



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Bidens pilosa* L.
(Chipaca) FRENTE A *Staphylococcus aureus* y
Escherichia coli.**

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

AUTORES:

Bach. MAMANI CONDORI, TANIA

<https://orcid.org/0000-0002-3266-9417>

Bach. QUISPE BELIZARIO, PAULO CESAR

<https://orcid.org/0000-0002-2134-3331>

ASESOR:

Mg. FLORES LOPEZ, OSCAR BERNUY

<https://orcid.org/0000-0001-9091-2537>

LIMA – PERÚ

2022

DEDICATORIA

Este proyecto dedico principalmente a Dios y a mis padres por haberme forjado como la persona que soy actualmente, muchos logros realizados se los debo a mis padres que son mi inspiración ya que constantemente recibí su apoyo incondicional para alcanzar mis metas.

DEDICATORIA

Principalmente lo dedico a Dios y a mis padres especialmente a mi madre porque siempre ha creído en mí y ha estado apoyándome constantemente para alcanzar las metas que me propongo.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos a Dios y a nuestros padres por brindarnos su apoyo incondicional y a la universidad MARÍA AUXILIADORA por brindarnos la oportunidad de seguir con nuestras metas y sueños, y así poder culminar con esta etapa más en nuestras vidas.

ÍNDICE GENERAL

I	INTRODUCCIÓN.....	1
II	MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
2.1	ENFOQUE Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN.....	10
2.2	POBLACIÓN Y MUESTRA.....	10
2.3	VARIABLES DE INVESTIGACIÓN.....	10
2.4	TÉCNICA E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	11
2.5	PLAN DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	15
2.6	MÉTODOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	20
2.7	ASPECTO ÉTICO.....	21
III	RESULTADOS.....	22
IV	DISCUSIÓN.....	38
4.1	DISCUSIÓN DE RESULTADO.....	38
4.2	CONCLUSIONES.....	40
4.3	RECOMENDACIÓN.....	41
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS BIBLIOGRAFÍA.....	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1 Mediciones de los halos de inhibición	22
Tabla N° 2 Pruebas de normalidad de los halos de inhibición	23
Tabla N° 3 Halo de inhibición promedio según diferentes concentraciones del aceite	24
Tabla N° 4 Efecto de las diferentes concentraciones del aceite de hojas y tallos de <i>Bidens pilosa L.</i> (chipaca frente al <i>Staphylococcus aureus</i>)	25
Tabla N° 5 Estadísticas de prueba	26
Tabla N° 6 Valores exactos de los rangos promedio de concentraciones del aceite de hojas y tallos de <i>Bidens pilosa L.</i> (chipaca).....	28
Tabla N° 7 Valores exactos de los contrastes entre pares de concentraciones del aceite de hojas y tallos de <i>Bidens pilosa L.</i> (chipaca)	29
Tabla N° 8 Mediciones de los halos de inhibición	31
Tabla N° 9 Pruebas de normalidad de los halos de inhibición	32
Tabla N° 10 Halo de inhibición promedio según diferentes concentraciones del aceite.....	32
Tabla N° 11 Efecto de las diferentes concentraciones del aceite de hojas y tallos de <i>Bidens pilosa L.</i> (Chipaca) Frente a <i>Escherichia coli</i>	33
Tabla N° 12 Estadísticas de prueba	34
Tabla N° 13 Valores exactos de los rangos promedio de concentraciones del aceite de hojas y tallos de <i>Bidens pilosa L.</i> (chipaca).....	36
Tabla N° 14 Valores exactos de los contrastes entre pares de concentraciones del aceite de hojas y tallos de <i>Bidens pilosa L.</i> (chipaca)	37

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1 Recolección, y secado de la muestra botánica	52
Figura N° 2 Extracción del aceite esencial en un equipo por arrastre de vapor	53
Figura N° 3 Obtención del aceite esencial	54
Figura N° 4 Preparación del inóculo, sembrado en placa e incubación	55
Figura N° 5 Aplicación de aceite esencial de hojas y tallos de <i>Bidens pilosa</i> L. ...	56
Figura N° 6 Aplicación de discos de sensibilidad	57
Figura N° 7 Medición de los halos de inhibición	58

ÍNDICE DE ANEXO

ANEXO 1 OPERALIZACIÓN DE VARIABLES	47
ANEXO 2 INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS	48
ANEXO 3 CONSTANCIA DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL	49
ANEXO 4 CERTIFICADO DE LABORATORIO DE BIOLOGÍA PARA DETERMINAR EL HALO DE INHIBICIÓN	51
ANEXO 5 EVIDENCIA FOTOGRÁFICA DE TRABAJO DE CAMPO	52
ANEXO 6 RESULTADOS DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA.....	59

RESUMEN

Objetivo: Determinar la actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Metodología: El estudio se basó en un enfoque cuantitativo de diseño experimental transversal, la población estuvo conformada por *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y la especie vegetal de *Bidens pilosa* L. (Chipaca), el aceite esencial se obtuvo por arrastre de vapor, se preparó el aceite a las concentraciones del 25%, 50%, 75% y 100% y se aplicó el método modificado de pozos de agar, se llevó a cabo dos procesos: preparativo del inóculo y los ensayos del efecto antibacteriano para el control de la actividad antibacteriana se llevó a cabo la medición de los halos.

Resultados: La extracción de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. frente a *Staphylococcus aureus* consiguió los halos de inhibición promedio $6.60\text{mm} \pm 0.06$, $10.40\text{mm} \pm 0.06$, $12.45\text{mm} \pm 0.06$ y $14.60\text{mm} \pm 0.06$ para las concentraciones del 25%, 50%, 75% y 100% y *Escherichia coli* consiguió halos de inhibición promedios de $6.00\text{mm} \pm 0.06$, $10.75\text{mm} \pm 0.06$, $13.45\text{mm} \pm 0.06$ y 15.45 ± 0.06 para las concentraciones del 25%, 50%, 75% y 100%.

Conclusiones: Se demostró que el aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. Frente a *Staphylococcus aureus* a la concentración del 25% es resistente, a la concentración del 50% presentó resistencia un 80% y un nivel intermedio de 20%, a la concentración del 75% presentó resistencia un 5% y sensibilidad intermedia un 95%, a la concentración del 100% presentó sensibilidad intermedia 70% y sensibilidad un 30%. Se demostró que el aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. frente a *Escherichia coli* presentó resistencia en su totalidad a las concentraciones del 25%, 50%, 75% y 100%.

