



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE SEMILLAS DE *Lupinus mutabilis Sweet*
(TARWI) FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 25922**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO

AUTORES

Bach. ROJAS CALDERON, FIORELLA YOHANA

<https://orcid.org/0009-0005-2522-3467>

Bach: POMA ZANABRIA, KARINA

<https://orcid.org/0000-0003-4669-3394>

ASESOR

Mg. LA SERNA LA ROSA, PABLO ANTONIO

<https://orcid.org/0000-0001-7065-012X>

LIMA – PERÚ

2023

AUTORIZACIÓN Y DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

Yo, **KARINA POMA ZANABRIA**, con DNI **43671623**, en mi condición de autora de la tesis presentada para optar el TÍTULO PROFESIONAL DE “QUIMICO FARMACEUTICO” de título “ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE SEMILLAS DE *Lupinus mutabilis Sweet* (TARWI) FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 25922, AUTORIZO a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para reproducir y publicar de manera permanente e indefinida en su repositorio institucional, bajo la modalidad de acceso abierto, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula el Repositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

Asimismo, **DECLARO BAJO JURAMENTO** que dicho documento es **ORIGINAL** con un porcentaje de similitud de 21 % y que se han respetado los derechos de autor en la elaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregado la versión final del documento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

En señal de conformidad con lo autorizado y declarado, firmo el presente documento a los 05 días del mes de enero del año 2023.



Karina, Poma Zanabria
DNI: 43671623



Mg. PABLO ANTONIO LA SERNA LA ROSA
DNI: 06121495

AUTORIZACIÓN Y DECLARACIÓN JURADA DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD

Yo, **IORELLA IOHANA, ROJAS CALDERON** con DNI **48398761**, en mi condición de autora de la tesis presentada para optar el TITULO PROFECIONAL DE "QUIMICO FARMACEUTICO" de título "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE SEMILLAS DE *Lupinus mutabilis Sweet* (TARWI) FRENTE A *Escherichia coli* ATCC 25922 AUTORIZO a la Universidad María Auxiliadora (UMA) para reproducir y publicar de manera permanente e indefinida en surepositorio institucional, bajo la modalidad de acceso abierto, el archivo digital que estoy entregando, en cumplimiento a la Ley N°30035 que regula elRepositorio Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación de acceso abierto y su respectivo Reglamento.

Asimismo, **DECLARO BAJO JURAMENTO** que dicho documento es **ORIGINAL** con un porcentaje de similitud de 21 % y que se han respetado los derechos de autor en laelaboración del mismo. Además, recalcar que se está entregado la versión final deldocumento sustentado y aprobado por el jurado evaluador.

En señal de conformidad con lo autorizado y declarado, firmo el presente documento a los 05 días del mes de enero del año 2023.



Fiorella Yohana, Rojas Calderón
DNI: 48398761



Mg. PABLO ANTONIO LA SERNA LA ROSA
DNI: 06121495

TESIS FINAL - POMA - ROJAS

INFORME DE ORIGINALIDAD

21 %	21 %	4 %	5 %
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.uma.edu.pe Fuente de Internet	8 %
2	repositorio.uigv.edu.pe Fuente de Internet	5 %
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	5 %
4	Submitted to Universidad Cesar Vallejo Trabajo del estudiante	1 %
5	intra.uigv.edu.pe Fuente de Internet	1 %
6	1library.co Fuente de Internet	1 %
7	repositorio.unsa.edu.pe Fuente de Internet	1 %

Excluir citas

Activo

Excluir coincidencias < 1%

Excluir bibliografía

Activo

DEDICATORIA

A Dios por guiarme en cada paso que doy día a día, por cuidarme y brindar salud a mis padres quienes siempre me brindan su apoyo incondicional.

Rojas Calderon, Fiorella Yohana

A dios por darme la fuerza para poder concluir mis estudios y a mis padres que siempre me apoyaron en todo momento e inculcaron los buenos valores de la vida.

Poma Zanabria, Karina

AGRADECIMIENTO

A nuestra Universidad María Auxiliadora por habernos impartido los conocimientos para formarnos profesionalmente y llegar a nuestras metas trazadas.

A nuestros padres, familiares y compañeros quienes estuvieron apoyándonos en el transcurso de este trabajo de investigación.

A nuestro asesor, Mg. La Serna La Rosa, Pablo Antonio, por sus incansables enseñanzas y su paciencia en cada etapa de esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	vii
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
II.1. Enfoque y diseño de la investigación	8
II.2. Población, muestra y muestreo	8
II.3. Variables de investigación	8
II.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	9
II.5. Plan de recolección de datos.....	9
II.6. Métodos de análisis estadísticos	12
II.7. Aspectos éticos.....	12
III. RESULTADOS.....	13
IV. DISCUSIÓN	26
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
ANEXOS	38
ANEXO A: Instrumentos de recolección de datos.....	38
ANEXO B: Matriz de consistencia CIORREGIR	41
Anexo C. Operacionalización de las variables	42
ANEXO D. Certificado Taxonómico	43
ANEXO E. Informe de análisis de laboratorio	44
ANEXO F. Certificado de Agar Mueller Hinton.....	45
ANEXO G. Certificado de análisis de Cepa <i>Escherichia coli</i>	49
ANEXO H. Evidencias fotográficas.....	51
ANEXO I. Porcentaje de rendimiento.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Prueba solubilidad del extracto etanólico de semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (Tarwi)	13
Tabla 2. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (Tarwi)	14
Tabla 3. Resultados promedio de las mediciones de los halos de inhibición (mm) del extracto etanólico de semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (Tarwi)	15
Tabla 4. Estadísticos descriptivos de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (Tarwi) frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	19
Tabla 5. Pruebas de ANOVA de los halos obtenidos frente a la cepa de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	22
Tabla 6. Comparaciones múltiples de los halos de inhibición de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 – Prueba de TUKEY.	23
Tabla 7. Prueba de subconjuntos de Tukey para <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (Tarwi)	16
Figura 2. Muestra de tipo semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (Tarwi).....	51
Figura 3. Selección de la muestra	51
Figura 4. Lavado de la muestra	51
Figura 5. Procedimiento de secado de la muestra.....	52
Figura 6. Procedimiento de molienda de la muestra.....	52
Figura 7. Preparación del macerado del extracto etanólico	52
Figura 8. Procedimiento de filtración del macerado del extracto etanólico	53
Figura 9. Obtención de extracto seco	53
Figura 10. Añadiendo extracto seco al tubo de ensayo para prueba de solubilidad	54
Figura 11. Agitación en el vortex	54
Figura 12. Resultado de prueba de solubilidad.....	54
Figura 13. Adición de extracto a los tubos de ensayo.....	55
Figura 14. Adición del reactivo en la marcha fitoquímica.....	55
Figura 15. Resultado de la marcha fitoquímica.....	55
Figura 16. Pesando del Agar	56
Figura 17. Agar Mueller Hinton	56
Figura 18. Autoclave para el uso en la prueba microbiológica.....	56
Figura 19. Placas preparadas.....	57
Figura 20. Cepa biológica de tipo: <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	57
Figura 21. Comparación de turbidez mediante el reactivo de Mc. Farland	57
Figura 22. Rotulado de placas.....	58
Figura 23. Sembrado de la cepa biológicas en las placas.....	58
Figura 24. Efectuando pozos en agar con ayuda de un sacabocado	58
Figura 25. Adición de la sustancia experimental en la placa Petri	59
Figura 26. Adición de discos previamente preparados	59
Figura 27. Incubación	60
Figura 28. Placas Petri con halos de inhibición	60
Figura 29. Lectura de resultados	60

RESUMEN

Objetivo: Determinar actividad antibacteriana in vitro el extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Materiales y métodos: de tipo cuantitativo, experimental, transversal; población 8 kg de semillas de plantas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) y cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922; la muestra estuvo constituida por 5 Kg de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* y la muestra biológica usada fueron de 10 placas Petri inoculadas con *Escherichia coli* ATCC 25922. El procedimiento fitoquímico fue la marcha fitoquímica y el método microbiológico usado fue la difusión en agar en pozos o Kirby Bauer modificado con 10 repeticiones y estuvo constituida por grupos al 25 %, 50 % y 75 % frente al grupo control (Ciprofloxacino 5ug).

Resultados: Los metabolitos secundarios que se detectaron fueron los alcaloides, taninos y azúcares reductores. Por otro lado, en el análisis estadístico mediante la prueba de ANOVA ($p < 0,05$) y Tukey, evidenció como resultado que solo las concentraciones al 50% y 75% con halos de $8,9330 \pm 0,02214$ y $10,6430 \pm 0,02983$ mm respectivamente frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, tuvieron sensibilidad baja, los cuales presentaron diferencias estadísticamente significativas que poseen actividad antibacteriana, no obstante, no superaron al fármaco de referencia Ciprofloxacino 5ug.

Conclusión: El extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) presentó actividad antibacteriana en las concentraciones del 50% y 75% frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Palabras clave: Actividad antibacteriano, *Lupinus mutabilis Sweet* y *Escherichia coli*, extracto etanólico.

ABSTRACT

Objective: To determine in vitro antibacterial activity of the ethanolic extract of *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) seeds on *Escherichia coli* ATCC 25922 strains.

Materials and methods: quantitative, experimental, cross-sectional; population 8 kg of seeds of *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) plants and strain of *Escherichia coli* ATCC 25922; The sample consisted of 5 kg of *Lupinus mutabilis* Sweet seeds and the biological sample used was 10 Petri dishes inoculated with *Escherichia coli* ATCC 25922. The phytochemical procedure was the phytochemical march and the microbiological method used was diffusion in agar in wells or Kirby. Bauer modified with 10 repetitions and consisted of groups at 25%, 50% and 75% compared to the control group (Ciprofloxacin 5ug).

Results: The secondary metabolites that were detected were alkaloids, tannins and reducing sugars. On the other hand, in the statistical analysis using the ANOVA test ($p < 0.05$) and Tukey, the result showed that only the concentrations at 50% and 75% with halos of 8.9330 ± 0.02214 and 10.6430 ± 0.02983 mm respectively against *Escherichia coli* ATCC 25922 strains, had low sensitivity, which presented statistically significant differences that have antibacterial activity, however they did not exceed the reference drug Ciprofloxacin 5ug.

Conclusion: The ethanolic extract of seeds of *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) presents antibacterial activity in concentrations of 50% and 75% against strains of *Escherichia coli* ATCC 25922.

Keywords: Antibacterial activity, *Lupinus mutabilis* Sweet and *Escherichia coli*, ethanolic extract.

