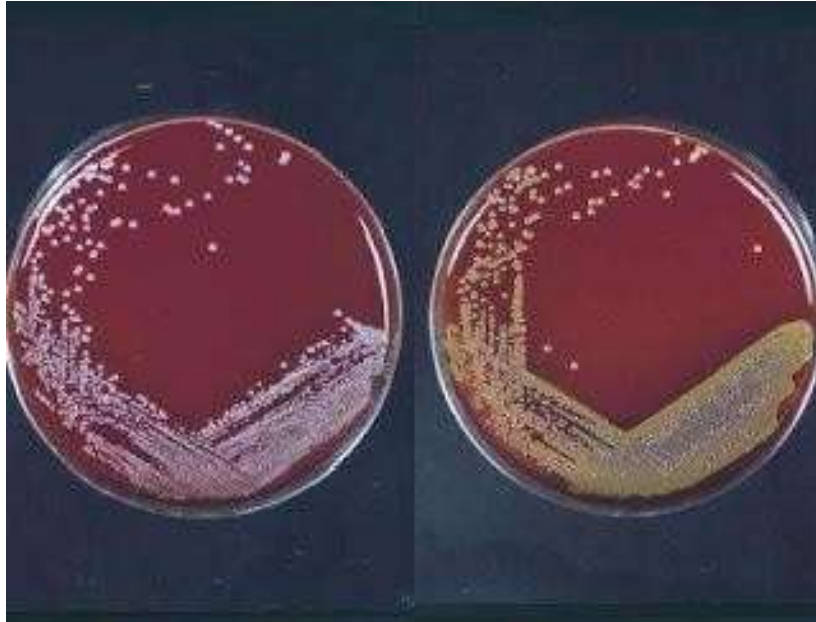


Figura 5 Placas Petri con *Staphylococcus aureus*

Fuente: medicinaysaludpublica.com 2017

Sus colonias llegan a medir de 1 a 3 milímetros y suelen producir un pigmento amarillento ya que poseen carotenoides; muchas de estas cepas se hemolizan entre las 24-36 horas. Su crecimiento adecuado ocurre a una temperatura de 37°C con un pH ligeramente alcalino de 7.6, el crecimiento es más favorable en presencia de glucosa.(13)

Se le considera un perfecto patógeno, esto es debido a que posee una gran variedad de factores de virulencia; está provisto para colonizar, irrumpir y diseminarse; estos elementos son causa, en parte, de la amplia gama de manifestaciones clínicas que llega a causar. Este género es capaz de adquirir, por transferencia horizontal, elementos exógenos; esto conlleva a que pueda adaptarse con facilidad al medio que lo rodea y se vuelva resistente frente a los antimicrobianos mediante la obtención de constituyentes de defensa codificados por secuencias de inserción, plásmidos y transposones. (14). A lo largo del tiempo, las infecciones provocadas por este género han tenido una gran marca en la morbimortalidad tanto hospitalaria como poblacional. (15)

Esta bacteria causa una amplia variedad de enfermedades infecciosas tales como infecciones cutáneas, septicemia, neumonía e intoxicación alimentaria, entre otras. (16)



Figura 6 Infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*

Fuente: medicinaysaludpublica.com 2017

2.3 FORMULACIÓN DE HIPOTESIS

2.3.1 Hipótesis general

El extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) posee efectos antibacterianos en cepas *Staphylococcus aureus* en estudios in vitro.

2.3.2 Hipótesis específica

1. El extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) contiene tipos de metabolitos secundarios con efecto antibacteriano.
2. El extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) tiene efectos antibacterianos frente al *Staphylococcus aureus* en estudio in vitro a diferentes concentraciones.
3. El extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) tiene mejor efecto antibacteriano que la Amoxicilina frente al *Staphylococcus aureus* en estudio in vitro.

2.4 VARIABLES

Variable independiente:

Extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)

Variable dependiente:

Efecto Antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*

2.4.1 Tabla de operacionalización de variables

Variable independiente	Indicadores
Extracto etanólico de las hojas de <i>Cistus ladanifer</i> (Jara)	Prueba de solubilidad Marcha fitoquímica
Variable dependiente	Indicadores
Efecto Antibacteriano frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	- Diámetro del halo - Crecimiento Concentración al 25 por ciento Concentración al 50 por ciento Concentración al 75 por ciento

2.4.2 Marco conceptual

- 1. Actividad antibacteriana:** Habilidad específica o capacidad de un producto de lograr su efecto deseado sobre determinados microorganismos. (27)
- 2. Antibiograma:** Son reportes de test de susceptibilidad a los agentes antimicrobianos (28)

3. **Antimicrobiano:** Es una molécula natural (producida por un organismo vivo, hongo o bacteria), sintética o semisintética, capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias, virus u hongos (28)
4. **Cepas ATCC:** Es un material biológico de referencia certificado por American Type Culture Collection. Rockville, EU (29).
5. **Cultivo microbiológico:** Consiste en proporcionarles las condiciones físicas, químicas y nutritivas adecuadas para que puedan multiplicarse de forma controlada los microorganismos (30)
6. **Extracto etanólico:** Extracto con olor característico, obtenido por maceración en contacto con etanol (32)
7. **Flora bacteriana:** Agrupación de microorganismos que se encuentran localizados en contacto con el exterior (31).
8. **Halo de inhibición:** Zona alrededor de un disco que contiene el extracto antibiótico colocado en un antibiograma en el cual no se produce el crecimiento antibacteriano (28).
9. **Infeción:** Es un proceso de multiplicación de microorganismos patógenos mediante colonización previa en el huésped susceptible (29)
10. **Medios de cultivo:** Son nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares” (28)

11. Multiplicación patógena: Capacidad de un determinado microorganismo para reproducirse su número de colonias (29)

CAPÍTULO III METODOLOGÍA

3.1 Tipo de estudio

Observacional: Ya que se utilizó la observación y se registró los acontecimientos sin intervenir en el curso natural de estos.

- **Transversal:** En función al tiempo, se realizó con los datos obtenidos en un momento puntual, se ejecutó en un solo momento.
- **Cuantitativo:** Se realizó las diferentes mediciones del diámetro de los halos formado en un periodo de tiempo establecido.

3.2 Diseño de Estudio

Esta investigación por su diseño es experimental porque es posible la manipulación ex profesa de la variable independiente

3.3 Población

Variable independiente:

Para la realización de esta investigación fue necesario recolectar 5 kilos de hojas de la planta *Cistus ladanifer* (Jara) empleando el método aleatorio, extraídos de una población 20 plantas por metro cuadrado proveniente del distrito de Oxapampa departamento de Pasco, cuyas coordenadas geográficas fueron: 12° 34' 3" S, 75° 24' 14" W a unos 1850 msnm. La certificación de la planta se encuentra en el anexo N°11

Variable dependiente:

La población de estudio estuvo constituida por todas las placas Petri que puedan ser cultivadas por sembrado derivado de cepas ATCC.

3.4 Muestra

- **Variable independiente**

300 g de hojas secas de la planta de *Cistus ladanifer* (Jara) proveniente del distrito de Oxapampa departamento de Pasco, seleccionadas por sus características organolépticas, completas y libre de plagas.