Palabras claves: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, aceite esencial, *Bidens pilosa* L.

ABSTRACT

Objective: To determine the antibacterial activity of the essential oil of leaves and stems of *Bidens pilosa L.* (Chipaca) against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

Methodology: The study was based on a quantitative approach of cross-sectional experimental design, the population was made up of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and the plant species of *Bidens pilosa L.* (Chipaca), the essential oil was obtained by steam dragging, it was prepared the oil at concentrations of 25%, 50%, 75% and 100% and the modified method of agar wells was applied, two processes were carried out: preparation of the inoculum and tests of the antibacterial effect for the control of the activity antibacterial measurement of the halos was carried out.

Results: The extraction of leaves and stems of *Bidens pilosa L.* against *Staphylococcus aureus* achieved average inhibition halos of 6.60mm + 0.06, 10.40mm + 0.06, 12.45mm + 0.06 and 14.60mm + 0.06 for concentrations of 25%, 50 %.

Conclusions: It was shown that the essential oil of leaves and stems of *Bidens pilosa L.* Against *Staphylococcus aureus* at a concentration of 25% is resistant, at a concentration of 50% it presented resistance 80% and an intermediate level of 20%, at the 75% concentration presented 5% resistance and 95% intermediate sensitivity, at the 100% concentration it presented 70% intermediate sensitivity and 30% sensitivity. It was shown that the essential oil of leaves and stems of *Bidens pilosa L.* against *Escherichia coli* presented resistance in its entirety at concentrations of 25%, 50%, 75% and 100%.

Key words: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, essential oil, *Bidens pilosa L.*

I INTRODUCCIÓN

En la actualidad se viene identificando una gran variedad de plantas medicinales que acompañan al ser humano a través de la historia, obteniendo de ellas la energía necesaria para controlar sus desequilibrios orgánicos y mentales; las plantas medicinales son una alternativa de conservación de la salud data de épocas remotas en la historia de la humanidad (1).

A ellas se le atribuye características terapéuticas gracias a la naturaleza de sus principios activos, que a su vez realizan una función de gran interés para la misma, pues estas mixturas alargan su vida, ya sea que participan en la prevención contra microorganismos, hongos y animales evitando así su devastación (2).

Las propiedades de las plantas medicinales están basadas en su uso desde los tiempos remotos en la investigación. Este saber es transmitido de generación en generación y enriquecido por la integración cultural de la población nativa y migrante y que en nuestro tiempo la medicina mira como una alternativa eficaz, con el fin de ayudar a resolver en parte, las dificultades de salud de la población menos favorecida y más alejada de la actualidad, cuyas posibilidades de curarse son, actualmente limitadas por la falta de difusión e investigación y también por la oposición de la industria mercantil (3).

En este argumento, se plantea la medicina mixta entre la medicina tradicional y convencional (occidental) a través de la investigación etnobotánica y el estudio de los principios activos, dan validación de la actividad terapéutica de las plantas medicinales, permitiendo disponer de recursos naturales para el tratamiento de las enfermedades que afectan comúnmente a la población (3).

Sin embargo, debido a las múltiples circunstancias en que los antibióticos típicos se tornan improductivos ya sea por la aparición de cepas resistentes o dados por el abuso y uso incorrecto de los fármacos y la aparición de nuevas enfermedades (4).

En el tema de *Bidens pilosa L.*, es también conocida como amor seco, chipaca. La investigación se ejecutó con el objetivo de saber el efecto antibacteriano por medio

del procedimiento de arrastre de vapor para obtener el aceite esencial de *Bidens pilosa L.*, lo cual se utilizó las hojas y tallo de *Bidens Pilosa L.* para la obtención del aceite (5).

Bidens pilosa L. perteneciente a la familia Asteraceae, originaria de Sudamérica con distribución cosmopolita de hojas opuestas o alternas, en la parte superior pecioladas, de características pubescentes, 30 a 100 cm de altura y ramificada (4).

Las acciones farmacológicas de *Bidens pilosa L.*, se basan en la diversidad de principios activos que la misma planta tiene. Tenemos la posibilidad de ver dos grupos principales de constituyentes; los poliacetilenos que inhiben los organismos patógenos, y los flavonoides, que son activos frente a la hinchazón. Los poliacetilenos además expresan acción antiinflamatoria, por un diferente mecanismo de los flavonoides; además, muestran triterpenos y aceites esenciales, que tienen la posibilidad de contribuir a sus efectos terapéuticos (4).

Por medio a sus diferentes principios activos. Es utilizada cada parte de la planta medicinal para tratar diferentes malestares. Como por ejemplo Las hojas son utilizadas en infusión o decocción en problemas relacionados con amigdalitis, aftas bucales, afecciones renales, úlceras gastroduodenales, otras veces como sustancia medicamentosa con apariencia de pasta blanca de esta forma aplicarlo en lesiones, para dolencias abdominales y cólicos, así como el reumatismo (4).

Por otra parte, los *Staphylococcus aureus* son bacterias gram positivas, cuyo diámetro es 0.5 y 1.5 micras. Es reconocida porque se dividen en agrupaciones que son similares a racimos de uva. Hasta el momento, se reportó 35 especies conocidas con 17 subespecies en el género *Staphylococcus*. Este género tiene la capacidad de adaptación, lo cual tiende afectar a todas las especies de mamíferos, gracias a su fácil propagación obtienen transmitirse de una especie a otra o entre individuos de una misma especie (6).

La *Escherichia coli* es una clase recurrente del tracto gastrointestinal de las personas y animales, esto se descarta por las heces. Comúnmente está en el medio ambiente puesto que sigue con vida algunos días en el agua y de igual modo en los comestibles, de esta forma su aislamiento es un indicio de contaminación fecal reciente. Hay cepas de *Escherichia coli* que son comensales inofensivos del tracto intestinal y otros que son patógenos destacable de las personas y animales. La cepa de *Escherichia coli* se contribuye con las cepas que causa la patología en el tracto gastrointestinal y otros capaces de infectar a otros sitios anatómicos del cuerpo humano (5).

Con la finalidad de investigar la utilidad de las hojas y tallos de *Bidens pilosa L.* como fuente natural para tratar afecciones producidas por *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* planteamos la siguiente interrogante: ¿Presentará efecto antibacteriano el aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa L.* (Chipaca) frente a *Staphylococcus aureus* *Escherichia coli*?

Fitoterapia deriva de los vocablos griegos Phytos, 'planta', 'vegetal' y therapeia, 'terapia', es decir el arte facultativo que se vale de las plantas para combatir las enfermedades y restaurar el equilibrio de la salud. En otros países a este arte se le denomina herbalismo (7).