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones gastrointestinales son una amplia gama de patologías que son ocasionadas por virus, parásitos y bacterias, estas se transmiten a través del consumo de alimentos y/o fuentes de agua contaminados, así como el contacto cercano con animales que son reservorios o portadores de estos microorganismos (1), solo en el Reino Unido se ha reportado que el 25 % de habitantes ha sufrido de alguna de infección intestinal. (2)

En cuanto a las bacterias que ocasionan este tipo de infecciones entre las más peligrosas, debido a la resistencia que han ido adquiriendo contra la antibioticoterapia, se encuentran *Helicobacter pylori*, *Clostridioides difficile*, *Campylobacter jejuni* y *Escherichia coli* (3), esta última especie se relaciona con la manifestación de enfermedades diarreicas, la cual ha sido responsable de ocasionar 51 186 muertes en personas de todas las edades, pero en la población pediátrica ha provocado el deceso del 4, 2 % de estos. (4)

En estudios epidemiológicos se ha registrado que el 16, 5 % de la población mundial ha presentado algún tipo de infección por esta bacteria (5). En el medio oriente países como Arabia Saudita han reportado que la cepa predominante en ese país es *E. coli productora de β -lactamasa* de espectro extendido, la cual presenta resistencia a antibióticos betalactámicos (6); por otro lado en Irán se halló que el 26 % de pacientes con cuadros diarreicos tienen a esta bacteria según las respectivas muestras analizadas (7), mientras que en Nepal la cifra fue del 44, 5 % pero además se detectó que las cepas aisladas presentaban resistencia a por los menos dos antibióticos (8) y finalmente en Etiopia la cifra obtenida fue del 15, 3 % y la causa principal de la enfermedad fue por el consumo alimentos bajo ninguna medida de higiene. (9)

En países con mayor desarrollo como Rumania se halló que el 79 % de pacientes pediátricos con diarrea presentaban esta infección a causa de una de las toxinas de esta bacteria (10). Esta bacteria no solo representa un peligro latente debido al daño que produce en el organismo sino también porque se halla en la naturaleza, tal como lo demostró un estudio realizado en Estados Unidos en donde el 99, 3 % de muestras de aguas destinadas al consumo humanos tenían la presencia de esta bacteria (11) asimismo también se ha hallado a este microorganismo en productos

cárnicos, lácteos, frutas y vegetales, que provienen principalmente de mercados rurales, lo cual facilita su propagación a toda la población. (12)

El ministerio de Salud del Perú, notifico que en el año 2019 que existían alrededor de 1204136 episodios de diarrea aguda, siendo la población afectada en mayor medida los niños mayores de 5 años y a su vez en ese mismo año se produjo el mayor número de fallecimientos a causa de esta infección con una prevalencia mayor del 65 % en esa misma población. (13) Por otro lado un estudio reciente ha demostrado que esta bacteria sigue latente en nuestro medio a causa de las pobres medidas de salud ambiental y salud pública que toman las autoridades pertinentes. (14)

La resistencia bacteriana ha sido clasificada como uno de los principales peligros que amenaza la salud mundial, este fenómeno se produce cuando los antibióticos ya no son efectivos para controlar el crecimiento de bacterias patógenos, lo cual produce el aumento de casos de mortalidad en pacientes que han adquirido alguna bacteria resistente. Según datos de algunos medios de salud se ha reportado 25 000 casos de fallecimientos por estas circunstancias por lo que la Organización Mundial de la Salud ha pronosticado que en el año 2050 esta cifra oscilara entre los 700 000 y 10 millones por año, en diferentes partes del mundo. (15)

Tal como se mencionó anteriormente *Escherichia coli*, es una de las bacterias más resistentes que existe, ya que ha ido adquiriendo métodos que le permiten inactivar a las moléculas antibióticas, como por ejemplo la síntesis de enzimas que producen la hidrólisis de las penicilinas, cefalosporinas y monobactamicos. (16)

Escherichia coli es una bacteria gramnegativa con forma de bastón o bacilo y pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, habita en el intestino del ser humano formando parte del microbiota natural e incluso se puede hallar en la sangre de algunos animales, a pesar de ser un comensal puede causar enfermedades como la diarrea (17). Su patogenicidad se debe a las endotoxinas y fimbrias que presenta en su estructura. Esta bacteria se puede adquirir por vía fecal-mano-oral, por lo que se le asocia con enfermedades intestinales, urinarias y en entornos hospitalarios (18).

El mecanismo de acción de *Escherichia coli* se caracteriza debido a que sus toxinas

termolábiles ejercen su efecto secretor estimulando el adenilato ciclasa de la mucosa intestinal. Esta estimulación resulta de la transferencia catalizada por la subunidad A1 de adenosina difosfato ribosa de ADN a una guanosina trifosfatasa unida a la membrana, inhibiendo así la enzima, que normalmente reprime el adenilato ciclasa. La enterotoxina de E. coli termoestable estimula el guanilato ciclasa de la mucosa intestinal, que es la base de su enterotoxicidad (19).

Por otro lado, el fármaco de referencia del presente estudio es el ciprofloxacino el cual presenta como mecanismo de acción que actúa sobre la topoisomerasa II

bacteriana (ADN girasa) y la topoisomerasa IV. La focalización del ciprofloxacino en las subunidades alfa de la ADN girasa evita que super enrolle el ADN bacteriano, lo que impide la replicación del ADN y de esta manera evitar su proliferación (20).

Lupinus mutabilis Sweet es una especie vegetal que tiene como nombre vulgar “Tarwi” o “chocho”, esta una planta que crece a una altitud entre los 2000 a 3000 metros sobre el nivel del mar, principalmente en países de Latinoamérica como Perú, Bolivia, Argentina y Chile; en nuestro país se puede hallar en los departamentos de Cajamarca, La libertad, Cusco, Puno, etc. (21) En cuanto a su taxonomía pertenece a la familia *Fabaceae* y al género *Lupinus*, esta especie se caracteriza debido a que sus semillas son de un alto nivel alimenticio por la presencia de la lisina, el cual es un aminoácido que no se encuentra de manera muy frecuente en los productos vegetales, es por ello que esta leguminosa presenta propiedades nutricionales muy superiores a otros alimentos como la soya (22). Entre los principales metabolitos secundarios que presentan las semillas están los polifenoles, fitoesteroles, carotenoides, tocoferoles y alcaloides tales como la lupina, lupanina y espartina, estas sustancias químicas le proveen de beneficios a la salud como antioxidante, anticancerígeno, antimicrobiano y antidiabético. (23,24)

Entre los antecedentes internacionales están los estudios de:

Buszewski B, *et al.* (2019), su objetivo principal fue evaluar las propiedades biológicas del extracto de semillas de *Lupinus luteus*, mediante la técnica fluido supercrítico con CO₂, además realizaron un análisis fitoquímico cuantitativo, obteniendo como resultados de compuestos fenólicos, mientras que al evaluar su capacidad antibacteriano hallaron que inhibió el crecimiento de bacterias patógenas como *Pseudomona aureginosa*, concluyendo que presenta dicha actividad. (25)

Romeo F, *et al.* (2018), su objetivo principal fue determinar la actividad antibacteriana de los alcaloides de las semillas de tres especies del género *Lupinus*, para ello se utilizó la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas, en la cual identificaron una cantidad total de 30 alcaloides, los cuales fueron efectivos contra las cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas*

aeruginosa. Concluyendo que los alcaloides del género Lupines tienen capacidad antibacteriana. (26)

Al-Amrousi E, et al. (2022), su objetivo principal fue evaluar la actividad biológica y sus metabolitos secundarios del aceite esencial de las semillas del chocho dulce y amargo, para ello se usó el método de ultrasonido y se empleó como disolvente éter de petróleo. Los principales metabolitos hallados fueron los fenoles mientras que al evaluar su actividad antibacteriana mostro un efecto significativo, concluyendo la veracidad de dicho efecto. (27)

En cuanto a los antecedentes nacionales están los estudios de:

Castillejo E y Trujillo C (2020), su objetivo principal fue evaluar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de las semillas del chocho a las concentraciones de 20, 30 y 40 % frente a las cepas de *Escherichia coli*, utilizando la técnica de difusión en agar. Como resultados hallaron que la concentración al 40 % produjo un halo de 20, 56 mm seguido de las concentraciones al 30 y 20 %. Tenido como conclusión que el extracto empleado si presenta el efecto deseado. (28)

Álvarez L y Bellido J (2022), su objetivo principal fue determinar el efecto antibacteriano de las semillas de Tarwi frente a *E. coli*, para ello se preparó un extracto acuoso a base de la droga vegetal mencionada y para el ensayo microbiológico se utilizó la técnica de difusión en agar. Como resultados hallaron que el extracto a la concentración de 40 % produjo el halo con mayor promedio. Obteniendo como conclusión que las semillas de Tarwi presenta el efecto en estudio. (29)

Pauro, J (2020), su objetivo principal fue evaluar el efecto antibacteriano de las decocciones de las semillas de *L. mutabilis* a las concentraciones de 5, 10, 30, 50 y 100 % sobre *Escherichia coli*, para ello se utilizó la técnica de Kirby-Bauer y se compara con un estándar de eritromicina. Como resultados obtuvo que la concentración 100 % obtuvo un halo de 9, 27 mm. Concluyendo que las semillas de Tarwi presentan efecto antibacteriano. (30)

La justificación del estudio se basa es la búsqueda de nuevas alternativas medicinales que puedan controlar las infecciones ocasionadas por *Escherichia coli*,

ya que, debido a la resistencia bacteriana, durante las infecciones diarreicas no se prescriben antibióticos ni otros fármacos que impiden el avance del patógeno, por lo que el uso de antimicrobianos es considerado como una segunda línea de tratamiento en el Perú (31). Por otro lado, se busca brindar mayor información sobre los beneficios nutricionales y sobre todo medicinales sobre las semillas de *Lupinus mutabilis Sweet*, ya que a pesar que es una planta que crece en diferentes regiones de nuestro país, una gran parte de la población ignora sus propiedades (32), por lo tanto, es importante y urgente difundir toda la información etnobotánica de esta especie vegetal. Una posible aplicación de esta investigación es promover el uso de los productos naturales para el tratamiento antibacteriano en patógenos resistentes, ya que estos pueden afectar seriamente a la población y sobre todo a aquellos que no cuenta con un adecuado acceso a la atención primaria ni a medicamentos básicos, es por ello que esta planta podría convertirse en un candidato medicinal de bajo costo y amplio acceso. Finalmente, para obtener los resultados esperados se utilizarán técnicas empleadas en investigaciones previas que han presentado buenos resultados.

Como objetivo se presenta lo siguiente: Determinar actividad antibacteriana in vitro el extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

La hipótesis de la investigación se detalla a continuación: El extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) presenta actividad antibacteriana significativamente favorable sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Enfoque y diseño de la investigación.

El presente estudio fue de enfoque cuantitativo, debido a que se utilizó métodos analíticos y numéricos para interpretar los resultados; de diseño experimental, ya que los investigadores manipularon la variable independiente (extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet -Tarwi), explicativo y transversal. (33–35)

II.2. Población, muestra y muestreo.

La población microbiológica fue 8 kg de semillas de plantas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) que se recolectó en la Comunidad Campesina de Uñas, distrito de Huancayo, provincia de Huancayo, ubicada en el departamento de Junín a 3540 m s. n. m. y coordenadas de 12° 1' 29.2" S, 75° 11' 3.5" W

La población microbiológica fueron cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

La muestra fue de 5 Kg de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi).

Criterios de inclusión:

- ✓ Semillas con buen estado físico.
- ✓ Semillas que no tengan señales de germinación.

Criterios de exclusión:

- ✓ Semillas en descomposición.
- ✓ Semillas aplastadas o rupturas en su estructura.
- ✓ Semillas contaminadas (insectos, microorganismos, etc.)

El tipo de muestreo fue probabilístico por conveniencia.

II.3. Variables de investigación.

Variable Independiente: Extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi)

Definición conceptual: Fracción líquida obtenida de la maceración etanólica de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet. (36)

Definición operacional: Técnica de maceración de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet*.

Variable Dependiente: Actividad antibacteriana in vitro frente a *Escherichia coli* ATCC 25922

Definición conceptual: Capacidad de inhabilitar la diseminación de un grupo de microorganismos.

Definición operacional: Se empleó la técnica de difusión en agar para hallar las medidas de los halos de inhibición producido por los discos de experimentación.

II.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.

La técnica usada fue la observación. En cuanto a los procedimientos fitoquímicos se realizó un tamizaje preliminar y en el ensayo microbiológico se empleó la técnica de Kirby-Bauer y Duraffourd. (37)

El instrumento fue la ficha de observación el cual sirvió para la recolección de datos de los análisis fitoquímicos y microbiológicos. (37)

II.5. Plan de recolección de datos.

II.5.1. Autorización y recolección de la especie vegetal.