- **Variable dependiente**

20 placas Petri con el agar Müller Hilton y las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC.



Figura 7 Mapa del Distrito de Oxapampa departamento de Pasco

Fuente: Peruturismo.com 2016

3.4.1 Técnica e instrumentos de recopilación de muestras

Técnica de recolección de datos

La recolección de los datos en el presente estudio se llevó a cabo por medio de la técnica de observación estructurada, individual de laboratorio; por la cual los investigadores realizaron la evaluación de observación de las muestras de estudio; dichos datos obtenidos fueron registrados en el instrumento de investigación.

Equipos y materiales

Materiales:

- Agua destilada (P.A)
- Probetas de 50 mL marca Boeco
- Matr az de Erlenmeyer de 250 mL marca Pirex
- Placas Petri marca Simax
- Pipetas de 10 mL marca Boeco
- Mecheros de vidrio de 100 mL marca Simax
- Tubos de ensayo de 13 x 100 marca Pirex
- Guantes y mascarillas 7   2 marca Simax
- Hisopo de madera estéril marca Simax
- Vaso beacker de 250 mL marca Pirex
- Gradillas de metal para 48 tubos marca Simax
- Pinzas de madera marca Simax
- Frascos reactivos de 20 mL marca Pirex
- Pipetas Pasteur de 5 mL marca Simax
- Papel whatman N  1, 2, 3 marca Merck
- Mortero de porcelana de 70 mL marca Simax

Equipos:

- Estufa Memmert modelo Single DISPLAY
- Incubadora Velp Scientifica modelo LCU 60
- Balanza Sartorius modelo MSU524P-100-DI
- Baño María Velp Scientifica modelo FE 6020
- Computadora Hp modelo Pavillon 14
- Refrigeradora Samsung RF 22

Obtención del extracto etanólico de las hojas de *Cistus landanifer* (Jara)

La planta en estudio, se recolectó en la provincia de Oxapampa departamento de Pasco a unos 1850 m.s.n.m. sobre el nivel del mar. Con ayuda de los pobladores se ubicó la zona donde en estado silvestre crece y se desarrolla esta planta. Una vez ubicada la planta, se procedió a recolectar las hojas y con ayuda de unas tijeras se extrajo el material vegetal, teniendo cuidado de no dañar ninguna estructura de la planta. Una vez obtenida las hojas, se almacenó en cajas de cartón con mucho papel para evitar la putrefacción de las mismas, luego fue trasladado a los laboratorios de farmacia y bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega (7 horas); donde se seleccionó y se limpió la planta con abundante agua para luego secarla con papel toalla. Posteriormente, se colocó las hojas limpias y seleccionadas en la estufa de aire circulante a 40°C, por espacio de cuatro días hasta peso continuo una vez seca, se pesó 300 g de las hojas y se pulverizó con ayuda de un mortero. Una vez seca se colocó las hojas en un frasco ámbar de vidrio de boca ancha y se agregó 990 litro de alcohol etílico de 70°, dejándolo macerar por siete días, agitándolo enérgicamente dos veces al día, mañana y noche. Pasado el tiempo, se procedió a filtrar con ayuda de un papel filtro paso rápido por 2 veces para obtener así los metabolitos extraídos con el solvente. El filtrado se colocó en bandejas de vidrio de capacidad de un litro y se colocó en la estufa para evaporar el solvente a una temperatura de 40°C y obtener una pasta semisólida.

El rendimiento del extracto obtenido fue de 15 g. El extracto seco se acondicionó en un frasco de vidrio de boca ancha, se rotuló y se guardó en la refrigeradora hasta su posterior uso.

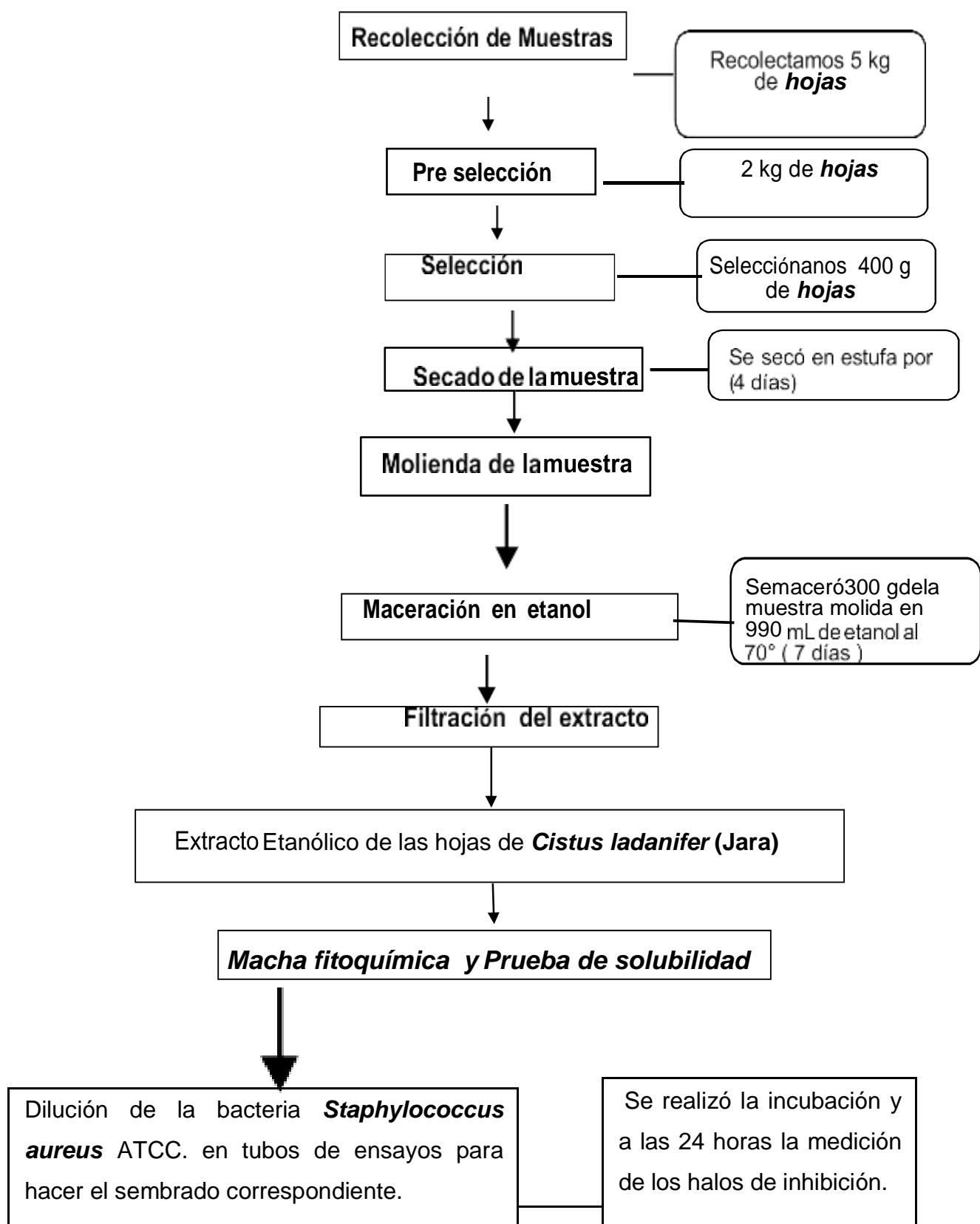


Figura 8 Obtención del extracto Etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)

Fuente: Elaboración por los investigadores 2019.