Plantas Medicinales especies vegetales que producen sustancias farmacológicas, beneficiosas o perjudiciales, en nuestro organismo. Teniendo como fin principal o específico usar esto como droga o medicamento que alivie la enfermedad y restablezca la salud de la persona (8).

Droga vegetal son los principios activos de origen vegetal encerrados en los diferentes órganos de los vegetales tales como las raíces, cortezas, hojas, flores, frutos, los cuales tiene aplicaciones en el campo de la medicina, industria, tales como atropina, digitoxina, morfina, galantamina etc. (9).

Principio activo son sustancias o productos orgánicos derivado de la biosíntesis de la planta y puede ser una sustancia simple o compleja sujeto del trayecto metabólico que haya dado su resultado a partir de la fotosíntesis. Lo cual es localizada en las distintas partes de la planta u órganos de las plantas y que pueden ser alteradas o modifican el funcionamiento de órganos y sistemas del cuerpo humano y animal (10).

Los aceites esenciales son concentraciones de materia prima vegetal, son porciones líquidas volátiles, se puede obtener mediante arrastre de vapor de agua, ya que son responsables de la esencia o aroma de las plantas ya que es importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes).

Estos aceites esenciales tienen composiciones complejas más de 100 componentes que pueden ser:

- . Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos),
- Monoterpenos,
- Sesquiterpenos y Fenilpropanos.

La mayoría son de olor agradable, y algunos de olor desagradable como por ejemplo los del ajo y la cebolla, ya que contienen compuestos azufrados (11).

Bidens pilosa L. es una hierba nativa de América tropical, con la capacidad de irrumpir una extensa selección de lugares donde habitan que van desde suelo húmedo, arena, suelo seco e infértil (12).

Prospera en superficies, luz del sol alta y suelos equilibradamente secos, pero se conoce que ocupa praderas, brezales, claros de bosques, humedales, plantaciones, bordes de caminos, pastos, superficies costeras y superficies agrícolas, es con la capacidad de subsistir sequías severas (13).

Taxonomía: (13)

Reino: Plantae

División: Magnoliidae N.

Clase: Equisetopsida C.

Orden: Asterales L.

Familia: Asteraceae.

Género: *Bidens* L.

Especie: *Bidens pilosa* L.

Nombres recurrentes cadillo, Chipaca, amor seco, hierba amarilla, romerillo blanco.

Fitotomía *Bidens pilosa* L. hierba periódica, de hojas pecioladas, peciolo de 1-5 cm de largo, las superiores organizadas por 3-5 foliolos lanceolados, ovados (13).

Usos medicinales de *Bidens pilosa* L. se usa en mates elaborados con todas las partes de la hierba así aliviar el reumatismo, afecciones de los riñones y la cefalea. El mate de las hojas se usa como remedio herbal en los malestares estomacales, Las hojas molidas y el extracto son aplicados en escaldaduras y heridas sangrantes (13).

Staphylococcus aureus la bacteria de la flora intestinal de la mucosa y de la piel, es transmitida de igual modo por medio del consumo de alimentos contaminados con la bacteria o sus toxinas, el contacto de las lesiones con las superficies contaminadas es causantes de muchas infecciones, esto ocasiona casos de patologías conocidas. Esta bacteria produce y secreta exotoxinas como: Las enterotoxinas estafilocócicas A, B, C, D, E, G, H, I, que tienen la posibilidad de provocar intoxicaciones alimentarias; esta toxina del trastorno del shock tóxico (TSST-1), patología multisistémica aguda se caracteriza por fiebre elevada, hipotensión arterial, diarrea acuosa, erupción roja generalizada; y las toxinas exfoliativas (ETA y ETB), causantes del trastorno de la piel escaldada (14).

Escherichia coli es una bacteria habitual del tracto gastrointestinal así sea de las personas y animales, se descarta comúnmente por las heces. Se halla en la naturaleza del medio ambiente puesto que sigue con vida algunos días en el agua y los comestibles, de este modo, su aislamiento es un indicio de contaminación fecal reciente. Hay cepas de esta bacteria que son comensales inofensivos del tracto intestinal y otros que son patógenos indispensables de las personas y animales (15).

Escherichia coli enterotoxigenica (ECET), Son bacterias que con continuidad causan la deshidratación por diarrea en niños inferiores de dos años y es la primordial causante de la diarrea del viajero. Estos indicios por lo general son leves, con diarrea acuosa, puede estar acompañado con una fiebre elevada, escalofríos y vómitos. La enterotoxina estimula la secreción fuerte de líquido por las células mucosas. Las infecciones del tracto respiratorio tienden a ser oportunistas (16).

Alonso E. (2019) Para lograr Corroborar su efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de hojas de *Bidens pilosa* L. (cadillo) frente a *Staphylococcus aureus*. La muestra de hoja de la planta fue recolectada en el centro poblado Huancaquito Bajo, Provincia de Virú, para así conseguir el extracto acuoso esto fue ejecutado por medio del procedimiento de decocción, de esta forma poder elaborar concentraciones al 10% y 20% p/v. Esta actividad antimicrobiana fue ejecutada por medio del procedimiento de Kirby-Bauer. entonces se trabajó con 20 placas Petri lo divididas en 4 grupos conteniendo cultivos de *Staphylococcus aureus*. llamado al grupo control, con los discos de solución salina, grupo control estándar, con discos de Doxiciclina 30 µg, g (17).

Camus E., De La Cruz N. (2019) Hoy en día, el aceite esencial está siendo muy usado tanto como usos farmacológicos, terapéuticos e industriales por este motivo el método de extracción y caracterización deben tener parámetros que nos puedan asegurar la calidad, inocuidad y eficacia. La investigación tuvo como finalidad obtener el aceite esencial de hierba luisa (*Cymbopogon citratus*), por medio de arrastre de vapor teniendo en cuenta el volumen y el peso de partícula y paralelamente saber por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) Con el aceite esencial obtenido por medio del arrastre de vapor por

lo que se realizó las características fisicoquímicas los cuales dieron como resultado una densidad relativa igual a 0.8829, pH 5 (18).