Las semillas de Tarwi se recolectaron en el transcurso de la mañana, en la Comunidad Campesina de Uñas, distrito y provincia de Huancayo, en el departamento de Junín, esto se realizó una vez completada la maduración y cuando las vainas adquirieron una coloración amarillenta y al mover las plantas se escuche el sonido del grano dentro de las vainas, como lo indica el Instituto Nacional de Innovación Agraria – INIA.

II.5.2. Identificación de la especie vegetal.

El reconocimiento taxonómico de la especie vegetal de interés se llevó a cabo por un especialista en la identificación taxonómica de especies vegetales, en donde brindó un certificado botánico validando la identidad de la especie *Lupinus mutabilis Sweet*.

II.5.3. Preparación de la droga vegetal.

La limpieza de las semillas se realizó con agua potable luego se expuso a temperatura ambiente por un tiempo entre 15 a 20 minutos. (28)

Luego del tiempo propuesto las semillas se pasaron a un vaso de precipitado con un volumen de 1 L y se le agregó agua destilada hasta cubrir por completo toda la droga vegetal. (28)

Finalmente se colocó el vaso de precipitado con la droga vegetal en la estufa a una temperatura de 40° C por un tiempo estimado de 6 horas. Luego de este proceso se realizó la molienda de las semillas secas para realizar el proceso de maceración. (38)

II.5.4. Preparación del extracto etanólico.

Para la maceración de las semillas de Tarwi se requirió de un frasco color ámbar con capacidad de 1 L y alcohol etílico al 96 %, el cual actuó como disolvente para remover los metabolitos primarios y secundarios. La técnica fue por maceración dinámica por 5 días. Al finalizar el macerado, el extracto fue filtrado y se llevó al rotavapor bajo presión reducida para eliminar el disolvente, paso seguido se almacenó nuevamente en la estufa a una temperatura de 40°C por 48 horas con la finalidad de obtener el extracto crudo o seco para la realización de las pruebas posteriores. (38)

Prueba de solubilidad

Para esta prueba se utilizó 0,5 g del extracto seco y 1 mL de los siguientes disolventes: Éter de petróleo, diclorometano, cloroformo, butanol, etanol de 70°, metanol, agua destilada y dimetilsulfóxido (39)

Marcha fitoquímica del extracto

El tamizaje fitoquímico preliminar se realizó según la técnica de Olga Lock, para ello se utilizó 12 tubos de ensayo con 1ml del extracto fluido y los siguientes reactivos: Baljet (Lactonas α , β insaturadas), Dragendorff (Alcaloides), Gelatina-sal (Taninos), NaOH 10 % (Antocianinas), Cloruro férrico (Compuestos fenólicos), Shinoda (Flavonoides), Liebermann-

Burchard (Triterpenos y esteroides), Gelatina (Taninos), Wagner (Alcaloides), Índice Afro simétrico (Saponinas), Borntrager (Quinonas) y Mayer (Alcaloides) (40)

II.5.5. Ensayo microbiológico.

Activación de las cepas de *E. coli* ATCC 25922: Este proceso se llevó a cabo utilizando Kwik-stik, el procedimiento consistió en presionar la ampolla ubicada en la parte superior del contenedor y dejar salir el líquido hidratante hacia la parte inferior. Al finalizar este proceso se tomó una muestra de la solución obtenida y se traspasará en 5 mL de caldo soya tripticasa. (41)

Activación de las cepas: Para ello se preparó una suspensión directa de la cepa y se ajustó la turbidez de este según la escala 0,5 de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). (42)

Inoculación de las Placas: Se realizó en placas con agar Mueller-Hinton, el cual se preparó según las indicaciones del fabricante. La cepa se sembró con el uso de un asa de siembra debidamente esterilizada mediante la técnica de estrías cruzadas para garantizar un sembrado más uniforme por el medio de cultivo. (39)

Preparación de los discos: Estos se prepararon a partir de papel Whatman N° 1 con un diámetro de 9 mm los cuales estuvieron esterilizados, finalmente estos se empaparon con las siguientes sustancias para realizar la técnica de Difusión en agar. (39)

- ✓ Grupo extracto etanólico de semillas de *L. mutabilis Sweet* al 25 %
- ✓ Grupo extracto etanólico de semillas de *L. mutabilis Sweet* al 50 %.
- ✓ Grupo extracto etanólico de semillas de *L. mutabilis Sweet* al 75 %
- ✓ Grupo control: Discos de ciprofloxacino 5 µg
- ✓ Grupo control: Discos embebidos con alcohol al 96°

Luego se llevó a incubar todas las placas, en la estufa a 37°C de 24 a 48 horas. Finalmente, estos resultados se evaluaron mediante la “Escala de Duraffourd”. (43)

II.6. Métodos de análisis estadísticos

Los resultados obtenidos en la prueba de Kirby-Bauer se procesaron con el uso de dos programas informáticos como Excel y el paquete estadístico en (SPSS) versión 27, en este último se realizaron las pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y test de Tukey.

II.7. Aspectos éticos

El presente estudio tomó en cuenta criterios de bioseguridad en el tratamiento de la muestra, asimismo usando procedimientos de buenas prácticas de laboratorio.

III. RESULTADOS

III.1 Prueba de solubilidad

Tabla 1. Prueba solubilidad del extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi)

TUBO	SOLVENTE	RESULTADOS
1	Éter de petróleo	+
2	Diclorometano	+
3	Cloroformo	+
4	Butanol	+
5	Etanol 96	+++
6	Etanol 70	+
7	Metanol	++
8	Agua destilada	+
9	Dimetilsulfoxido	+++

Leyenda:

- Insoluble: (-)
- Poco soluble: (+)
- Medianamente soluble: (++)
- Muy soluble: (+++)

En la tabla 1, mediante el análisis de solubilidad del extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi), el resultado indicó que la mayor solubilidad (+++) corresponde al solvente Etanol 96 y Dimetilsulfoxido; seguido de Metanol (++) con mediana solubilidad, por último, Éter de petróleo, Diclorometano, Cloroformo, Butanol, Etanol 70 y Agua destilada evidenciaron ser poco solubles (+) en la muestra en investigación.

III.2 Marcha fitoquímica

Tabla 2. Tamizaje fitoquímico del extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi)

TUBO	ENSAYOS	METABOLITO	RESULTADO
1	Borntrager.	Antraquinonas	-
2	Cloruro férrico.	Compuestos fenólicos	+
3	Liebermann-Burchard.	Terpenos y esteroides	-
4	Dragendorff.	Alcaloides	+++
5	Mayer.	Alcaloides	+++
6	Wagner.	Alcaloides	+++
7	Baljet.	Lactonas α , β -insaturadas	+
8	Gelatina.	Taninos	+++
9	Gelatina-sal.	Taninos	+++
10	NaOH 10%.	Antocianinas	-
11	Espuma.	Saponinas	-
12	Shinoda.	Flavonoides	+

Leyenda:

- (-) Ausente
- (+) Escaso
- (++) Leve
- (+++) Moderado

En la tabla 2, a través de la marcha fitoquímica del extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi), se realizó el análisis mediante pruebas de coloración y precipitación.

Se evidenció metabolitos secundarios como alcaloides, taninos, los cuales manifestaron moderada presencia (+++), reconocidos mediante reactivos: Dragendorff, Mayer, Wagner, Gelatina y Gelatina-sal respectivamente; escasa presencia (+) en compuestos fenólicos, lactonas α , β -insaturadas y flavonoides mediante los reactivos: Cloruro férrico, Baljet y Shinoda; Ausencia (-) de antraquinonas, terpenos y esteroides, antocianinas, saponinas.

III.3 Ensayo microbiológico

Tabla 3. Promedio de mediciones de los halos de inhibición (mm) del extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi)

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm				
	Control negativo (Etanol 96%)	25%	50%	75%	Control positivo (Ciprofloxacino 5ug)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	6	7.86	8.90	10.65	39.89
	6	7.87	8.95	10.64	39.88
	6	7.81	8.91	10.61	39.90
	6	7.86	8.96	10.64	39.91
	6	7.84	8.93	10.62	39.90
	6	7.79	8.95	10.60	39.87
	6	7.80	8.91	10.67	39.92
	6	7.82	8.92	10.63	39.90
	6	7.85	8.94	10.68	39.94
	6	7.89	8.96	10.69	39.95
Media	6	7.83	8.93	10.64	39.90

La escala interpretativa según Duraffourd y Lapraz (1983) considera como (-) Nula: al diámetro (< 8 mm), (+) Sensible bajo: diámetro (8 - 14 mm), (++) Medio (muy sensible): diámetro (14 - 20 mm) y (+++) Sumamente sensible: cuando el diámetro (> 20 mm)

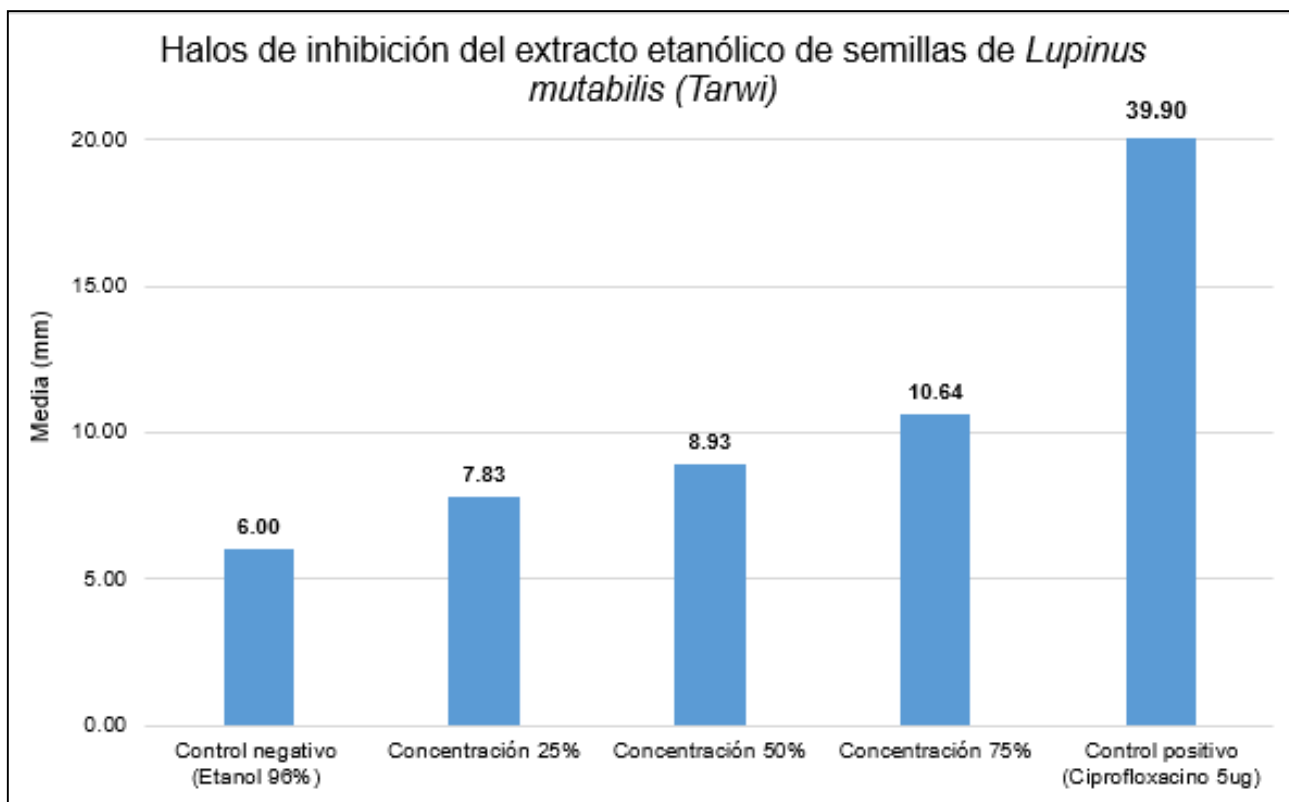


Figura 1. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi)

En la tabla 3 y figura 1 se evidenciaron los promedios de halos de inhibición (mm) del ensayo antibacteriano del extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi).