Prueba de solubilidad del extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)

- En un tubo de ensayo se colocó 1mL del extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** muestra patrón.
- En un tubo de ensayo se colocó 1mL del extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** luego se agregó 1 mL de acetato de etilo.
- En un tubo de ensayo se colocó 1mL del extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** luego se agregó 1mL de ciclohexano.
- En un tubo de ensayo se colocó 1mL del extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** luego se agregó 1mL de metanol.
- En un tubo de ensayo se colocó 1mL del extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** luego se agregó 1mL de butanol.
- En un tubo de ensayo se colocó 1mL del extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** luego se agregó 1mL de éter de petróleo.
- En un tubo de ensayo se colocó 1mL del extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** luego se agregó 1mL de agua destilada.
- En un tubo de ensayo se colocó 1mL del extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** luego se agregó 1mL de etanol.



Figura 9 Batería usada en prueba de solubilidad

Fuente: revista .unjbg.edu.pe

Tabla N°3: **Prueba de solubilidad del extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)**

MUESTRA	SOLVENTE	RESULTADO
EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Cistus ladanifer</i> (JARA) EN CEPAS <i>Staphylococcus aureus</i> (1 ml)	Éter de petróleo 1 ml	
	Cloroformo 1 ml	
	Acetona 1 ml	
	Acetato de etilo 1ml	
	n-butanol 1 ml	
	Etanol 1ml	
	Metanol 1 ml	
	Agua 1ml	

Con el extracto obtenido, se procedió a realizar las siguientes pruebas para la determinación de metabolitos:

Identificación de carbohidratos:

a.- **Reactivo molish:** En un tubo de ensayo se colocó 2mL del extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** luego se agregó 5 gotas del reactivo Molish y finalmente se agregó 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado y se dejó en reposo, un resultado positivo formaría un anillo violáceo.

b.- **Reactivo Fehling A + Fehling B:** En un tubo de ensayo se colocó 2mL del extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** luego se agregó 5 gotas del reactivo Fehling A, más 5 gotas del reactivo Fehling B se agito y finalmente se llevó a baño maría por 10 minutos, un resultado positivo daría un precipitado color anaranjado rojizo.

Identificación compuestos fenólicos:

En un tubo de ensayo se colocó 2mL del extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** luego se agregó 5 gotas del reactivo de tricloruro férrico al 5% (FeCl_3 5%), un resultado positivo daría cambio de coloración pardo a azul.

Identificación de cumarinas:

En un tubo de ensayo se colocó 2mL del extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** luego se agregó 2 gotas del reactivo de hidróxido de sodio al 10% (NaOH 10%), un resultado positivo daría un color amarillo intenso.

Identificación de taninos:

En un tubo de ensayo se colocó 2mL del extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** luego se agregó 5 gotas del reactivo de gelatina más 3 gotas de cloruro de sodio al 10 % (NaCl 10 %), un resultado positivo formaría un coloide.

Identificación de saponinas:

En un tubo de ensayo se colocó 2mL del extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** luego se agregó 1 mL de H₂O destilada y se agito por dos minutos, un resultado positivo formaría espuma.

Identificación de flavonoides:

En un tubo de ensayo se colocó 2mL del extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** luego se agregó trozo de limaduras de Mg ⁺² se agito y finalmente se agregó 5 gotas de HCl concentrado en zona, un resultado positivo daría un tono rojo.

Identificación de Alcaloides:

- a.- En un tubo de ensayo se colocó 2mL del extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** luego se agregó 3 gotas del reactivo de Dragendorff en zona, un resultado positivo daría un precipitado anaranjado.
- b.- En un tubo de ensayo se colocó 2mL del extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** luego se agregó 3 gotas del reactivo de Mayer en zona, un resultado positivo daría un precipitado amarillo.
- c.- En un tubo de ensayo se colocó 2mL del extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** luego se agregó 3 gotas del reactivo de Popof en zona, un resultado positivo daría un precipitado blanco lechoso.

d.- En un tubo de ensayo se colocó 2mL del extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** luego se agregó 3 gotas del reactivo de wagner en zona, un resultado positivo daría un precipitado marrón.



Figura 10 Batería usada en la marcha fitoquímica

Fuente: repositorio.uma.edu.pe

Tabla N°4: marcha fotoquímica: para la determinación de metabolitos secundarios del **etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)**.

REACTIVOS	METABOLITOS	REACCION POSITIVA	RESULTADO
Molish	Carbohidratos en General	Anillo violáceo	
Fehling A +Fehling B	Azucares Reductores	Precipitado Rojo Ladrillo	
Ninhidrina	Aminoácidos	Anillo violáceo	
Shinoda	Flavonoides	Coloración rojo ,azul, verde	
Na OH 10%	Cumarinas	Coloración amarillo intenso	
Gelatina	Taninos	Precipitado blanco	
FecI3 5%	Compuestos Fenólicos	Coloración (Amarillo, Violeta, azul)	
Dragendorff	Alcaloides	Precipitado rojo ladrillo	
Mayer	Alcaloides	Precipitado Blanco lechoso	
Rtvo de Popoff	Alcaloides	Precipitado amarillo intenso	
Rtvo de Wagner	Alcaloides	Precipitado Marrón	

Identificación y recolección del material botánico

El material biológico fue llevado al Museo de historia natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos para su identificación y autenticación. Se adjunta el certificado de identificación (Anexo 11)



Figura 11 Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Fuente: museohm. Unmsm.edu.pe

Obtención de la muestra bacteriana

La muestra de bacterias de *Staphylococcus aureus* del tipo ATCC fue donada por la Universidad Nacional Federico Villareal solo para el respectivo estudio.



Figura 12 Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Federico Villareal Lima – Perú

Fuente: unfv.edu.pe 2017

Preparación de las concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)

A través de un proceso de disolución, se prepararon diluciones al 25%, 50% y 75% con agua destilada en viales de 5 mL para su posterior uso.

Vial al 75%. - se colocó 3 mL del extracto y se agregó 1 mL de agua destilada, se homogenizó y se rotuló el vial.

Vial al 50%. - se colocó 2 mL del extracto y se agregó 2 mL de agua destilada, se homogenizó y se rotuló el vial.

Vial al 25%. - se colocó 1 mL del extracto y se agregó 3 mL de agua destilada, se homogenizó y se rotuló el vial.