Arroyo J., Bonilla P. Bidens (2010) *Bidens pilosa L.* popular en el Perú como amor seco y cadillo. Tiene un efecto antiinflamatorio, diurético y hepatoprotector. Establece el efecto quimioprotector del compuesto fenol y flavonoides extraídos de la hierba entera de *Bidens pilosa L.* sobre el cáncer de mama inducido en ratas con 7,12-dimetilbenz antraceno (DMBA). La detención del desarrollo de adenocarcinoma y disminución de marcadores de estrés oxidativo. Se logró los compuestos fenólicos y flavonoides por cromatografía en columna rápida, con solventes de polaridad creciente. Mediante cromatografía en capa fina y reactiva de desplazamiento, se aisló cuatro compuestos fenólicos (19).

Reisancho L. (2019) Los aceites esenciales son metabolitos secundarios de todas las plantas, presentemente tienen actividad farmacológica, lo cual tienden a llevar a cabo investigaciones fundamentadas en entendimientos de nuestros ancestros del uso medicinal de las diferentes especies de esta forma como la situación de *Bidens pilosa L.*, popular en Ecuador como amor seco. Este estudio se llevó a cabo por medio de la extracción del aceite esencial de *Bidens pilosa L.* frente a la actividad antimicrobiana, para lo cual se consiguió aceites esenciales de hojas de *Bidens pilosa L.* (5).

Coy C., Eunice G. (2013-2018) En el estudio de la composición química por cromatografía gaseosa espectrometría de masa de tres aceites esenciales extraídos del romero, tomillo y cúrcuma, estas plantas son muy utilizadas en Colombia para la industria alimentaria, en especial como Especia. Esto se evaluó de los aceites obtenidos frente a dos cepas grampositivas y dos cepas gramnegativas. Determinar la composición química y física (densidad e índice de refracción) del aceite esencial de romero, tomillo y cúrcuma durante los 3 meses diferentes del año, para evaluar la actividad antibacteriana de cada uno frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Salmonella typhimurium* ATCC 14028s. El aceite esencial se obtuvo del material vegetal fresco, en un equipo de destilación por arrastre con vapor (20).

William O. (2019) Esta investigación tuvo como finalidad determinar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de la Chilca y el Cilantro frente a una bacteria *Xanthomona sp.*, por medio de la actividad inhibitoria de la bacteria. Se llevó a cabo pruebas físicas y químicas para saber el desempeño y calidad de los aceites esenciales, además de cromatografía de gases para obtener los elementos con mayor porcentaje. Ahora se llevó a cabo la prueba de caja Petri invertida, lo cual se obtuvo halos de inhibición de hasta 20 mm y 17 mm, al usar el aceite esencial de Cilantro en concentraciones de 100% y 50%. Se ejecutó la prueba de dilución en agar por medio de la cual se buscó determinar la capacidad bacteriostática de los aceites esenciales logrando la inhibición de la bacteria *Xanthomona sp.*, en una concentración de 20% en Cilantro y 60% en Chilca (21).

En la actualidad todo el mundo cerca del 80% todavía depende de la medicina herbolaria para bajar las dolencias de algunas patologías. En nuestro país la situación es semejante, dado que tiene una enorme diversidad en su flora, donde hay un aproximado de 80 mil especies vegetales (20 % de las que ya están en la tierra), y de las cuales únicamente 2,000 son usados con objetivos curativos. Siendo primordial considerar las características medicinales de estas plantas (3).

Los aceites esenciales, se obtiene de diferentes partes de la planta para conseguir los líquidos aromáticos y estos son usados extensamente en la industria alimentaria, como condimentos y saborizantes; tanto en la industria farmacéutica y cosmética, como perfumes y esencias. Las indagaciones descubrieron que algunos aceites tienen actividad antibacteriana, antifúngicas y antiviral, insecticida, antitóxica y antioxidante. obligando una nueva búsqueda de fuentes, encontrándose en los aceites esenciales (4).

Dentro de este contexto, las zonas del Perú tiene distintas variedades de flora destacándose el género de la *Bidens pilosa L.*, esta clase vegetal se desarrolla sobre los 3800 m.s.n.m. en llanuras y quebradas de las zonas de Apurímac, Ayacucho, Arequipa, Huancavelica, Huánuco, Cusco y Puno, es usada en la medicina clásica como un analgésico que calma dolencias estomacales tanto de personas como de animales, mal de altura o puna, anti flatulento, para inconvenientes

cardiovasculares, tos, resfrío, regularización de ciclos menstruales. Con la extracción del aceite esencial da un valor agregado y constituir de esta manera el tratamiento alternativo y uso antibacteriano y antifúngico, a futuro, (5).

De acuerdo al planteamiento del problema al objetivo que queremos llegar, Determinar la acción de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L.(Chipaca) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 ENFOQUE Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

El presente trabajo de investigación fue de tipo experimental, transversal, de enfoque cuantitativo. Aplicando el método de disco de difusión o Kirby-bauer, para la prueba de sensibilidad antibacteriana. (22)

2.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

POBLACIÓN

Microorganismos:

- *Staphylococcus aureus*
- *Escherichia coli*.

MUESTRA

Se recolectó 20 Kg de la planta *Bidens pilosa L. (Chipaca)* fresca, entre las 8:00 a.m. y 11 a.m. en el mes de junio y julio, en el centro poblado de Yanamayo, Distrito San Juan Del Oro, Provincia Sandia, Departamento de Puno

CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Criterios de Inclusión

De la Planta

Se utilizó las hojas y tallos de *Bidens Pilosa L.(chipaca)* libre de agentes que logren modificar la muestra.

Criterios de Exclusión

De la Planta

No fueron incluidas partes aéreas de la planta que están perjudicadas y/o malogradas, marchitas u hojas secas, ni tampoco las contaminadas con hongos.

VARIABLES DE INVESTIGACIÓN

VARIABLE INDEPENDIENTE: Extracción del aceite esencial de *Bidens pilosa* L.

Determinar la concentración del aceite esencial de *Bidens pilosa* L.(Chipaca) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en concentraciones del 25%,50%,75%y 100%.

VARIABLE DEPENDIENTE: Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana se evaluó mediante el Método de dilución de discos en agar, formando los halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

2.3 TÉCNICA E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

MATERIALES

Muestra Botánica

Se utilizará 2000 gr de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca)

TAXONOMÍA

Reyno	Plantae
Division	Magnoliophyta
Clase	Magnoliosida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Genero	<i>Bidens</i>
Especie	<i>Bidens pilosa</i> L.

Se expide la presente a solicitud del interesado para los fines que se estimen convenientes.

Arequipa 8 de junio del 2021


Mg. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 993659045
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA – PERÚ

Material biológico

Aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L.(*Chipaca*).