Según la escala interpretativa en mención, la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, tanto para el control negativo (Etanol 96%) como en la concentración del 25% se muestran valores menores a 8mm, por lo que se entiende que no hay actividad antibacteriana (nula), por otro lado, en las concentraciones del 50% y 75% la cepa presenta una sensibilidad baja con 8.93 mm y 10.64 mm respectivamente. Por otro lado, para el control positivo denominado como Ciprofloxacino 5ug, la cepa fue sumamente sensible con un valor de 39.90 mm.

III.4 Contrastación de hipótesis

Para realizar el estudio sobre la determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) al 25%, 50% y 75% frente *Escherichia coli* ATCC 25922, además de ello se utilizaron controles de tipo positivo como el Ciprofloxacino 5ug y control negativo, etanol 96%, cada uno de ellos con 10 repeticiones por grupo.

III.4.1. Contrastación de hipótesis general

H0: El extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) no presenta actividad antibacteriana significativamente favorable sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

H1: El extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) presenta actividad antibacteriana significativamente favorable sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922

Para contrastar la hipótesis presente, se realizó los análisis estadísticos descriptivos para cada grupo de investigación con la cepa bacteriana, se evidenció que todos los resultados obtenidos se encuentran dentro de los límites de confianza.

En la tabla 4, se observó que para la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, el control negativo (Etanol 96%) no tiene actividad antibacteriana, con una media de $6.00 \pm 0,00000$. Considerando la escala de Duraffourd, se observó que la concentración del extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) al 25%, obtuvo una sensibilidad nula con una medida de $7,8390 \text{ mm} \pm 0,03281$; por otro lado, al 50% y 75% se muestra una sensibilidad baja con una medida de $8,9330 \pm 0,02214$ y $10,6430 \pm 0,02983$ mm respectivamente; además, la cepa es sumamente sensible para el control positivo Ciprofloxacino 5ug ($39,9060 \pm 0,02503$ mm).

Decisión: El extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) posee actividad antibacteriana al 50% y 75% frente a la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922

Tabla 4. Estadísticos descriptivos de la actividad antibacteriana del extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922

95% de intervalo de confianza para la media									
		N	Media	Desviación estándar	Error estándar	Límite inferior	Límite superior	Mínimo	Máximo
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Control negativo (Etanol 96%)	10	6,0000	0,00000	,00000	6,0000	6,0000	6,00	6,00
	Ext. 25%	10	7,8390	,03281	,01038	7,8155	7,8625	7,79	7,89
	Ext. 50%	10	8,9330	,02214	,00700	8,9172	8,9488	8,90	8,96
	Ext. 75%	10	10,6430	,02983	,00943	10,6217	10,6643	10,60	10,69
	Control positivo (Ciprofloxacino 5ug)	10	39,9060	,02503	,00792	39,8881	39,9239	39,87	39,95

III.4.2. Contrastación de hipótesis específica

- Hipótesis específica 1:

H0: El extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) no presenta metabolitos secundarios activos

H1: El extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) presenta metabolitos secundarios activos

Para contrastar la presente hipótesis, se realizó la Marcha Fitoquímica siguiendo el Método de Olga Lock, se determinó en base al fundamento de coloración y precipitación en los tubos de ensayo, en relación a la presencia y ausencia de metabolitos en la especie vegetal, se identificó los metabolitos secundarios con actividad antibacteriana, en la Tabla 2, se evidenció el cambio evidente de color que corresponde a los alcaloides según el reactivo Dragendorff (+++), seguido de otros metabolitos como los Taninos (+++).

La presencia de estos metabolitos secundarios guarda relación con la actividad biológica antibacteriana del extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi).

Decisión: Se rechazó la hipótesis nula (H0) que indica que el extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) no posee metabolitos secundarios con actividad antibacteriana.

III.4.2. Contrastación de hipótesis específica 2

H0: El extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) no presenta actividad antibacteriana in vitro sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 en concentraciones al 25%, 50% y 75%.

H1: El extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) presenta actividad antibacteriana in vitro sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 en concentraciones al 25%, 50% y 75%.

Para contrastar la hipótesis específica 2, se utilizó el estadístico de ANOVA para comparar las varianzas entre las medias de los diferentes grupos en estudio el cual comprende al extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) al 25%, 50% y 75% control positivo (Ciprofloxacino 5ug) y control negativo (Etanol 96%), asimismo un estadístico para comparaciones múltiples denominado la prueba de Tukey con la cual se eligió el mejor tratamiento.

Tabla 5. Pruebas de ANOVA de los halos obtenidos frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922

		ANOVA				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Entre grupos	8078,169	4	2019,542	3274933,325	0,000
	Dentro de grupos	0,028	45	0,001		
	Total	8078,197	49			

La prueba de ANOVA permitió analizar diferencias entre los grupos en investigación respecto a sus promedios. Al observar el resultado $p < 0.05$ (sig) en la tabla 5, se evidenció que existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados, por lo tanto, para determinar qué medias son estadísticamente diferentes se aplicó pruebas POST HOC, como la prueba de Tukey.

La prueba de Tukey permitió realizar comparaciones múltiples, la tabla 6 evidenció $p < 0.05$ en las comparaciones entre el control positivo (Ciprofloxacino 5ug) favoreciendo al grupo Ciprofloxacino 5ug. Esto es evidencia de que los grupos 25 %, 50 % y 75 % no superaron el efecto inhibitor del Ciprofloxacino 5ug frente *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabla 6. Comparaciones múltiples de los halos de inhibición de *Escherichia coli* ATCC 25922 – Prueba de TUKEY.

Comparaciones múltiples						
(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Ciprofloxacino 5ug	Etanol 96%	33,90600*	0,01111	0,000	33,8744	33,9376
	25 %	32,06700*	0,01111	0,000	32,0354	32,0986
	50%	30,97300*	0,01111	0,000	30,9414	31,0046
	75%	29,26300*	0,01111	0,000	29,2314	29,2946
Etanol 96%	Ciprofloxacino 5ug	-33,90600*	0,01111	0,000	-33,9376	-33,8744
	25 %	-1,83900*	0,01111	0,000	-1,8706	-1,8074
	50%	-2,93300*	0,01111	0,000	-2,9646	-2,9014
	75%	-4,64300*	0,01111	0,000	-4,6746	-4,6114

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

Por otro lado, se muestra que los valores de significancia asintótica bilateral son menores al 0.05 en las comparaciones entre el control negativo (Etanol 96%) y los grupos experimentales en el ensayo microbiológico con la cepa bacteriana *Escherichia coli* ATCC 25922. Esto es evidencia de que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo 25 %, 50% y 75 % de experimentación y el control negativo (Etanol 96%).

Tabla 7. Prueba de subconjuntos de Tukey para *Escherichia coli* ATCC 25922

<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922						
HSD Tukey^a						
Grupo	N	Subconjunto para alfa = 0.05				
		1	2	3	4	5
Etanol 96%	10	6,0000				
25 %	10		7,8390			
50%	10			8,9330		
75%	10				10,6430	
Ciprofloxacino 5ug	10					39,9060
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.						
a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 10,000.						

En la tabla 7, se evidenció que los promedios de los diferentes grupos fueron heterogéneos, asimismo se observó mayor inhibición a concentraciones mayores. Las concentraciones de 50 % y 75% poseen mayores diámetros aceptables según la escala de Duraffourd y Lapraz, evidenciando como resultados halos de 8,93 mm y 10,64 mm (sensibilidad baja) respectivamente. Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula (H0).

Decisión: El extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) al 50 % y 75% poseen efecto inhibitorio frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

- Hipótesis específica 3:

H0: La actividad antibacteriana del extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) no es mayor comparado con fármaco de referencia sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

H1: La actividad antibacteriana del extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) es mayor comparado con fármaco de referencia sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922

En la Tabla 7, se evidenció para la cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, que las medias de los diámetros a diferentes concentraciones son inferiores a los obtenidos por el control positivo y/o fármaco de referencia (Ciprofloxacino 5ug), ello indica que el bactericida utilizado como control positivo tienen mayor diámetro de inhibición. Por lo tanto, no se rechaza la Hipótesis nula (H0).

Decisión: La susceptibilidad antibacteriana de cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 frente al extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) al 25%, 50% y 75% no presentan mayor inhibición comparado con el fármaco de referencia (Ciprofloxacino 5ug).

IV. DISCUSIÓN

IV.1 Discusión de resultados

La enfermedad diarreica e infección del tracto urinario siguen siendo preocupantes en todo el mundo, así como para todas las personas de los diferentes géneros y edades, con el pasar del tiempo se ha ido implementando nuevos manejos y estrategias para mitigar esa enfermedad, siendo los tratamientos fitoterapéuticos o herbolarios aceptados en los profesionales de la salud, quienes investigan distintas plantas con propiedades en la medicina, así como el poder farmacológico de estas. En relación con esto, la presente investigación tuvo por objetivo determinar la actividad antibacteriana in vitro el extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi) sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

En la primera hipótesis específica, respecto al ensayo del tamizaje fitoquímico fueron los alcaloides y taninos los principales metabolitos con mayor presencia y menor presencia para compuestos fenólicos y flavonoides, estos resultados guardan relación con el estudio de Al-Amrousi E, *et al.* (2022), quienes identificaron la presencia de compuestos fenólicos en las semillas del Tarwi, no obstante, a pesar de encontrar similitud en los resultados, hubieron diferencias en relación al solvente usado en la extracción el cual comprende de etanol de 96° para el presente estudio y de éter de petróleo para el estudio de Al-Amrousi E, *et al.* presentando un potencial agente biológico (27).

De igual importancia, guarda relación con el estudio realizado por Castillejo E y Trujillo C (2020) quienes evidenciaron la presencia de alcaloides, compuestos fenólicos, azúcares reductores en muestras del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi), los hallazgos encontrados confirman la presencia de metabolitos activos el cual a pesar de ser muestras de diferentes partes del Perú como Huánuco en el presente estudio y de Ancash el estudio de Castillejo y Trujillo, esto no fue un indicador para que existan diferencias en los metabolitos secundarios encontrados en ambos estudios (28).

En la segunda hipótesis específica, en el ensayo microbiológico se evidenció que las concentraciones al 25%, 50% y 75% del extracto evidenciaron halos de inhibición de 7.83; 8.93 y 10.64 mm respectivamente, estos resultados presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los grupos experimentales 25%, 50% y 75% según la prueba de Tukey, sin embargo, realizando la contrastación según la escala interpretativa de Duraffourd y Lapraz (1983), se considera nula el diámetro del halo de inhibición menor de 8 mm, sensible bajo si es de 8 - 14 mm, muy sensible de 14 - 20 mm y sumamente sensible si el diámetro es mayor de 20 mm, por lo que se evidenció sensibilidad nula al grupo experimental 25%, dado que el halo fue de 7.83 mm el cual no supera el halo mínimo aceptable que corresponde de 8.00 mm. Finalmente, los halos del 50% y 75% fueron considerados con una sensibilidad baja debido a que superaron el valor mínimo aceptable, por lo tanto los grupos con actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) frente cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, fueron al 50% y 75%. El mismo que guarda relación con el estudio de Buszewski B, et al. (2019), quienes al evaluar la capacidad antibacteriana de Tarwi, hallaron que inhibió el crecimiento de bacterias patógenas como *Pseudomona aureginosa* evidenciando que presenta dicha actividad en el extracto de semillas de *Lupinus luteus*, a pesar de que se muestran resultados semejantes, los estudios tuvieron diferencias de acuerdo al uso del tipo de solvente para la maceración, el cual corresponde etanol de 70°, no obstante, estas diferencias no alteraron en la existencia de la actividad antibacteriana (25).