Figura 13 Preparación de concentraciones con el extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)

Fuente: elaboración por los investigadores 2019

Desarrollo del método

Método de disco – difusión (Kirby – Bauer)

Para la determinación de la actividad antibacteriana, el método elegido fue el descrito por Kirby- Bauer, el cual nos permitirá obtener datos altamente reproducibles, además de ser recomendados por los científicos dedicados a antibiogramas y por ser un método bastante económico. Este método utiliza placas Petri de plástico esterilizado (aproximadamente de 20x100 mm) y con una capacidad de 30 mL de muestra de agar. Los discos de sensibilidad fueron elaborados por los investigadores siguiendo la técnica mencionada.

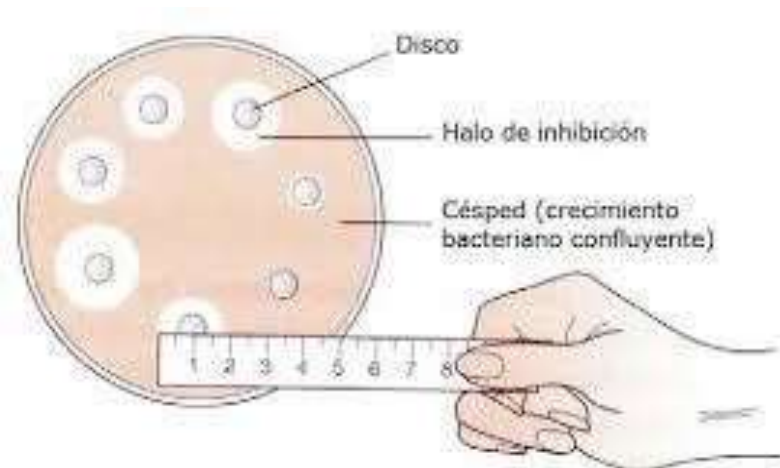


Figura 14 Método de difusión con discos de Kirby- Bauer

Fuente: microinmuno.qb.fcen.uba.ar

Preparación del Agar Mueller Hinton

Para preparar el agar usado en la fase experimental, fue necesario utilizar agua des ionizada, de acuerdo a las exigencias del fabricante. Se disolvió el agar Mueller - Hinton y se procedio a autoclavar la preparación a 121°C y 15 lb/pg² durante 15 minutos. Inmediatamente después de autoclavar se dejó enfriar en Baño María a 45 - 50°C. Una vez temperado se vertio el preparado fresco y tibio a placas Petri estériles, para dar un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm. Esto corresponde a 25 - 30 mL para placas de 100 mm de diámetro. El medio de agar se dejó enfriar a temperatura ambiente. El agar Mueller Hinton debe tener un pH entre 7,2 - 7,4.

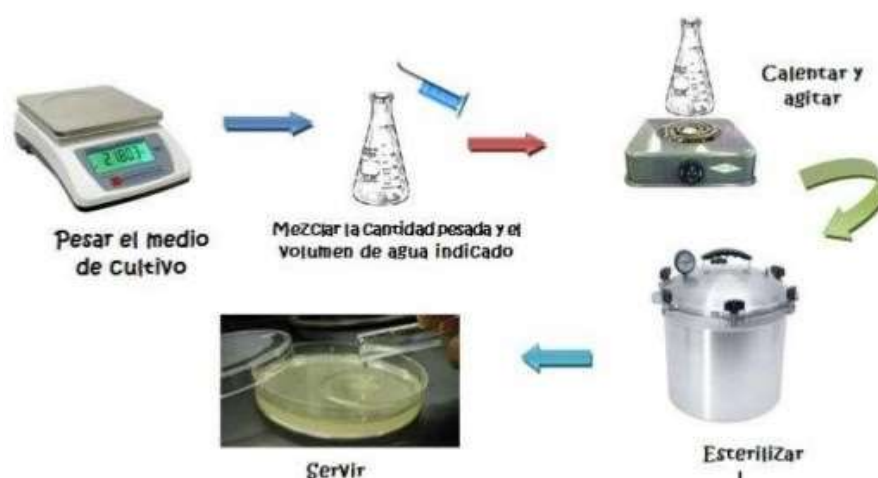


Figura 14 Preparación de un medio de cultivo

Fuente: elaboración por los investigadores 2019

Preparación del inóculo bacteriano

Las cepas proporcionadas por la Universidad Federico Villareal con *Staphylococcus aureus* fueron diluidas de acuerdo a las indicaciones del tecnólogo medico de esa casa de estudio, tomando 0.1 mL de la solución proporcionada y agregándola a un tubo con 9.9 mL de suero fisiológico, la solución resultante tendrá una concentración de 1×10^6 ufc/ml. Por lo tanto, al final tendremos un tubo de ensayo con una solución de 1×10^6 ufc/mL de *Staphylococcus aureus*.



Figura 16 Preparación de un inóculo bacteriano
Fuente: Universidad Nacional Federico Villareal 2019

Inoculación de las placas

Ya estando preparadas las 20 placas con el agar Mueller Hinton ya solidificado, se agregará 100 uL del inóculo bacteriano preparado (1×10^6 ufc/mL) y con la ayuda de una espátula de Drigalsky se esparcirá el inóculo por toda la placa de tal manera que se obtenga un crecimiento homogéneo, para lo cual se deslizará el asa en la placa en forma paralela y

bien compacta abarcando toda la superficie de la misma. Luego se repetirá el procedimiento rotando la placa 60° en dos oportunidades más.

Deben extremarse los cuidados en sembrar las placas de borde a borde, porque de lo contrario puede haber problemas en la realización de las lecturas.

Se dejará secar 3 a 5 minutos antes de colocar los discos.



Figura 17 Inoculación de placas con espátula de Drigalsky

Fuente Universidad Nacional Federico Villareal 2019

Preparación de los discos de antibióticos

El antibiótico seleccionado por ser activo frente a las cepas de estudio fue amoxicilina, se utilizará el producto comercial con el nombre Amoxil de 500 mg, para ello se realizó una dilución de la capsula en una fiola de 50mL posteriormente se añadió esta solución a los discos preparados con papel whatman, se dejó secar al aire libre y se inoculó en la placa.

Aplicación de los discos a las placas inoculadas

Las diferentes soluciones preparadas, fueron administradas a los discos de papel Whatman, se humedecieron por espacio de 2 minutos y se dejaron

secar al aire, posteriormente se guardaron en otro frasco para ser usado en la parte experimental.

La placa fue dividida en tres partes, se colocó en cada placa un control y dos discos de la misma concentración, agregando las otras concentraciones en las placas posteriores. Se tuvo cuidado de no colocar los discos a una distancia inferior de 15mm del borde de la placa ya que puede interferir con el crecimiento y la lectura.

Una vez de terminado la colocación de los discos, se procedió a incubarlos a 35-37°C durante 18-24 horas. La placa se colocó en forma invertida.

La inoculación de los tratamientos en las placas fue de la siguiente forma:

Grupo 1: Esta muestra estuvo constituida por 4 placas petri y se le colocó una concentración de alcohol 70° en 3 discos.