Material microbiológico

Son: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Materiales de laboratorio

➤ **Equipos:**

- Autoclave.
- Incubadora.
- Balanza.
- Mechero.
- Micropipeta (capacidad 10-100 μ L)
- Cocinillas eléctricas.

➤ **Material de vidrio**

- Tubo de ensayo.
- Tubo de ensayo con tapa.
- Probetas.
- Pipetas.
- Matraces.
- Fiolas.
- Termómetro.
- Vasos precipitados de 50 y 250ml.
- Placas Petri.
- Pera de decantación.

➤ **Medios y reactivos**

- Agar Dextrose Saboraud.
- Agar Muller Hinton .
- Agar Mac Conkey.
- Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI).

- Dimetil sulfóxido (DMSO)
- Agua destilada.
- Alcohol 96°.
- Hipoclorito de sodio.
- Suero fisiológico al 0.9‰.
- Ácido sulfúrico.
- Cloruro de bario.

Otros materiales:

- Gradillas.
- Propipeta (bomba de succión).
- Picetas.
- Placas petri desechables 20x90mm estériles.
- Pinzas.
- Papel Kraft.
- Mascarilla.
- Gorro.
- Guantes quirúrgicos.
- Guardapolvo.
- Jeringa de 5ml.
- Algodón.
- Pabilo.
- Gasa estéril.

MÉTODOS

EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS Y TALLOS DE *Bidens pilosa* L. (Chipaca)

Método: Extracción por arrastre con vapor de agua.

Es uno de los métodos más manejados. Se ubica la materia prima vegetal (fresca y antes cortada) en una cámara inerte. Cuando la carga se encuentre dentro de la cámara, se somete a una corriente de vapor de agua sobrecalentada. El vapor caliente que desprende rompe las cámaras de alojamiento de la esencia en la carga y la etapa gaseosa arrastra esa esencia (debido a la volatilidad) hacia la parte de arriba del envase. Este vapor se extrae por la parte superior del recipiente (destilador).

Se junta el condensado, que después es sometido a una división por densidad entre la esencia y el hidrolato, ya que los aceites esenciales son menos densos que el agua y flotará sobre la misma (23).

Método: Método modificado de pozos en agar.

Aplicación de discos de sensibilidad y aceite esencial a diferentes concentraciones.

INSTRUMENTOS DE MEDICIÓN

Para poder hacer la medición de la actividad antibacteriana se ejecutó por medio de la medición de dicho halo de inhibición en concordancia al crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, con estos datos se procesaron por medio de las técnicas estadísticas.

2.4 PLAN DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

2.5.1 Recolección de la Muestra Botánica

Se recolectó 20 Kg de la planta *Bidens pilosa* L. (*Chipaca*) fresca, entre las 8:00 a.m. y 11 a.m. en el mes de junio y julio, en el centro poblado de Yanamayo, Distrito San Juan Del Oro, Provincia Sandia, Departamento de Puno.

- **Lugar de recolección:** Centro Poblado de Yanamayo.
- **Tipo de clima:** Día despejado.
- **Altitud:** 1320 m.s.n.m
- **Edad:** hojas jóvenes con tallos.
- **Estación:** invierno.

Transporte

La muestra botánica se transportó en las bolsas de papel *kraft* tanto del lugar de recolección hasta el lugar de almacenamiento.

Secado

El secado se ejecutó en tendales en forma de anaqueles con base de papel con el objetivo de hacer más simple el desarrollo de secado en un ambiente sombreado y ventilado, esto con el fin de evadirla falta de principios activos y por lo tanto propiedades curativas.

El lapso de secado fue de 7 – 10 días, hasta que las hojas y tallos jóvenes se hallaron frágiles.

Selección de la Muestra

Se eligió las hojas y tallos jóvenes de la clase en estudio (2000 gr), se apartaron las hojas y tallos partidas, marchitas o secas, malogradas, hojas y ramas que tengan la existencia de bichos, hongos, o algunas plagas que logren evidenciarse.

La selección fue realizada después del secado ya que eran más sencillas de seleccionar cuando estaban frescas así no es maltrató en el momento del secado.

Análisis previo del extracto del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens Pilosa L.*(chipaca)

Extracción del aceite esencial

La extracción fue realizada por arrastre de vapor de agua.

Fundamento:

La temperatura del vapor fue de (90 °C) durante ese tiempo, el tejido vegetal se desgarró liberando el aceite esencial, el cual mostró en estos contextos una presión de vapor: $P_T = P_v + P_a$.

Procedimiento:

Luego de ser secado 9 días, la muestra de hojas y tallos de *Bidens Pilosa L.* fue transportada en bolsas de papel *kraft* al Laboratorio de operaciones y procesos unitarios de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno.

Se llevó a pesar consiguiendo un total de 2000g de muestra vegetal.

El equipo tenía los siguientes elementos: Generador de vapor, extractor, condensador y separador.

Se insertó la muestra de (2000g) al equipo que tiene un fondo falso conformado por una lámina perforada de acero inoxidable, ya puesta la muestra se ubicó la tapa cónica en el extractor y se ajustó con los pernos y mariposas localizadas en el borde del conjunto extractor, además se cerró la válvula de purga y limpieza localizada en la parte de abajo del extractor, evitando fugas de vapor. La tapa está conectada al condensador a través de un tubo.

Inmediatamente se preparó el caldero, éste fue relleno con 13 litros de agua destilada por medio de un medidor de nivel, al momento de abrir la válvula de salida de vapor, de manera rápida se prendió la resistencia eléctrica de esta forma el agua comienza a calentar hasta llegar al punto de ebullición (en nuestro medio 85° C).

En un tiempo preciso de (30min aprox.), transcurso en el cual el sistema consiguió su equilibrio térmico dentro del conjunto, en ese momento empezó el desarrollo de la extracción del aceite esencial, el vapor es destituido por medio del distribuidor, pasó por el tamiz y traspasó por la materia vegetal arrastrando el aceite esencial incluido en las plantas. La mezcla del aceite esencial y asimismo el vapor fue conducido hacia la parte de arriba del equipo y fue desalojado por la tapa cónica, acarreándolo hasta el intercambiador de calor, donde la mezcla se condensa por acción de la refrigerante (agua) y se llevó hasta el vaso separador, donde el aceite esencial se dividió del agua por la diferencia de densidad.