Otra investigación de gran importancia fue realizada por Romeo F, et al. (2018) quienes evidenciaron actividad antibacteriana de los alcaloides aislados de semillas de tres especies del género *Lupinus*, por medio de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrómetro de masas, esta actividad biológica fue efectiva contra las cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*, evidenciando que los alcaloides del género *Lupines* tienen actividad antibacteriana (26).

En la tercera hipótesis específica en el ensayo microbiológico se evidenció que las concentraciones al 25%, 50% y 75% del extracto etanólico mostraron halos de inhibición de 7.83; 8.93; 10.64 mm respectivamente frente al 39,90 que posee el Ciprofloxacino 5ug, asimismo estos resultados presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en los grupos experimentales 25%, 50% y 75% según la prueba de Tukey, el cual fue a favor del grupo control positivo denominado como Ciprofloxacino 5ug, evidenciando que ninguno de los halos de inhibición presentes, superaron el efecto inhibitor del fármaco de referencia Ciprofloxacino 5ug. Esto se debería a que el Ciprofloxacino 5ug se utiliza de manera estandarizada y conocida para mitigar infecciones gastrointestinales y urinarias causadas por bacterias como *Escherichia coli*.

Estos resultados son semejantes al estudio de Álvarez L y Bellido J (2022), quienes analizaron el efecto antibacteriano de las semillas de Tarwi frente a *Escherichia coli* al 20%, 30% y 40% evidenciando que las concentraciones experimentales no superaron el efecto antibacteriano del fármaco de referencia y/o control positivo usado Ciprofloxacino 150 mg/mL (29).

Así mismo guarda relación con la investigación realizada por Pauro, J (2020) quienes manifestaron que a pesar de que las decocciones de hojas, flores y semillas de Tarwi (*Lupinus mutabilis Sweet*) poseen la capacidad de inhibir, estas concentraciones, estas no superan al fármaco empleado como referencia (Eritromicina), no obstante, a pesar de que los resultados guardan relación, existe diferencias en relación con los extractos empleados y con el fármaco positivo de referencia. (29).

El Tarwi conocido en la región andina como parte de la alimentación, no solo presenta bondades nutricionales, sino que, debido a los resultados en la presente investigación de tipo antimicrobiano, esto contribuye a ser considerado como un superalimento que debe ser difundido a nivel nacional por parte de investigadores y el estado el cual corresponde a uno de sus objetivos el de velar por la salud de su población.

IV.2 Conclusiones

- El extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet (Tarwi)* presenta actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.
- Los metabolitos secundarios que se identificaron mediante la marcha fitoquímica del extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet (Tarwi)* fueron los alcaloides y taninos, estos serían los responsables de la actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.
- La concentración del extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet (Tarwi)* que posee efecto antibacteriano fueron del 50% y 75%.
- El extracto etanólico de semillas de *Lupinus mutabilis Sweet (Tarwi)* a las concentraciones del 25%, 50% y 75% no superaron el efecto inhibitor del Ciprofloxacino 5ug frente cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

IV.3 Recomendaciones

- Realizar investigaciones para validar la efectividad del *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi), como potencial sustancia antibacteriana frente a otras cepas de interés de salud pública.
- Iniciar estudios farmacológicos para validar el grado de efectividad de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi), frente a diversos ensayos experimentales y su implicancia de aporte en la farmacoterapia.
- Realizar investigaciones sobre la estructura fitoquímica de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi), empleando conocimientos cromatográficos logrando de esta manera aislar metabolitos secundarios con potenciales efectos biológicos.
- Realizar comparaciones del efecto antimicrobiano de *Lupinus mutabilis Sweet* (Tarwi) procedentes de diferentes regiones del Perú, puesto que los factores ambientales juegan un rol de impacto en la presencia y actividad de los metabolitos activos en las plantas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rotheram S, Cooper J, Barr B, Whitehead M. How are inequalities generated in the management and consequences of gastrointestinal infections in the UK? An ethnographic study. *Soc Sci Med* [Internet]. 2021;282:1–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0277953621004639#:~:text=The study shows how the,likelihood of co-morbidities which>
2. Adams N, Rose T, Hawker J, Violato M, O'Brien S, Barr B, et al. Relationship between socioeconomic status and gastrointestinal infections in developed countries: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* [Internet]. 2018;13(1):1–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29360884/>
3. Contreras R, Escorcía A, Velarde J. Prevalence and impact of antimicrobial resistance in gastrointestinal infections: A review. *Rev Gastroenterol México (English Ed)* [Internet]. 2021;86(3):265–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34158260/>
4. Khalil I, Troeger C, Blacker B, Rao P, Brown A, Atherly D, et al. Morbidity and mortality due to shigella and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhoea: the Global Burden of Disease Study 1990–2016. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2018;18(11):1229–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30266330/>
5. Bezabih Y, Sabiiti W, Alamneh E, Bezabih A, Peterson G, Bezabhe W, et al. The global prevalence and trend of human intestinal carriage of ESBL-producing *Escherichia coli* in the community. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2021;76(1):22–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33305801/>
6. Alqasim A, Abu Jaffal A, Alyousef A. Prevalence of multidrug resistance and extended-spectrum β -Lactamase carriage of clinical uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Riyadh, Saudi Arabia. *Int J Microbiol* [Internet]. 2018;1–9. Available from:

<https://www.hindawi.com/journals/ijmicro/2018/3026851/>

7. Borujerdi S, Ardakani M, Rezatofghi S. Characterization of diarrheagenic escherichia coli strains associated with diarrhea in children, Khuzestan, Iran. *J Infect Dev Ctries* [Internet]. 2018;12(8):649–56. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31958328/>
8. Margulieux K, Srijan A, Ruekit S, Nobthai P, Poramathikul K, Pandey P, et al. Extended-spectrum β -lactamase prevalence and virulence factor characterization of enterotoxigenic *Escherichia coli* responsible for acute diarrhea in Nepal from 2001 to 2016. *Antimicrob Resist Infect Control* [Internet]. 2018;7(87):1–7. Available from: <https://aricjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13756-018-0377-2#citeas>
9. Getaneh D, Hordofa L, Ayana D, Tessema T, Regassa L. Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and associated factors in under-five children in Eastern Ethiopia. *PLoS One* [Internet]. 2021;16(1):1–15. Available from: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33508023/#:~:text=Conclusion%3A The Prevalence of E,and hygiene in a household.](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33508023/#:~:text=Conclusion%3A%20The%20Prevalence%20of%20E%2Cand%20hygiene%20in%20a%20household.)
10. Falup-Pecurariu O, Lixandru R, Cojocaru E, Csutak K, Monescu V, Muhsen K, et al. Shiga toxin producing *Escherichia coli*-associated diarrhea and hemolytic uremic syndrome in young children in Romania. *Gut Pathog* [Internet]. 2019;11(1):1–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31572497/>
11. Cho S, Hiott L, Barrett J, McMillan E, House S, Humayoun S, et al. Prevalence and characterization of *Escherichia coli* isolated from the upper oconee watershed in Northeast Georgia. *PLoS One* [Internet]. 2018;13(5):1–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29738574/>
12. Pakbin B, Brück W, Brück T, Allahyari S, Ashrafi I. A quantitative prevalence of *Escherichia coli* O157 in different food samples using real-time qPCR method. *Food Sci Nutr* [Internet]. 2022;1–8. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/fsn3.3055>

13. CDC-PERÚ. Situación epidemiológica de las Enfermedades Diarreicas Agudas (EDA) en el Perú, 2019. Boletín Epidemiológico del Perú [Internet]. 2020;29(1):5–10. Available from: <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2019/04.pdf>

14. Huayanay C, Aldoradin V, Santa A. Presencia de *Escherichia coli* en la playa Pucusana , Lima , y su potencial efecto en la salud pública. Acta Medica Peru [Internet]. 2022;39(1):31–9. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172022000100031#:~:text=Resultados%3A,peruana la calificación es inaceptable.

15. Nji E, Kazibwe J, Hambridge T, Joko CA, Larbi A, Dampthey L, et al. High prevalence of antibiotic resistance in commensal *Escherichia coli* from healthy human sources in community settings. Sci Rep [Internet]. 2021;11(1):1–11. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-82693-4>

16. Devi L, Broor S, Rautela R, Grover S, Chakravartil A, Chattopadhyya D. Increasing Prevalence of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Producing CTX-M-Type Extended-Spectrum Beta-Lactamase, Carbapenemase, and NDM-1 in Patients from a Rural Community with Community Acquired Infections: A 3-Year Study. Int J Appl Basic Med Res [Internet]. 2020;10(3):156–63. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7534723/>

17. Quispe C, Romero D. Contaminacion con *Escherichia coli* en tipos de aderezos expendidos en puestos de comida de un mercado de Huancayo-2020 [Internet]. Universidad Peruana Los Andes; 2021. Available from: <https://repositorio.upla.edu.pe/handle/20.500.12848/3116>

18. Moreno M. Efecto antibacteriano in vitro de extractos etanólicos de orégano, tomillo y salvia sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* con resistencia múltiple [Internet]. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo; 2020. Available from: <https://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/8421#:~:text=Se concluyó que los extractos,susceptibles a los tres extractos>

19. Pakbin B, Brück W, Rossen J. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *Int J Mol Sci*. 2021;18(1):1–10.
20. Knoll K, Lindeque Z, Adeniji A, Oosthuizen C, Lall N, Loots D. Elucidating the Antimycobacterial Mechanism of Action of Ciprofloxacin Using Metabolomics. *Microorganisms*. 2021;6(1):1–10.
21. Taco N, Zúñiga D. Effect of inoculation of Tarwi plants with *Bradyrhizobium* spp. Strains isolated from a wild lupine, under greenhouse conditions. *Rev Peru Biol* [Internet]. 2020;27(1):35–42. Available from: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1727-99332020000100035&script=sci_abstract&tlng=pt
22. Ubillus M. Componentes morfoagronomicos, rendimiento de grano seco y grano desamargado de variedades y ecotipos de *Lupinus mutabilis* Sweet en Marcará-Ancash [Internet]. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2021. Available from: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/20.500.12996/5178>
23. Arellano A. Análisis nutricional y actividades biológicas de compuestos bioactivos derivados del chocho (*Lupinus Mutabilis*) [Internet]. Universidad Técnica de Ambato; 2022. Available from: <https://repositorio.uta.edu.ec/handle/123456789/34918>
24. Bastidas M. Evaluación de la eficiencia de precipitación de los alcaloides procedentes del *Lupinus mutabilis* por el método de Mayer en la Universidad Técnica de Cotopaxi Campus Salache periodo 2021-2022 [Internet]. Universidad Técnica de Cotopaxi; 2022. Available from: <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/8542>
25. Buszewski B, Rafińska K, Cvetanović A, Walczak J. Phytochemistry Letters Phytochemical analysis and biological activity of *Lupinus luteus* seeds extracts obtained by supercritical fluid extraction. *Phytochem Lett* [Internet]. 2019;30:338–48. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1874390018303756>
26. Romeo F, Fabroni S, Ballistreri G, Muccilli S, Spina A, Rapisarda P. Characterization and antimicrobial activity of alkaloid extracts from seeds of