Grupo 2: Esta muestra estuvo constituido por 4 placas petri en a que se adicionó la solución de amoxicilina y 2 discos de extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** al 25%

Grupo 3: Esta muestra estuvo constituido por 4 placas petri en a que se adicionó la solución de amoxicilina y 2 discos de extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** al 50%

Grupo 4: Esta muestra estuvo constituido por 4 placas petri en a que se adicionó la solución de amoxicilina y 2 discos de extracto etanólico de **las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)** al 75%



Figura 18 Forma correcta de inocular discos en placas

Fuente: Scielos.org. 2018

Determinación del efecto antimicrobiano

Después de 18 a 24 horas de incubación, cada placa fue examinada. Las zonas de inhibición resultantes deben ser uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento bacteriano. Los diámetros de la zona de inhibición completa son medidos en milímetros pasando por el centro del disco. La medición se realizó con un vernier digital, se realizó tres mediciones por cada disco y el promedio se reportará como resultado. Los valores de las mediciones promedio de los tres discos se compararon con las medidas de los halos de inhibición producidos por los antibióticos.



Figura 19 Lecturas del efecto antibacteriano

Fuente: Scielos.org. 2018

3.5 Instrumento de recolección de datos

El instrumento de recolección de datos empleado en la presente investigación es una ficha de observación ad-hoc, diseñada para los fines específicos de la investigación, la cual está conformada por ítems abiertos y cerrados acorde a los indicadores de las variables operacionalizadas. La mencionada ficha fue aplicada únicamente por el investigador, todas las mediciones fueron llevadas a cabo bajo las mismas circunstancias (físicas, emocionales y procedimentales). Los instrumentos fueron evaluados por 3 expertos docentes de la universidad que dieron fe de que el instrumento cumple con todos los requisitos para la evaluación de la prueba.

Además, se apoyará en el paquete de datos SPSS versión 22 para Windows.

3.6 Análisis estadístico y Procesamiento de Datos

Procesamiento de datos

La recolección de los datos se llevó a cabo de manera secuencial según la disposición de los indicadores, ello se realizó a cabo evaluando cada unidad muestral de forma individual. Para lograr los objetivos planificados se llevó a cabo los siguientes pasos de manera secuencial.

Materiales para la recolección y procesamiento de datos

- Fichas de recolección de datos y lápices
- Programa estadístico SPSS
- Computadora

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1 Resultados de la Investigación

Tabla N° 5 RESULTADOS DE LA PRUEBA DE SOLUBILIDAD

MUESTRA	SOLVENTE	RESULTADO
EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Cistus ladanifer</i> (JARA) EN CEPAS <i>Staphylococcus aureus</i>	Éter de petróleo	-
	Cloroformo	-
	Acetona	-
	Acetato de etilo	-
	n-butanol	-
	Etanol	++
	Metanol	-
	Agua	++

Leyenda: insoluble (-) poco soluble (+) soluble (++) muy soluble (+++)

Los resultados de la fase experimental se la solubilidad del extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) reportaron la solubilidad en: Etanol y agua.

Tabla Nº 6 RESULTADOS DE LA MARCHA FITOQUÍMICA

REACTIVOS	METABOLITOS	COLOR, PRECIPITADO	RESULTADO
Molish	Carbohidratos en General	Violáceo	-
Fehling A +Fehling B	Azucares Reductores	Precipitado Rojo Ladrillo	-
Ninhidrina	Aminoácidos	Violáceo	-
Shinoda	Flavonoides	Rojo ,azul, verde	+++
Na OH 10%	Cumarinas	Amarillo	-
Gelatina	Taninos	Precipitado blanco	+
FecI3 5%	Compuestos Fenólicos	Amarillo, Violeta, azul	++
Dragendorff	Alcaloides	Precipitado rojo ladrillo	-
Mayer	Alcaloides	Precipitado Blanco lechoso	-
Rtvo de Popoff	Alcaloides	Precipitado amarillo intenso	-
Rtvo de Wagner	Alcaloides	Precipitado Marrón	-
Leyenda : Ausencia (-); Leve(+); Presencia(++);Abundante(+++)			

Los resultados de la marcha fitoquímica demostraron que el extracto etanólico presenta metabolitos secundarios como flavonoides, taninos y compuestos fenólicos con reconocida actividad antibacteriana, lo que nos permitió realizar la siguiente etapa de investigación.

Tabla N° 7 RESULTADOS DEL EFECTO ANTIBACTERIANO

MICROORGANISMO	CONTROLES				MUESTRA			
	HALO DE INHIBICIÓN (mm)				EXTRACTO ALCOHÓLICO			
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC	CONTROL POSITIVO				MUESTRA			
					75%			
	45.5	43.6	44.5	46.5	16.6	15.9	16.2	16.3
					50%			
					14.8	14.5	14.6	14.2
	CLORURO DE SODIO				25%			
	0	0	0	0	11.1	12.1	11.6	11.5

Los halos de inhibición del extracto etanólico de las hojas de ***Cistus ladanifer*** (JARA) frente a cepas de ***Staphylococcus aureus*** a diferentes concentraciones, demostraron que todas poseen EFECTO antibacteriana, sin embargo las concentraciones al 75% y 50% son las que mejor efecto presentaron.

4.2 Contrastación de hipótesis

Hipótesis 1

El extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) contiene tipos de metabolitos secundarios con el efecto antibacteriano.

HO= El extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) NO contiene tipos de metabolitos secundarios con el efecto antibacteriano.

HA= El extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) SI contiene tipos de metabolitos secundarios con el efecto antibacteriano.

Resultados: Después de la realización de la marcha fitoquímica, se pudo evidenciar la presencia de los siguientes metabolitos secundarios: Flavonoides, taninos y compuestos fenólicos. Estos metabolitos fueron estudiados anteriormente atribuyéndoles efectos antibacterianos.

Decisión: Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna: El extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) SI contiene tipos de metabolitos relacionados con el efecto antibacteriano.

Hipótesis 2

El extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) tiene efectos antibacterianos frente al *Staphylococcus aureus* en estudio in vitro a diferentes concentraciones.

HO= El extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) NO tiene efectos antibacterianos frente al *Staphylococcus aureus* en estudio in vitro a diferentes concentraciones.

HA= El extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) SI tiene efectos antibacterianos frente al *Staphylococcus aureus* en estudio in vitro a diferentes concentraciones.

Resultados: Al evaluar las diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) frente al *Staphylococcus aureus*, los resultados demostraron un nivel de significancia menor a 0.05.

Decisión: Por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna, las concentraciones si tienen efecto antibacteriano.

TABLA N° 8 Estadísticas descriptivas para los halos obtenidos a diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara).

Descriptivos							
Diámetro de Halos (mm)							
Extractos	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Sig,
					Límite inferior	Límite superior	
25%	4	12,5000	,45000	,25000	15,5500	16,0000	0,001
50%	4	14,0000	,35000	,50000	13,5500	14,0000	0,001
75%	4	13,0000	,30000	,40000	11,0000	12,0000	0,001
Total	16	39,5000	1,10000	1,15000	40,1000	42,0000	0,003

Hipótesis 3

El extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) tiene mejor efecto antibacteriano que la Amoxicilina frente al *Staphylococcus aureus* en estudio in vitro

HO= El extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) NO tiene mejor efecto antibacteriano que la Amoxicilina frente al *Staphylococcus aureus* en estudio in vitro

HA= El extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) SI tiene mejor efecto antibacteriano que la Amoxicilina frente al *Staphylococcus aureus* en estudio in vitro

Resultados: Al evaluar la mayor concentración con efecto antibacteriano, se pudo evidenciar que la amoxicilina tiene mejor efecto que las muestras de estudio.