Una vez caída la primera gota al vaso separador, es considerado el comienzo de la extracción y culminó hasta que la proporción de aceite esencial de la muestra sea mínima, el tiempo de extracción fue de 2-3 horas. Para la división del aceite esencial y el agua, es fundamental la pera de decantación estéril que por diferencia de densidad se separan, distinguiendo un estado bifásico se decantó el agua y quedó el aceite esencial, se utilizó para la medición una probeta y luego vacío en un frasco acaramelado estéril para la conservación del aceite.

Determinación de la actividad del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L.

Son sustancias que se consiguen desde un desarrollo bioquímico llevado a cabo por las plantas y que se desarrolla de manera directa desde sus glándulas secretoras. Hablamos de extractos concentrados de la esencia misma de la planta. La extracción tiende a tener las moléculas aromáticas que tienen la planta, así como diferentes moléculas no aromáticas que tienen otras propiedades que consiguen ser aprovechadas por el ser humano y la industria. Son las fracciones líquidas volátiles que, en la mayoría de los casos, tienen la posibilidad de ser destiladas por medio de arrastre vapor de agua. Estos aceites tienen dentro sustancias causantes de proveer el perfume de las plantas, siendo de suma consideración en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), la industria de alimentos (condimentos y saborizantes) y la industria farmacéutica (saborizantes) (23).

Proceso

Recolección de las cepas

Fueron usadas dos bacterias, una Gram negativa *Staphylococcus aureus* y otra Gram positiva *Escherichia coli*.

Antibiograma

El antibiograma evalúa la sensibilidad de un patógeno frente a un fármaco. Los resultados se expresan en las categorías sensibles, intermedio o resistente (24).

El procedimiento de Kirby Bauer, el microorganismo fue inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se pusieron discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico. Las placas fueron incubadas por un tiempo de 16-18 horas a una temperatura de 35- 37°C. A lo largo de la incubación, el antibiótico difunde radialmente desde el disco por medio del agar, por lo cual su concentración va disminuyendo mientras se divide del disco. En un punto preciso, la concentración del antibiótico en el medio es incapaz de inhibir al germen en estudio (25).

Preparación del inóculo

Se tomó con un asa de kolle, numerosas colonias de apariencia semejante desarrolladas en el medio de cultivo tanto para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, por separado, que se transfirieron a un tubo que tiene dentro 10 ml de caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI). La incubación estuvo hasta que la turbidez coincidió con el estándar de 0.5 de la escala de Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ microorganismos/ml). Esto se pudo, por lo general es de 2 a 4 horas.

Para preparar dicho estándar se agregó 0,5 ml de BaCl_2 a 99,5 ml de H_2SO_4 , luego se verificó la densidad correcta del estándar usando un espectrofotómetro. La absorbancia a 625 nm debe ser 0,08nm a 0,10nm, para el estándar 0,5 de Mc Farland.

Control Positivo:

En el control positivo de *Escherichia coli* se utilizó discos de sensibilidad de ceftriaxona (30µg), en caso del *Staphylococcus aureus* se preparó una solución de 1 mg/ml de gentamicina (150mg), se disolverá en dimetilsulfoxido (DMSO) entonces en cada control positivo se tomó 20 µL de esa solución para cada réplica.

Elaboración del medio de cultivo para la prueba de sensibilidad:

La prueba de difusión de agar se utiliza de rutina en muchos laboratorios clínicos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos de bacterias de comunes de desarrollo rápido y también para algunas bacterias con requerimientos nutricionales especiales (26).

Se empleó el Agar Mueller Hinton para ambas cepas.

Inoculación de las placas:

Pasado el tiempo de incubación del inoculo, y preparado el Agar Mueller Hinton se suspendió el inoculo en el agar tanto para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* por separado, luego se dejó solidificar durante 10 a 15 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se hicieron pozos sobre la superficie de los agares con favor de un sacabocado estéril de 6mm de diámetro, cada pozo fue distribuido uniformemente, de modo que estén a una distancia considerable. Siempre realizando cada pasó con estricta esterilidad.

Aplicación de discos y aceite esencial a diferentes concentraciones:

Se prosiguió a usar las diluciones (v/v) del aceite esencial lo cual fue preparada de la siguiente forma:

25%	→	0.25µl aceite + 0.75µl DMSO = 100µl.
50%	→	0.50µl aceite + 0.50µl DMSO = 100µl.
75%	→	0.75µl aceite + 0.25µl DMSO = 100µl.
100%	→	100µl aceite.

Para el *Staphylococcus aureus* en la superficie del agar se colocó un disco de sensibilidad de ceftriaxona siendo manipulada por una pinza estéril, presionando gradualmente sobre cada disco para garantizar su contacto con el agar inoculado. Y después se procede a verter 25ul de cada dilución en los pozos, en uno de los pozos que sobran se añade agrega 25ul de agua destilada como control negativo.

En caso de la *Escherichia coli*, se procedió de la misma forma tanto para las diluciones y el control negativo, se utilizó medicamento diluido y esta se añade 25µl a uno del pozo para el control positivo.

Incubación

Las placas son incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ a lo largo de 24 horas para *Staphylococcus aureus* y 48 horas para *Escherichia coli*, para verificar los halos de inhibición.

Lectura

Luego del tiempo de incubación, se midieron los halos de inhibición de crecimiento con un bernier en unidades de milímetros. La lectura se ejecutó midiendo los halos de inhibición incluyendo el de los controles positivos. El diámetro de esta zona de inhibición fue de manera directa proporcional a la actividad antibacteriana del aceite esencial sobre los microorganismos estudiados.

2.5 MÉTODOS DE ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Para el análisis y tabulación de datos recolectados se utilizó el programa Excel 2019 los cuales fueron procesados a través del paquete estadístico IBM-SPSS versión 25. Se determinó el análisis descriptivo para calcular los indicadores descriptivos y el análisis inferencial, primeramente, se sometió a los datos al análisis de normalidad aplicando el estadístico Shapiro-Wilk, luego de haber encontrado que los datos no de distribuyen normalmente, aplicamos el test de Kruskal Wallis para la comparación de varios grupos (nivel de significación 0.05) para saber la presencia de diferentes concentraciones respecto a la inhibición causada en *Staphylococcus aureus* y el *Escherichia coli*, por el efecto del aceite esencial de *Bidens pilosa* L. (chipaca), de igual modo se llevó a cabo la prueba de U de Mann Whitney (post hoc)

para hacer la prueba de comparación de medias entre pares de tratamientos. La prueba de hipótesis se llevó a cabo usando el siguiente procedimiento:

- **Formular la hipótesis:**
H0: Las muestras provienen de poblaciones idénticas
H1: Las muestras provienen de poblaciones diferentes
- **Nivel de significancia:** = 5 % = 0,05
- **Estadístico de prueba:** H de Kruskal-Wallis
- **Decisión:** si $p = 0,000 < = 5 \% = 0,05$, entonces se acepta H1 (las pruebas son significativas)
- **Conclusión.**

Pruebas Post Hoc: Método de comparación Mann Whitney para la comparación post hoc, entre cada dos grupos con corrección de significancia.