- different genotypes of *Lupinus* spp. Sustain [Internet]. 2018;10(3):6–10.
Available from: <https://www.mdpi.com/2071-1050/10/3/788>
27. Al-Amrousi E, Badr A, Abdel-Razek A, Gromadzka K, Drzewiecka K, Hassanein M. A Comprehensive Study of Lupin Seed Oils and the Roasting Effect on Their Chemical and Biological Activity. *Plants* [Internet]. 2022;11(17):1–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36079681/>
 28. Castillejo E, Trujillo C. Efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de semillas de “*Lupinus mutabilis* Sweet” (Chocho) frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 [Internet]. Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2020. Available from: <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/5595>
 29. Alvarez L, Bellido J. Efecto antibacteriano del extracto acuoso de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Chocho) frente a la cepa de *Escherichia coli* ATCC 8739 [Internet]. Universidad Roosevelt; 2022. Available from: <https://repositorio.uroosevelt.edu.pe/handle/20.500.14140/894>
 30. Pauro J. Efecto antibacteriano y antifúngico de decocciones de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) en *Escherichia coli* y *Candida albicans* [Internet]. Universidad Nacional del Altiplano; 2020. Available from: <https://repositorioslatinoamericanos.uchile.cl/handle/2250/3276894?show=full>
 31. Taipe A. Evaluación del efecto de *Bradyrhizobium* en rendimiento y capacidad simbiótica en dos variedades de tarwi (*Lupinus mutabilis*) en Buenavista-Lircay [Internet]. Universidad para el Desarrollo Andino; 2021. Available from: <http://repositorio.udea.edu.pe/handle/UDEA/148>
 32. Hilarión G. Susceptibilidad antimicrobiana de Cepas *Escherichia Coli* O157:H7 y *Escherichia Coli* Enteropatógena aislada en niños menores de cinco años con diarrea [Internet]. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2020. Available from: <https://repositorio.upch.edu.pe/handle/20.500.12866/8208>

33. Baena G. Metodología de la Investigación. 3 ed. Grupo Editorial Patria; 2017. 141 p.
34. Guerrero G, Guerrero M. Metodología de la Investigación. 4 ed. Mexico: Grupo Editorial Patria; 2014.
35. Hernandez R, Mendoza C. Metodología de la Investigación. Ciudad de México: Mc Graw Hill; 2018. 714 p.
36. Cortez K, Mego L. Actividad antibacteriana in vitro del extracto hidroalcohólico de las vainas de *Caesalpinia spinosa* "Taya", frente a *Streptococcus mutans* [Internet]. Universidad Privada Antonio Guillermo Urrelo; 2017. Available from: <http://repositorio.upagu.edu.pe/handle/UPAGU/458>
37. Gallardo E. Metodología de la Investigación. 1 ed. Huancayo: Universidad Continental; 2017. 96 p.
38. Quispe Z. Efecto biocida del extracto hidroalcohólico de semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet "tarwi" sobre larvas de *Culex quinquefasciatus* Say "zancudo". Ayacucho, 2013 [Internet]. Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga; 2017. Available from: https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNSJ_f4625712693de973ad7d9485adaa0809
39. Alvia C, Olortegui A. Efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico del fruto de *Solanum sessiliflorum* (cocona) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* [Internet]. Universidad Maria Auxiliadora; 2022. Available from: <https://repositorio.uma.edu.pe/handle/20.500.12970/786>
40. Lock O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. 3rd ed. Lima: Pontificia universidad catolica del Perú; 2016. 287 p.
41. Peve B, Rosales C. Efecto antibacteriano in vitro del extracto etanolico de *Syzygium aromaticum* L. (Clavo de olor) sobre *Escherichia coli* ATCC 25922 [Internet]. Universidad Maria Auxiliadora; 2022. Available from: <https://repositorio.uma.edu.pe/handle/20.500.12970/1113>

42. Djabayan P, Gonzalez L, Lucena M, Valarezo M. Aislamiento y actividad biológica de lectinas obtenidas de semillas de frutas, granos y tubérculos de plantas andinas. *Inf Tecnol* [Internet]. 2022;33(2):21–36. Available from: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642022000200021&lng=es&nrm=iso&tlng=es
43. Ramirez R, Soto R. Efecto antibacteriano del aceite esencial de las hojas de molle (*schinus molle* l.) frente a cepas de *escherichia coli*” in vitro [Internet]. Universidad Inca Garcilaso de la Vega; 2018. Available from: <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/2891>

ANEXOS

ANEXO A: Instrumentos de recolección de datos

ENSAYO MICROBIOLÓGICO

N°	Frente a <i>E. coli</i> ATCC 25922				
	Control	Ciprofloxacino 5 µg	Ext 25 %	Ext 50 %	Ext 75 %
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

Tabla B: Prueba de Tamizaje Fitoquímico

IDENTIFICACION DE METABOLITOS SECUNDARIOS		
Metabolitos secundarios	Reactivos	Resultado
Quinonas	Borntrager	
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	
Flavonoides	Shinoda	
Antocianinas	NaOH 10%	
Taninos	Gelatina	
Taninos	Gelatina Sal	
Alcaloides	Dragendorff	
Alcaloides	Wagner	
Alcaloides	Mayer	
Triterpenos y Esteroides	Liebermann Burchard	
Lactonas α , β insaturadas	Baljet	
Saponinas	Espuma	

Leyenda:

- (-) Ausente
- (+) Escaso
- (++) Leve
- (+++) Moderado
- (++++) Abundante

Tabla C: Ensayo de Solubilidad

TUBO	SOLVENTES	RESULTADOS
N° 1	Éter de petróleo	
N° 2	Diclorometano	
N° 3	Cloroformo	
N° 4	Butanol	
N° 5	Etanol de 70°	
N° 6	Metanol	
N° 7	Agua destilada	
N° 8	Dimetilsulfóxido	

Leyenda:

Insoluble: (-)

Poco soluble: (+)

Medianamente soluble: (++)

Muy soluble: (+++)

ANEXO B: Matriz de consistencia CIORREGIR

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis
Problema General	Objetivo General	Hipótesis General
¿Presentará actividad antibacteriana in vitro el extracto etanólico de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Tarwi) sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922?	Determinar actividad antibacteriana in vitro el extracto etanólico de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Tarwi) sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.	El extracto etanólico de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Tarwi) presenta actividad antibacteriana significativamente favorable sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.
Problemas Específicos	Objetivos Específicos	Hipótesis Específicas
¿Qué metabolitos secundarios activos se encontrarán en el extracto etanólico de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Tarwi)?	Identificar los metabolitos secundarios activos que se encuentran en el extracto etanólico de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Tarwi)	El extracto etanólico de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Tarwi) presentametabolitos secundarios activos
¿El extracto etanólico de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Tarwi) tendrá actividad antibacteriana in vitro sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en la concentración del 25%, 50 y 75%	Evaluar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Tarwi) sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en la concentración del 25%, 50 y 75%	El extracto etanólico de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Tarwi) presenta actividad antibacteriana in vitro sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en la concentración del 25%, 50 y 75%
¿Cuál es la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Tarwi) comparado con fármaco de referencia sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922?	Comparar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Tarwi) con fármaco de referencia sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	La actividad antibacteriana del extracto etanólico de semillas de <i>Lupinus mutabilis Sweet</i> (Tarwi) es mayor comparado con fármaco de referencia sobre cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922

Anexo C. Operacionalización de las variables

VARIABLES	DIMENSIONES	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN	VALOR
<p>VARIABLE INDEPENDIENTE</p> <p>Extracto etanólico de semillas de <i>Lupinus mutabilis</i> Sweet (Tarwi)</p>	<p>Ensayo fitoquímico</p>	<p>Marcha fitoquímica</p>	<p>Ordinal</p>	<p>(-) Ausente (+) Leve (++) Moderado (+++) Abundante</p>
<p>VARIABLE DEPENDIENTE</p> <p>Actividad antibacteriana in vitro frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p>	<p>Ensayo microbiológico</p>	<p>Medición de diámetro inhibición (mm)</p>	<p>Razón</p>	<p><8 mm: nulo (-) 8 – 14 mm: Sensible (+) 14 – 20 mm: Muy sensible (++) >20 mm: Sumamente sensible (+++)</p>

ANEXO D. Certificado Taxonómico



CERTIFICACION DE IDENTIFICACION BOTANICA

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA CRUZ, BIÓLOGO COLEGIADO, CBP 3796 - INSCRITO EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIONES DE IDENTIFICACION TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N.º 031-2013-MINAGRI-DOFFS-DOFFTS.

CERTIFICA:

Que, las bachilleres **ROJAS CALDERON, FIORELLA YOHANA y POMA ZANABRIA, KARINA**. Tesisistas de la Universidad María Auxiliadora. Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. Para desarrollar el proyecto de tesis titulado: "EFECTO ANTIBACTERIANO in vitro DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE SEMILLAS DE *Lupinus mutabilis* (tarwi) FRENTE A *Echerichia coli* ATCC 25922, han solicitado la identificación y certificación botánica de una planta procedente de la Comunidad Campesina de Uñas, distrito de Huancayo, provincia de Huancayo, departamento de Junín, donde es conocida con el nombre vulgar de "tarwi"; la muestra ha sido identificada como *Lupinus mutabilis* Sweet. Según la base de W³Tropicos del Missouri Botanical Garden que sigue el sistema moderno de clasificación de las angiospermas (APG), la especie identificada se ubican en las siguientes categorías taxonómicas y clados:

Reino: Plantae

División: Angiospermae

Clase: Equisetopsida

Subclase: Magnoliidae

Superorden: Rosanae

Orden: Fabales

Familia: Fabaceae

Género: *Lupinus*

Especie: *Lupinus mutabilis* Sweet

Nombre vulgar: "tarwi"

Se expide la presente certificación con fines de investigación científica.

Lima, 21 de octubre del 2022



Jr. Sánchez Silva 156 – Piso 2–Urb. Santa Luzmila –Lima 07 -Lima

ANEXO E. Informe de análisis de laboratorio



"Año del Fortalecimiento de la Soberanía Nacional".

Informe de Resultados

Solicitado por: Rojas Calderón, Fiorella
Poma Zanabria, Karina
Muestra: Extracto de semillas de *Lupinus mutabilis*
Cantidad: 20.1 gr
Fecha de ensayo: 03-11-2022

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm				
	75%	50%	25%	Ciprofloxacino 5ug	Etanol 96%
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	10.65	8.90	7.86	39.89	6
	10.64	8.95	7.87	39.88	6
	10.61	8.91	7.81	39.90	6
	10.64	8.96	7.86	39.91	6
	10.62	8.93	7.84	39.90	6
	10.60	8.95	7.79	39.87	6
	10.67	8.91	7.80	39.92	6
	10.63	8.92	7.82	39.90	6
	10.68	8.94	7.85	39.94	6
	10.69	8.96	7.89	39.95	6

*Tamaño de discos: 6mm, por lo que al reportarse 6mm es indicativo que no existe formación halo de inhibición

*Concentración del inóculo: 1.5×10^8 UFC/mL

Lic. T.M. Walter A. Sirj Rodríguez

CTMP. 10808

Jr. Comercio N° 597 Pachacámac Telf. 2311053 Cel. 941708196- 993446913

ANEXO F. Certificado de Agar Mueller Hinton



Certified : ISO 9001:2015, ISO 13485:2012 , WHO GMP

HiMedia Laboratories Private Limited
 23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg,
 Mumbai - 400086 , Website : www.himedialabs.com,
 Email : info@himedialabs.com

Certificate of Analysis, Quality and Conformity

Material Code : M173	Material Name : Mueller Hinton Agar	Lot No : 0000357521
Report No.: 040000849057	Date of Release & Report : 2018-09-24	Expiry Date : 2023-09

Appearance

Cream to yellow homogeneous free flowing powder . Observed : Light yellow

Gelling

Firm, comparable with 1.7% agar gel.