Decisión: Se rechaza la hipótesis alterna y se acepta la hipótesis nula: El extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) NO tiene mejor efecto antibacteriano que la Amoxicilina frente al *Staphylococcus aureus*.

TABLA N° 9 Tamaño de los Halos de Inhibición

AMOXICILINA	EXTRACTO AL 75%	EXTRACTO AL 50%	EXTRACTO AL 25%
45.5	16.6	14.8	11.1
43.6	15.9	14.5	12.1
44.5	16.2	14.6	11.6
46.5	16.3	14.2	11.5
45.04	16.3	14.55	11.6
MEDIA: 45.04	16.3	14.55	11.6

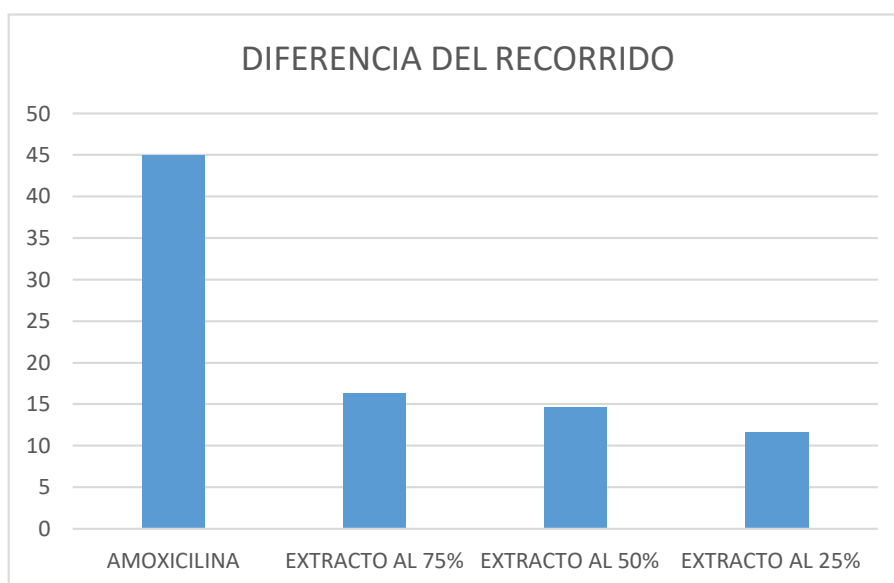


Figura 20 diferencia de recorrido de los halos

4.3 Discusión de resultados

Al identificar los metabolitos presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara), se pudo evidenciar la presencia de flavonoides, taninos y compuestos fenólicos, estos resultados se asemejan a los hallados por Pascual y col., quienes aislaron e identificaron flavonoides, luego Proksch y Gulz al realizar una nueva evaluación de los componentes de esta planta encontraron también flavonoides. Posteriormente Chávez y col; realizaron una evaluación de espectrofotometría y masas y resonancia magnética nuclear elucidando ocho flavonoides entre los que destacan las flavonas y flavonoles.

Al determinar si el extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) posee efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, se

pudo evidenciar que todas las concentraciones presentan efecto siendo la concentración al 75% la que mayor eficacia demostró con un promedio de inhibición del halo de 16.30 mm. Estos resultados sobre *Staphylococcus aureus*, se comparan a los realizados por Huapaya J *et al* (2012), quien empleo diluciones al 10%, 25%, 50% de *Croton lechleri* demostrando efectividad antibacteriana. También son comparados a los estudios realizados por De las Llagas, Santiago y Ramos (2014), encontrando que los extractos a la concentración de 50 y 75% de hojas de *Ficus pseudopalma* también presentaron actividad antibacteriana, asimismo Flores G. (2017) evaluó la actividad antimicrobiana del extracto de *Pleurotus ostreatus* encontrando que las tres concentraciones 30, 70 y 100% son apropiadas para estudios de efectividad antibacteriana.

Al comparar la eficacia que presentara el extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) en comparación a la Amoxicilina en cepas de *Staphylococcus aureus*, los resultados demostraron que el fármaco usado como control resulto ser más efectivo. Este mismo resultado se evidencio en el resto de los antecedentes revisados a excepción de Huapaya J *et al* (2012), cuyo estudio evidencio halos del mismo tamaño entre el control y los extractos de referencia.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones.

El extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) presenta metabolitos secundarios tales como flavonoides, taninos y compuestos fenólicos, responsables del efecto antibacteriano.

El extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) posee efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* a la concentración de 25% fue sensible, a las concentraciones del 50% y 75% la que mayor halo de inhibición presentó siendo muy sensible según la escala de Duraffourt y Lapraz.

Al comparar la eficacia que presentara el extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) frente a Amoxicilina en cepas de *Staphylococcus aureus*, ninguna de las concentraciones demostró tener mayor efecto que el control.

5.2. Recomendaciones

- a.- Realizar evaluaciones de extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara) a concentraciones mayores a fin de encontrar una que pueda tener más eficacia.
- b.- Realizar combinaciones con otras plantas para evaluar efecto sinérgico.
- c.- Evaluar la eficacia de *Cistus ladanifer* (Jara) en otras cepas bacterianas a fin de determinar el espectro de acción.
- d.- Realizar estudios de los metabolitos encontrados en otras propiedades farmacológicas.

BIBLIOGRAFIA

1. Resistencia a los antimicrobianos [en línea]. Ginebra: OMS; 2018. [fecha de acceso 23 de febrero del 2018]. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/>
2. MINSA. Estrategias Y Metodologías de Intervención Para Mejorar El Uso De Los Antimicrobianos En El Ámbito Hospitalario. [en línea] Lima – Perú; 2007. [fecha de acceso 23 de febrero del 2018]. http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/documento_tecnico_ESTRATEGIAS_Y_METODOLOGIAS_DE_INTERVENCION_ATM.pdf
3. Maguiña, C. Uso Racional de antibióticos. [en línea] Lima - Segunda Edición: Marzo 2013. [fecha de acceso 23 de febrero del 2018]. <http://cmp.org.pe/wpcontent/uploads/2017/03/UsoRacionalAntibioticos.pdf>
4. Instituto Nacional de Salud. Informe de la Resistencia Antimicrobiana en Hospitales en Perú. [en línea] Lima; 2007. [fecha de acceso 23 de febrero del 2018]. http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer//Informe_Resistencia_2007pdf
5. Kloucek p, Polezny z, Svobodova b, Vlkova e, Kokoska I. Antibacterial Screening of Some Peruvian Medicinal Plants Used in Callería District. J. of Ethnopharmacol. (2005) 99(2):309- 312.
6. Arauco K. Efecto antiinflamatorio y analgésico del extracto etanólico de *Muehlenbeckia volcánica (Bentham) endlincher* (mullaca) sobre el granuloma inducido por carragenina en ratas. [Tesis titulación]. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2016. 68p.
7. Huapaya J, Flórez M y Larrea H. “Control microbiológico y evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de ***Croton lechleri*** (Sangre de grado)” [en línea] Lima; 2012. [fecha de acceso 27 de febrero del 2018].
- 8 Guevara J. et al. “Acción in vitro de diez plantas medicinales sobre diez cepas diferentes de ***Streptococcus pneumoniae***”, Lima – Perú, 2012. [Disponible:http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832012000400003]
9. De las Llagas C, Santiago L, Ramos J. Antibacterial activity of crude ethanolic extract and solvent fractions of *Ficus pseudopalma* Blanco leaves. Asian Pacific J Trop Dis. 2014;4(5):367–71.
10. Flores G. Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de *Pleurotus ostreatus* ante cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. [Tesis titulación]. Ecuador. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 2017. 81p.