Las pruebas de rango post hoc permiten determinar qué medias difieren. La prueba de rango post hoc identifica subconjuntos homogéneos de medias que no se diferencian entre sí (27).

Shapiro will: En el desarrollo estadístico se piensa que la hipótesis nula es cierta y sólo la objetamos cuando existan evidencias estadísticas para eso, cuando observamos en la muestra tenga una posibilidad muy pequeña de ocurrir de ser dicha hipótesis. Por esto, en cualquier contraste debemos fijar un nivel de significación (es decir, que la más grande posibilidad de solucionar que la hipótesis es falsa cuando verdaderamente es cierta).

En la práctica se acostumbra a fijar un nivel de significación del 5% ($\alpha = 0.05$) Cuando observamos un estadístico le asignamos su significación o P-valor (posibilidad de que el estadístico tome un valor alto que lo encontrado en la muestra). Si ésta es menor que 0.05 decidimos negar la hipótesis nula. (28)

2.6 ASPECTO ÉTICO

No hubo ningún conflicto de interés

III RESULTADOS

3.1 Análisis de resultados

Se realizó 20 ensayos válidos para toda la concentración del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa L.* (Chipaca), tanto para el *Staphylococcus aureus* como para el *Escherichia coli*, donde se consigue la medición en dicha ficha se registra, se recolecta los datos obtenidos de los halos de inhibición, que se observan en la tabla 1 y tabla 8 respectivamente.

3.2 Análisis estadístico de la actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa L.* (Chipaca) frente *Staphylococcus aureus*

Tabla N° 1 Mediciones de los halos de inhibición

		Concentración del Aceite esencial de hojas y tallos de <i>Bidens pilosa L.</i> (Chipaca)				Gentamicina mm
Halo de inhibición en (mm)	Placa N°	25%	50%	75%	100%	
	1	6	10	12	14	18
	2	6	10	12	14	18
	3	6	10	11	14	18
	4	8	12	14	16	18
	5	8	12	14	16	18
	6	6	10	13	16	18
	7	6	10	12	14	18
	8	6	10	12	14	18
	9	6	10	12	14	18
	10	8	12	14	16	18
	11	6	10	12	14	18
	12	8	10	12	14	18
	13	6	10	12	14	18
	14	6	10	12	14	18
	15	6	10	12	14	18
	16	6	10	12	14	18
	17	6	10	12	14	18
	18	8	12	14	16	18
	19	6	10	13	16	18
	20	8	10	12	14	18

Para analizar estadísticamente las diferencias observadas se procedió con el análisis de la siguiente manera:

Prueba de normalidad de los datos:

La prueba de Shapiro Wilk para una muestra es un procedimiento de "bondad de ajuste", que permite medir el grado de concordancia existente entre la distribución de un conjunto de datos y una distribución teórica específica. Su objetivo es señalar si los datos provienen de una población que tiene la distribución teórica especificada, es decir, contrasta si las observaciones podrían razonablemente proceder de la distribución especificada.

- **Formular la hipótesis:**

Ho: La variable concentración de aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens Pilosa L.* al 25, 50, 75 y 100% en la población tiene distribución normal.

H₁: La variable concentración de aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens Pilosa L.* al 25, 50, 75 y 100% en la población es distinta a la distribución normal.

- **Nivel de significancia:** = 5 % = 0,05
- **Estadístico de prueba:** Shapiro Wilk
- **Decisión:** si $p = 0,000 < = 5 \% = 0,05$, entonces se acepta H₁

Tabla N° 2 *Pruebas de normalidad de los halos de inhibición*

Concentración de aceite	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
25%	0.438	20	0.000	0.580	20	0.000
50%	0.487	20	0.000	0.495	20	0.000
75%	0.394	20	0.000	0.726	20	0.000
100%	0.438	20	0.000	0.580	20	0.000

- **Conclusión:**

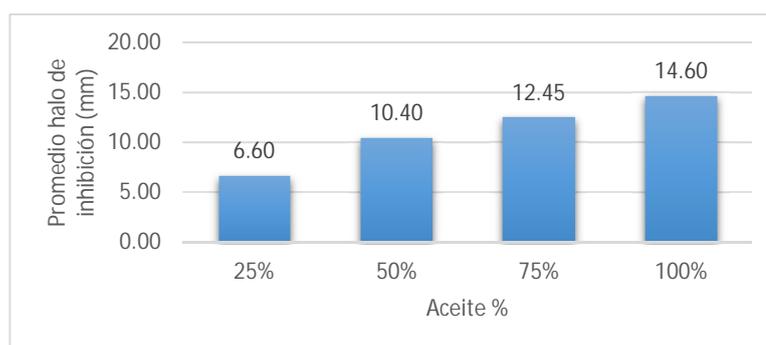
Se ejecutó la prueba de normalidad (tabla 2) para los halos de inhibición de todas las concentraciones con la intención de mostrar que estos tienen una organización habitual ($P \geq 0.05$) al 95% de nivel de seguridad. Se descubrió que el aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca) en concentraciones de 25, 50, 75 y 100% no muestran distribución normal ($P \leq 0.05$).

3.2.1 Actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca) frente a *Staphylococcus aureus*

Tabla N° 3 Halo de inhibición promedio según diferentes concentraciones del aceite

Concentración de aceite	Nº	Media	Mediana	Desv. Est.	95% de intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
25%	20	6.60	6.00	0.94	6.16	7.04
50%	20	10.40	10.00	0.82	10.02	10.78
75%	20	12.45	12.00	0.89	12.03	12.87
100%	20	14.60	14.00	0.94	14.16	15.04

Figura N° 1 Halo de inhibición promedio según diferentes concentraciones del aceite



Los halos inhibitorios que tiene mayor diámetro se muestra en la concentración del aceite al 100%, con un promedio de 14.60 mm y mediana de 14 mm; continúa la concentración del aceite al 75%, con halos de inhibitorios cuyo promedio es de 12.45 mm y mediana de 12.00 mm; seguido de la concentración de aceite al 50%