Colour and Clarity of prepared medium

Light amber coloured clear to slight opalescent gel forms in Petri plates.

Reaction

Reaction of 3.8% w/v aqueous solution at 25°C.

pH

pH Range :7.20-7.40 Observed : 7.39

Cultural Response

Cultural characteristics observed after incubation at 30-35°C for 18 -24 hours for bacterial cultures. For testing *S.pneumoniae* : The medium was supplemented with 5% Sheep blood and incubated at 35°C for 16-18 hours at 5% CO2 For testing *H.influenaze* : Yeast extract & 2 vials /l of Haemophilus Growth Supplement (FD117 containing 15 mg/l of Haematin + 15 mg/l of NAD) and incubated at 35°C for 20-24 hours at 5% CO2

Antibiotic Sensitivity test

Various discs were tested for standard ATCC strains and zone of inhibition were measured after an incubation 30-35°C for 18 hours. (As per the latest CLSI Protocol M6 & Standards as per the current CLSI M100)

Thymine/Thymidine Content

The zones for these discs are indicative of the Thymine/Thymidine content of the medium.

Divalent Cation Content

* The zones for these discs are indicative of the Divalent Cation content of the medium

Organism	Inoculum (CFU)	Growth	Observed Lot value (CFU)	Recovery	Standard Zone	Zone of inhibition Observed
Escherichia coli ATCC 25922						
<i>Growth promoting</i>	85	luxuriant	72	84%	-	-
<i>Amoxiclav AMC 30 mcg</i>	-	-	-	-	18-24 mm	22mm
<i>Ampicillin AMP 10 mcg</i>	-	-	-	-	16-22 mm	21mm
<i>Cefotaxime CTX 30 mcg</i>	-	-	-	-	29-35 mm	33mm
<i>Cefoxitin CX 30 mcg</i>	-	-	-	-	23-29 mm	28mm
<i>Cephalothin CEP 30mcg</i>	-	-	-	-	15-21 mm	20mm

HiMedia Laboratories Private Limited

 23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg,
 Mumbai - 400086 , Website : www.himedialabs.com,
 Email : info@himedialabs.com

Certificate of Analysis, Quality and Conformity

Material Code : M173	Material Name : Mueller Hinton Agar	Lot No : 0000357521
Report No.: 040000849057	Date of Release & Report : 2018-09-24	Expiry Date : 2023-09

<i>Chloramphenicol C 30 mcg</i>	-	-	-	-	21-27 mm	26mm
<i>Ciprofloxacin CIP 5mcg</i>	-	-	-	-	30-40 mm	38mm
<i>Gentamicin GEN 10 mcg</i>	-	-	-	-	19-26 mm	24mm
<i>Sulphafurazole SF 300 mcg</i>	-	-	-	-	15-23 mm	21mm
<i>Tetracycline TE 30 mcg *</i>	-	-	-	-	18-25 mm	24mm
<i>Co-Trimoxazole COT 25 mcg ‡</i>	-	-	-	-	23-29 mm	28mm

Staphylococcus aureus ATCC 25923

<i>Growth promoting</i>	76	luxuriant	64	84%	-	-
<i>Amoxiclav AMC 30 mcg</i>	-	-	-	-	28-36 mm	35mm
<i>Ampicillin/Sulbactam A/S 10/10 mcg</i>	-	-	-	-	29-37 mm	36mm
<i>Cephalothin CEP 30mcg</i>	-	-	-	-	29-37 mm	35mm
<i>Ciprofloxacin CIP 5mcg</i>	-	-	-	-	22-30 mm	29mm
<i>Erythromycin E 15 mcg</i>	-	-	-	-	22-30 mm	28mm
<i>Linezolid LZ 30 mcg</i>	-	-	-	-	25-32 mm	31mm
<i>Oxacillin OX 1mcg</i>	-	-	-	-	18-24 mm	23mm
<i>Pristinamycin RP 15 mcg</i>	-	-	-	-	21-28 mm	27mm
<i>Tetracycline TE 30 mcg *</i>	-	-	-	-	24-30 mm	29mm
<i>Vancomycin VA 30 mcg</i>	-	-	-	-	17-21 mm	20mm
<i>Co-Trimoxazole COT 25 mcg ‡</i>	-	-	-	-	24-32 mm	31mm
<i>Cefoxitin CX 30 mcg</i>	-	-	-	-	23-29 mm	27mm

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853

<i>Growth promoting</i>	83	luxuriant	71	85%	-	-
<i>Amikacin AK 30 mcg *</i>	-	-	-	-	18-26 mm	25mm
<i>Aztreonam AT 3mcg</i>	-	-	-	-	23-29 mm	27mm
<i>Cephotaxime CTX 30 mcg</i>	-	-	-	-	18-22 mm	21mm
<i>Ceftazidime CAZ 30 mcg</i>	-	-	-	-	22-29 mm	27mm
<i>Ciprofloxacin CIP 5mcg</i>	-	-	-	-	25-33 mm	31mm
<i>Gentamicin GEN 10 mcg *</i>	-	-	-	-	16-21 mm	20mm
<i>Imipenem IPM 10 mcg</i>	-	-	-	-	20-28 mm	27mm
<i>Piperacillin PI 100 mcg</i>	-	-	-	-	25-33 mm	31mm
<i>Piperacillin/Clavulanic acid FCC 73/10mcg</i>	-	-	-	-	20-28 mm	27mm
<i>Tobramycin TOB 10 mcg *</i>	-	-	-	-	19-25 mm	23mm

Escherichia coli ATCC 35218

HiMedia Laboratories Private Limited
 23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg,
 Mumbai - 400086 , Website : www.himedialabs.com,
 Email : info@himedialabs.com

Certificate of Analysis, Quality and Conformity

Material Code : M173	Material Name : Mueller Hinton Agar	Lot No : 0000357521
Report No.: 040000849057	Date of Release & Report : 2018-09-24	Expiry Date : 2023-09

<i>Growth promoting</i>	75	luxuriant	63	84%	-	-
<i>Amoxiclav AMC 30 mcg</i>	-	-	-	-	17-22 mm	21mm
<i>Ampicillin AMP 10 mcg</i>	-	-	-	-	6 mm	6mm
<i>Ampicillin/Sulbactam AS 10/10 mcg</i>	-	-	-	-	13-19 mm	18mm
<i>Piperacillin PI 100 mcg</i>	-	-	-	-	12-18 mm	16mm
<i>Piperacillin/Tazobactam PIT 100/10 mcg</i>	-	-	-	-	24-30 mm	29mm
<i>Ticarcillin TI 75 mcg</i>	-	-	-	-	6 mm	6mm
<i>Ticarcillin/Clavulanic acid TCC 75/10mcg</i>	-	-	-	-	21-25 mm	23mm

Enterococcus faecalis ATCC 29212

<i>Growth promoting</i>	69	luxuriant	58	84%	-	-
<i>Co-Trimoxazole COT 25 mcg #</i>	-	-	-	-	# 20 mm (Clear zone)	23mm
<i>Trimethoprim TR 5 mcg #</i>	-	-	-	-	# 20 mm	21mm
<i>Vancomycin VA 30 mcg</i>	-	-	-	-	# 17 mm	22mm

Staphylococcus aureus ATCC 43300 (MRSA)

<i>Growth promoting</i>	88	luxuriant	76	86%	-	-
<i>Oxacillin OX 1 mcg</i>	-	-	-	-	Very Hazy to No Zone	No zone

Streptococcus pneumoniae ATCC 49619 (On Medium with 5% Sheep Blood)

<i>Growth promoting</i>	80	luxuriant	69	86%	-	-
-------------------------	----	-----------	----	-----	---	---

Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226 (Incubated w/5% CO2)

<i>Growth promoting</i>	71	luxuriant	63	88%	-	-
-------------------------	----	-----------	----	-----	---	---

Haemophilus influenzae ATCC 49247 (On medium w/ Y.E., NAD & Hematin)

<i>Growth promoting</i>	84	luxuriant	72	85%	-	-
-------------------------	----	-----------	----	-----	---	---

- . ATCC is a registered trade mark of the American Type Culture Collection
- . NCTC and National Collection of Type Culture are registered trade mark of the Health Protection Agency

Control Media :

- . For Bacteria : Soyabean Casein Digest Agar / Columbia Blood Agar base enriched with 5% v/v Sheep/Horse blood.
- . For Yeast & Mold : Sabouraud Dextrose Agar.

- . All ISO 11133 : 2014(E) control strains are included in the Quality parameter
- . HiMedia Laboratories Pvt Ltd is Certified for ISO 9001:2015, ISO 13485:2012 , WHO GMP

HiMedia Laboratories Private Limited

23, Vadhani Industrial Estate, L.B.S. Marg,
Mumbai - 400086 , Website : www.himedialabs.com,
Email : info@himedialabs.com

Certificate of Analysis, Quality and Conformity

Material Code : M173	Material Name : Mueller Hinton Agar	Lot No : 0000357521
Report No.: 040000849057	Date of Release & Report : 2018-09-24	Expiry Date : 2023-09

. Information for BSE/TSE Risk: The material was subjected to pH \leq 7.0 and/or a temperature in excess of 75°C for no less than 2 hours during the manufacturing process. The bovine raw material for this product was collected entirely from Indian Origin animals in a licensed based establishment. The animals are inspected under a Govt. approved veterinarian's supervision and were apparently free from infectious and contagious diseases. BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy)/ TSE (Transmissible Spongiform Encephalopathy) and dioxine are not known to exist in India. This material does not contain, nor is derived from the specific risks material as defined in The Maharashtra Animal Preservation Act Govt. of Maharashtra, India.

STATUS OF THE MATERIAL : APPROVED

This is to certify that this lot passes and it confirms to the above mentioned tests and specifications . The information given here is believed to be correct and accurate, however, both the information and products are offered without warranty for any particulars use, other than that specified in the current HiMedia manual or product sheets. The results reported were obtained at the time of release.

This document has been produced electronically and is valid



Sheetal Shirode
Microbiologist/Sr.Executive
Microbiologist



Ujjwal M. Kotale
Asst./Dy/QC Manager



Dr. Sanjiv Kaul
Dy/QA Manager


24.09.2018

ANEXO G. Certificado de análisis de Cepa *Escherichia coli*



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Escherichia coli Catalog Number: 0335 Lot Number: 335-519** Reference Number: ATCC® 25922™** Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2023/1/31 Release Information: Quality Control Technologist: Kalina E Larsen Release Date: 2021/3/29
--	--

Performance	
Macroscopic Features: 2 colony types, both are gray & beta hemolytic; one is circular to irregular, convex, slightly erose edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge & rough Microscopic Features: Gram negative straight rod	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 15 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm <div style="text-align: right;">  Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE </div>

**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.



Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 – 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second best match is (1) a high- or low-confidence identification in which genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Run Creation Date/Time: 2021-03-03T16:43:22.419 kel
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
B4 (+++) (A)	335-519	Escherichia coli	2.47

Comments:

closely related to Shigella / Escherichia fergusonii and not definitely distinguishable at the moment

ANEXO H. Evidencias fotográficas

TRATAMIENTO DE LA MUESTRA



Figura 2. Muestra de tipo semillas de *Lupinus mutabilis* Sweet (Tarwi)