11. Peláez Pulce Pedro Segundo y Herencia Chiclayo Dagy Fressia. "Determinación y Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de una crema de Plantago major L. (llantén) en Escherichia coli, Pseudomona aeruginosa y Bacillus subtilis"
12. Cervantes E, García R, Salazar P. Características generales del Staphylococcus aureus. Revista Latinoamericana de patología clínica y medicina de laboratorio. 2014;61(1):28–40.
13. Bustos J, Hamdan A, Gutiérrez M. Staphylococcus aureus: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Revista Biomédica. 2006;17(4):287–305. 13
14. Jiménez J, Correa M. Staphylococcus aureus resistente a meticilina: bases moleculares de la resistencia, epidemiología y tipificación. 2009;22(2).
15. Carmona F, Rúa M, Del Pozo J. Aproximación terapéutica dirigida de las infecciones por Staphylococcus aureus. Aspectos clínicos de la prescripción. 2016.
16. Hamdan A, Martínez JB, González S. Identificación de Staphylococcus aureus utilizando como marcadores los genes nucA y femB. Revista de Ciencias Clínicas. 2016;
17. Mostacero et al. Plantas medicinales del Perú, taxonomía, ecografías, fenología, y etnobotánica. 1ra ed. Perú. Asamblea nacional de rectores. 2011.
18. Alfaro R. Inventario de plantas medicinales de uso más frecuente en la provincia de Cangallo. [Tesis titulación]. Ayacucho. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2004. 71p.
19. Romero M. Plantas medicinales con propiedades antioxidantes en los distritos de Ayacucho, Carmen Alto y Quinua de la provincia de Huamanga. Ayacucho. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. 2006.
20. Mantilla H. Las Plantas Medicinales de Nuestra Madre Tierra. 2a ed. Perú; 2004.
21. Sinche J. Estudio Farmacognóstico y Farmacológico de Muehlenbeckia volcánica (Benth) "mullaca". [Tesis]. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 1956.
22. Carrión Jara A, García Gómez C. Preparación de extractos vegetales: Determinación de eficiencia metódica. [tesis doctoral en Internet]. Ecuador: Universidad de Cuenca; 2010 [citada el 21 feb 2018]. 150 páginas. Disponible en:
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/2483/1/tq1005.pdf>
23. Lock O. Investigación Fitoquímica. Métodos en el estudio de productos naturales. 2 ed. Perú: 1994

24. Santamaría Caseres L, Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos de verdolaga (*Portulacaoleracea*) en ratas (*Rattusnovergicus*) con edema inducido por carragenina, en el bioterioEspoch. [tesis doctoral en Internet]. Ecuador: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo; 2011 [citada el 21 feb 2018]. 118 páginas. Disponible en: <http://dspace.espoch.edu.ec/bitstream/123456789/1609/1/56T00287.pdf>
25. Alianza estratégica y de Cooperación en la investigación Obtención y aplicación de extractos naturales 2011. Disponible en: <http://www.fcn.unp.edu.ar/sitio/tecnofarma/wpcontent/uploads/2013/02/Extracci%C3%B3n.pdf>
26. Zegarra Piérola J. Bases fisiopatológicas del dolor. Acta méd. peruana [RevistaenInternet].2007 Mayo]citado el 17de Setiembre 2017]; 24(2): 35-38. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172007000200007&lng=es.
27. Pedraza PN, Castellanos HJ. estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de diferentes presentaciones comerciales de antibióticos de administración intravenosa a través de métodos in vitro. pontifica universidad javeina.2009; 1-07.
28. Sussmann OA, Mattos L, Restrepo A. Resistencia bacteriana. Universidad de medicina.2002.
29. Seija V, Bignoli r. Principales grupos de antibióticos. Temas de bacteriología y virología médica.2002.
30. Montoya M. Las cepas atcc. Instituto Colombiano de Medicina Tropical.2002.
31. Casado C, González G, Medina M. Medios de cultivo en un laboratorio de microbiología. Laboratorio files wordpress.2012.
32. Gonzales A.. obtención de aceites esenciales y extractos etanólico de plantas efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de las hojas de *cistus ladanifer* (jara) en cepas *staphylococos aureus* del amazonas. universidad nacional de colombia.2004; 1
33. Calcina A; Pachas D. Actividad antibacteriana in vitro de antibióticos de uso común en combinación con extractos de plantas frente a bacterias patógenas farmacorresistentes. Tesis para obtener el grado de licenciado en biología. Facultad de ciencias biológicas escuela profesional de biología, Universidad Nacional del Altiplano. Puno. Perú. 2018

34. Barrientos L. Jorge A. "Actividad antibacteriana del aceite esencial de canela (*cinnamomum zeylanicum*) en comparación a la clorhexidina al 0.12% sobre cepas de *streptococcus mutans* ATCC 25175. Estudio in vitro. Tesis para optar el título de cirujano dentista. Facultad de ciencias de la salud escuela académico profesional de odontología. Universidad privada Norbert Wiener. Lima – Perú 2017.
35. Collaguazo E. Actividad antibacteriana del aceite esencial de *Hedyosmum* sp. del bosque natural Jacarón, Provincia de Chimborazo. Tesis para la obtención del título de licenciada en ciencias de la salud en laboratorio clínico e histopatológico. Facultad de Ciencias de la Salud. Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico. Universidad Nacional de Chimborazo Riobamba – Ecuador 2019
36. Cushquicushma P. Actividad antibacteriana de extractos metanólicos de *Tanacetum spp* frente a cepas ATCC. Tesis para la obtención del título de licenciada en ciencias de la salud en laboratorio clínico e histopatológico. Facultad de Ciencias de la Salud. Carrera de Laboratorio Clínico e Histopatológico. Universidad Nacional de Chimborazo Riobamba – Ecuador 2018
37. Sande MA, Kapusnik-Uner JE, Mandell GL. Agentes antimicrobianos. Consideraciones generales. En: Goodman A, Rall TW, Nies AS, Taylor P. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8a ed. Parte XI, Capítulo 44. México DF: Editorial Médica Panamericana, 1993: part 11, cap 44:991-1017.
38. Quimioterapia antimicrobiana. En: Jawetz E, Melnick JL, Alderberg EA. Manual de Microbiología Médica, 12a ed. México DF: El Manual Moderno, 1988:110-35.
39. Calderwood SB, Moellering RC Jr. Principles of anti-infective therapy. En: Stein JH. Internal Medicine. 3th ed. Boston: Little Brown and Co, 1990:1202-
40. Laura Tomás Menor. Caracterización analítica y funcional de extractos con actividad antimicrobiana obtenidos de plantas del género *Cistus*. Estudio in vitro tesis doctoral. Universidad Miguel Hernández. Alicante – España 2015.
41. Fernández-Arroyo. Los extractos acuosos de *cistaceae* que contienen elagitaninos muestran capacidad antioxidante y antimicrobiana, y actividad citotóxica contra las células cancerosas humanas. Instituto de Biología Molecular y Celular, Universidad Miguel Hernández. Alicante – España 2010.
42. Barrio Dueñas et. Antifungal activity and detailed chemical characterization of *Cistus ladanifer* phenolic extracts. Portugal. 2013.