Figura 3. Selección de la muestra



Figura 4. Lavado de la muestra



Figura 5. Procedimiento de secado de la muestra



Figura 6. Procedimiento de molienda de la muestra



Figura 7. Preparación del macerado del extracto etanólico



Figura 8. Procedimiento de filtración del macerado del extracto etanólico

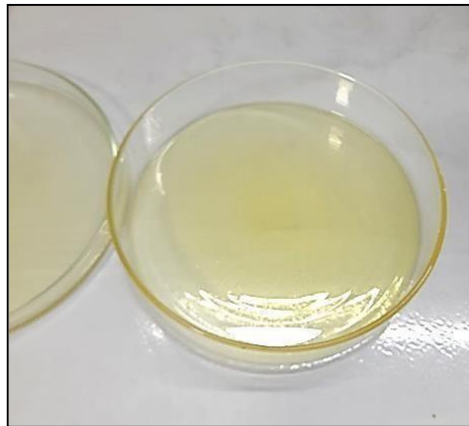


Figura 9. Obtención de extracto seco

PRUEBA DE SOLUBILIDAD



Figura 10. Añadiendo extracto seco al tubo de ensayo para prueba de solubilidad



Figura 11. Agitación en el vortex

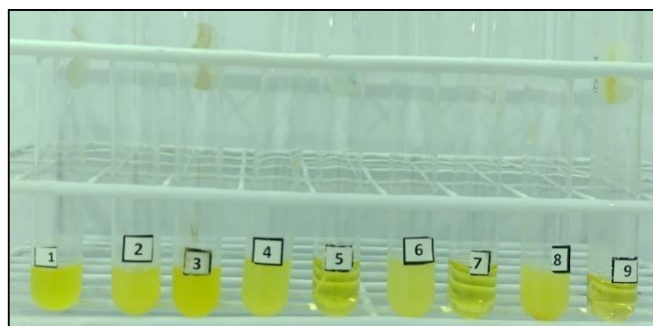


Figura 12. Resultado de prueba de solubilidad

MARCHA FITOQUÍMICA



Figura 13. Adición de extracto a los tubos de ensayo



Figura 14. Adición del reactivo en la marcha fitoquímica

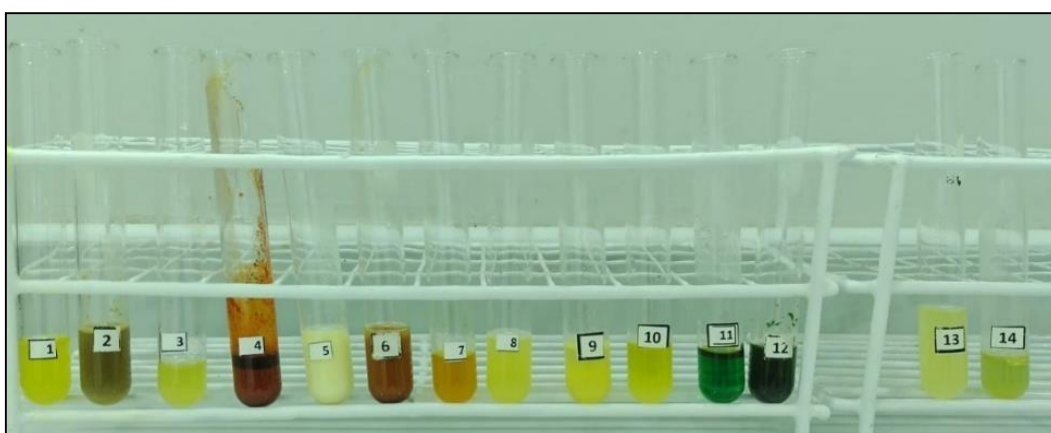


Figura 15. Resultado de la marcha fitoquímica

ENSAYO MICROBIOLÓGICO



Figura 16. Pesando del Agar



Figura 18. Autoclave para el uso en la prueba microbiológica



Figura 17. Agar Mueller Hinton

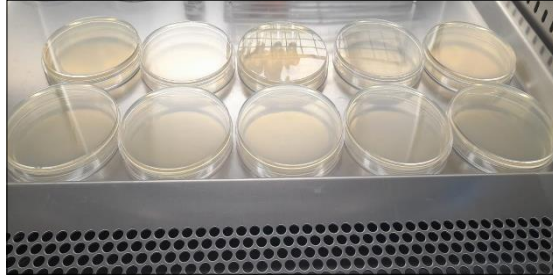


Figura 19. Placas preparadas

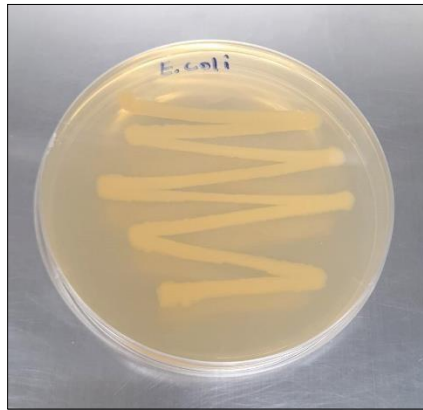


Figura 20. Cepa biológica de tipo: *Escherichia coli* ATCC 25922



Figura 21. Comparación de turbidez mediante el reactivo de Mc. Farland



Figura 22. Rotulado de placas

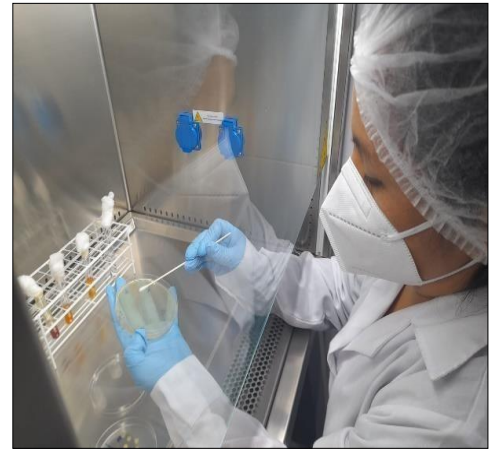
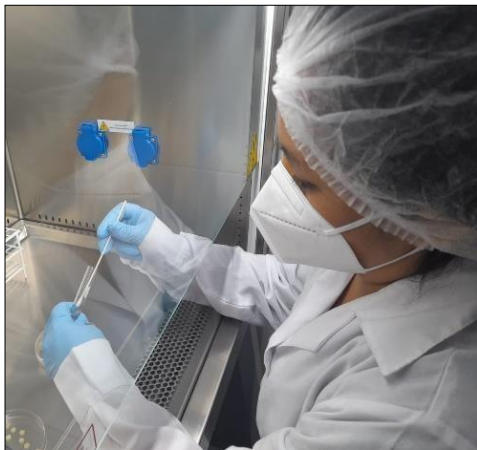


Figura 23. Sembrado de la cepa biológica en las placas

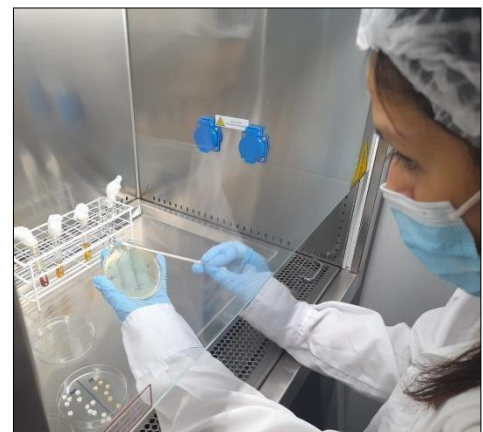
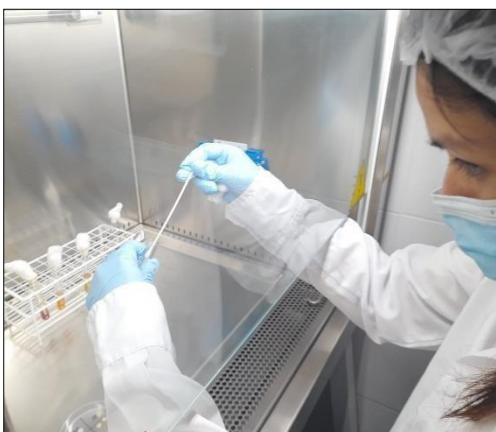


Figura 24. Inoculación de la cepa biológica



Figura 25. Adición de la sustancia experimental en la placa Petri

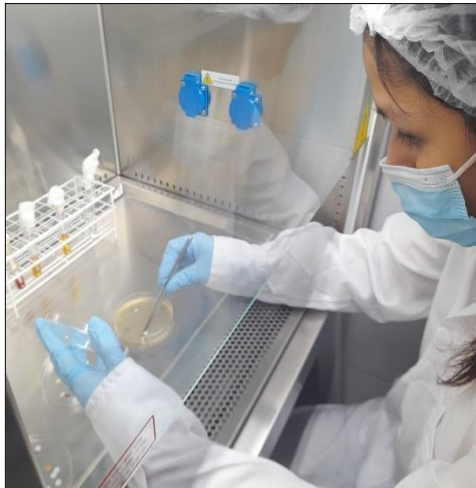


Figura 26. Adición de discos previamente preparados



Figura 27. Incubación

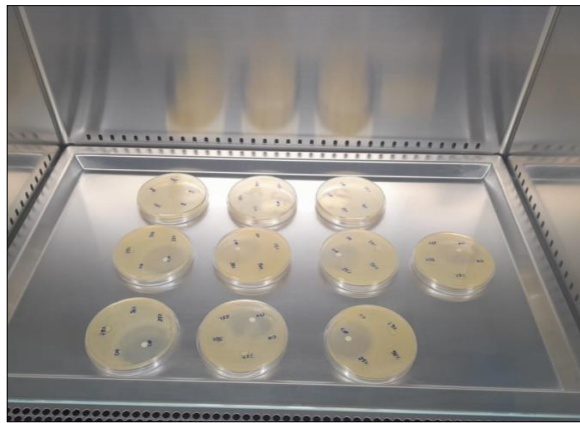


Figura 28. Placas Petri con halos de inhibición

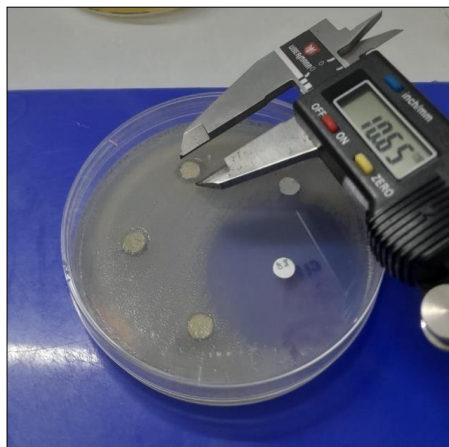
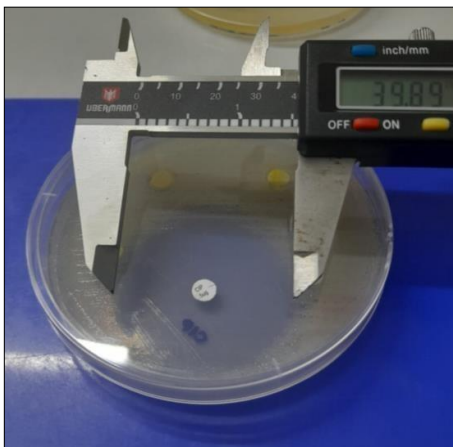


Figura 29. Lectura de resultados

ANEXO I. Porcentaje de rendimiento

Determinación del porcentaje de rendimiento

Tenemos la cantidad de producto obtenido en la extracción química.

$$\%E = \frac{Pf}{Pi} \times 100$$

Dónde: %E = porcentaje de rendimiento

Pf = peso final (extracto seco)

Pi = peso inicial (muestra molida)

Fuente: Efecto de los extractos secos clorofórmico y de diclorometano de *Tropaeolum tuberosum* (Ruiz & Pavón) mashua sobre los parámetros seminales y toxicidad aguda

<http://www.scielo.org.co/pdf/rccqf/v48n1/0034-7418-rccqf-48-01-94.pdf>

Extracción por maceración

$$\%E = \frac{20.1g}{900g} \times 100 = 2.23\%$$

Pf= 20.1 gr extracto seco obtenido

Pi = 900 gr. muestra molida