ANEXOS

Anexo 1 FORMATO DE PRUEBA DE SOLUBILIDAD

MUESTRA	SOLVENTE	RESULTADO
EFEECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE LAS HOJAS DE <i>Cistus ladanifer</i> (JARA) EN CEPAS <i>Staphylococcus aureus</i>	Éter de petróleo	
	Cloroformo	
	Acetona	
	Acetato de etilo	
	n-butanol	
	Etanol	
	Metanol	
	Agua	
Leyenda: insoluble (-) poco soluble (+) soluble (++) muy soluble (+++)		

Anexo 2 FORMATO DE MARCHA FITOQUÍMICA

REACTIVOS	METABOLITOS	COLOR, PRECIPITADO	RESULTADO
Molish	Carbohidratos en General	Violáceo	
Fehling A +Fehling B	Azucares Reductores	Precipitado Rojo Ladrillo	
Ninhidrina	Aminoácidos	Violáceo	
Shinoda	Flavonoides	Rojo ,azul, verde	
Pb(CH₃COO)₂	Flavonoides	Amarillo	
Na OH 10%	Cumarinas	Amarillo	
Gelatina	Taninos	Precipitado blanco	
FecI₃ 5%	Compuestos Fenólicos	Amarillo, Violeta, azul	
Dragendorff	Alcaloides	Precipitado rojo ladrillo	
Mayer	Alcaloides	Precipitado Blanco lechoso	
Rtvo de Popoff	Alcaloides	Precipitado amarillo intenso	
Rtvo de Wagner	Alcaloides	Precipitado Marrón	
Leyenda : Ausencia (-); Leve(+); Presencia(++);Abundante(+++)			

Anexo 3 FORMATO DE EFECTO ANTIBACTERIANO

Halos de inhibición extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (JARA) frente a cepas de *Staphylococcus aureus*

N DE PLACAS	25%	50%	75%	control
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
Media:				

TESTIMONIOS FOTOGRÁFICOS

Anexo 4 Selección de la especie botánica hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)



Anexo 5 Obtención del extracto etanólico de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)



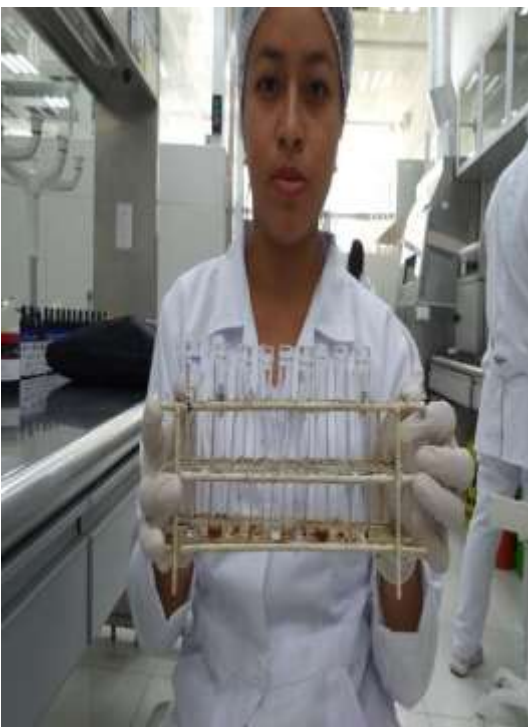
Anexo 6 Obtención del extractos seco de las hojas de *Cistus ladanifer* (Jara)



Anexo 7 Prueba de solubilidad



Anexo 8 Marcha fitoquímica



Anexo 9 Efecto antibacteriano









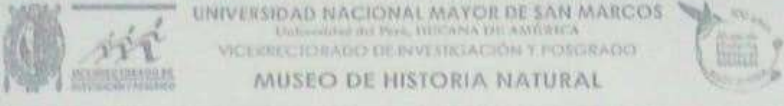
Anexo 10 Certificado de la cepa de estudio

Microbiologics®

Certificate of Analysis, Unverified Microorganism, Specification and Performance User Release

<p>Specifications Microorganism Name: <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Catalog Number: 0405 Lot Number: 435-431 Reference Number: ATCC® 6538™ Purity: Pure Passage from Reference: 2</p>	<p>Expiration Date: 2016/02/28 Release Information: Quality Control Technologist: Keshra L. Negen Release Date: 2017/03/1</p>
<p>Performance</p>	
<p>Macroscopic Features: Medium to large, convex, circular, spreading, smooth, creamy, opaque, beta hemolytic - 20% light gold and darker gold colonies may be present.</p>	<p>Medium: SBAP</p>
<p>Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters.</p>	<p>Method: Gram Stain (1)</p>
<p>ID System: MALDI-TOF See attached ID System result document.</p>	<p>Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative</p> <p style="text-align: center;"><i>Amrita Kuperat</i> Amrita Kuperat Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE</p>
<p>Disclaimer: The lot number of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging identification. The lot number recorded on this certificate is the actual lot number.</p>	
<p>Note for Users: Although the product name does not mention a specific medium, the release environment of the lot, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</p>	
<p>Refer to the attached product insert for instructions, intended use and handling information.</p>	
<p>Individual products are traceable to a recognized source collection.</p>	
	<p>(1) The ATCC (American Type Culture Collection), the ATCC (American Type Culture Collection) and the ATCC (American Type Culture Collection) are trademarks of ATCC, Rockville, MD. It is intended to use these trademarks and logos for identification purposes only.</p>
	<p>(2) These logos are trademarks of ATCC (17020-200)</p>
 <p>ACCREDITED ISO 17026:2014 #2553-03</p>	

Anexo 11 Certificado de la especie botánica

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**
Universidad del Perú, VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL

"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"

CONSTANCIA N° 096-USM-2018

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

La muestra vegetal (arbusto) recibida de LINARES PALOMARES, KIARA MELINA, estudiante de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, ha sido estudiada y clasificada como: *Cistus landanifer* L. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1998).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA
CLASE: MAGNOLIOPSIDA
ORDEN: MALVALES
FAMILIA: CISTACEAE
GENERO: CISTUS
ESPECIE: *Cistus landanifer* L.

Nombre vulgar: "Jara"
Determinado por: Mag. Asuncion A. Cano Echevarria

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudio.

Lima 17 de abril de 2018


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

ACE/yhr