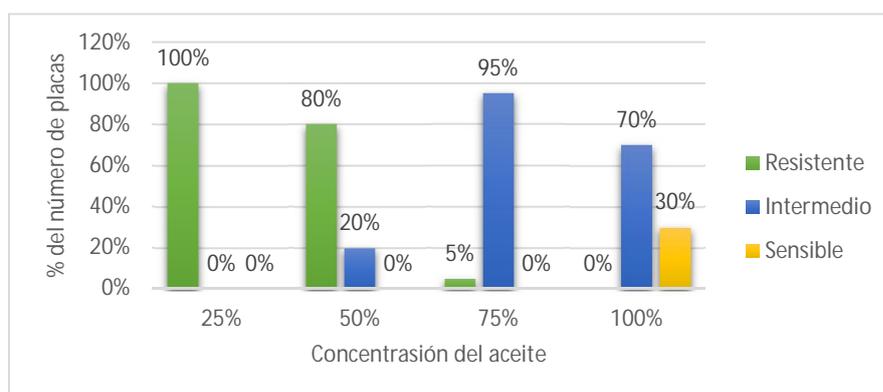
que presenta halos de inhibición con promedio de 10.40 mm con una mediana de 10.00 mm; finalmente, la concentración del aceite al 25% muestra halos de inferior tamaño, con un promedio de 6.60 mm y mediana de 6.00 mm. Ver tabla 3 y Fig. 1.

3.2.2. Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca) frente a *Staphylococcus aureus*

Tabla N° 4 Efecto de las diferentes concentraciones del aceite de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca) frente al *Staphylococcus aureus*

Concentración de aceite	Grado de sensibilidad						Total
	Resistente entre < 12 mm		Intermedio entre 13 - 14 mm		Sensible entre > 15 mm		
	N	%	N	%	N	%	
25%	20	100		0		0	20
50%	16	80	4	20		0	20
75%	1	5	19	95		0	20
100%		0	14	70	6	30	20

Figura N° 2 Efecto de las diferentes concentraciones del aceite de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca) frente al *Staphylococcus aureus*



En la tabla 4 y Figura 2, se establece el grado de sensibilidad acorde a las medias de los halos de inhibición según la escala. Demostrando que en concentraciones de aceite esencial al 25% el grado de sensibilidad son inferiores a 12 mm es decir resistente, a concentraciones de aceite esencial de 50%, el grado de sensibilidad esta entre 12 a 14 mm es decir entre resistente e intermedio, finalmente a concentraciones de aceite esencial de 70% y 100%, el grado de sensibilidad esta entre 13 a 15 mm es decir entre intermedio y sensible.

3.2.3. Comparación del efecto del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa L. (Chipaca)* en diferentes concentraciones sobre el *Staphylococcus aureus*

Ya que todas las concentraciones del aceite no reflejan distribución normal, se usó la prueba de Kruskal Wallis para diferenciación de más de dos medianas.

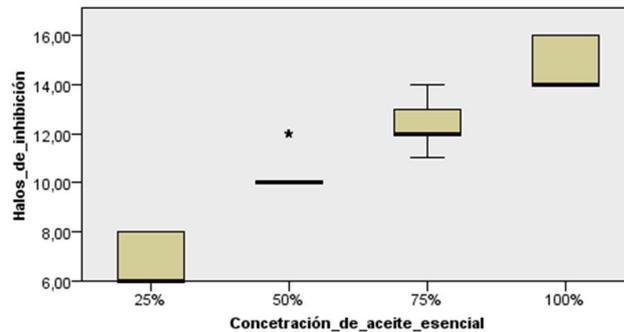
- **Formular la hipótesis:**
 H_0 : Las muestras provienen de poblaciones idénticas
 H_1 : Las muestras provienen de poblaciones diferentes
- **Nivel de significancia:** = 5 % = 0,05
- **Estadístico de prueba:** H de Kruskal-Wallis
- **Decisión:** si $p = 0,000 < = 5 \% = 0,05$, entonces se acepta H_1

Tabla N° 5 **Estadísticas de prueba**

N total	80
Estadístico de contraste H de Kruskal-Wallis	72.475
Grados de libertad	3
Sig. Asintótica (prueba bilateral)	0.000

Conclusión: se ha concluido que consta diferentes significativas tanto en los promedios de tratamientos, puesto que = 0,05 tiene mayor significancia 0,000 por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula con un nivel de confianza del 95 %, es decir de la tabla 5, podemos concluir que, el nivel de efectividad del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa L. (Chipaca)* frente al *Staphylococcus aureus*, difiere entre los niveles de concentración del 25, 50, 75 y 100%.

Figura N° 3 Distribución de los halos de inhibición según concentraciones de aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca).

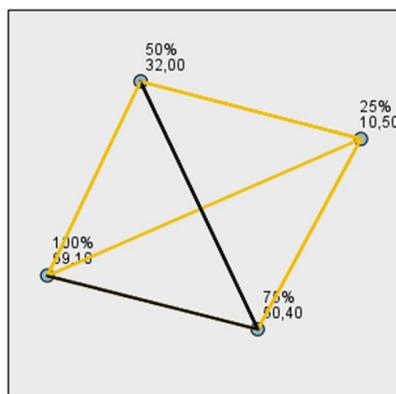


El Figura 3, nos muestra la distribución de los halos de inhibición en cada una de las concentraciones de aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca), observamos que, los halos de inhibición en una concentración de aceite esencial del 100% tiene una puntuación mediana y distribución con puntuaciones un poco superiores a las concentraciones del 25, 50 y 75% de aceite esencial.

Pruebas Post Hoc

El test de Kruskal Wallis resultó representativo, esto implica que al menos dos grupos de entre los comparados son significativamente desiguales, pero como no nos indica cuales. Entonces para conocerlo es incondicional diferenciarlos todos entre ellos. Esto implica realizar una corrección del nivel de significancia para evitar incrementar el error del tipo I. Para ello utilizaremos el método de comparación post hoc para un test de Kruskal Wallis, esto es el test de Mann-Whitney entre cada par de grupos con corrección de significancia.

Figura N° 4 Gráfica de nodos de la comparación entre parejas de las concentraciones de aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca).



Los contrastes se grafican en la gráfica 4, cada uno de los nodos representa un grado de concentración de aceite esencial (25%, 50%, 75% y 100%), en donde cada una de las líneas representa el contraste realizado, en donde las líneas amarillas representan contrastes significativos y las líneas negras no significativas, por otro lado, los valores 10.50, 50.40, 32.00 y 59.10 se corresponden con los rangos promedio de los halos de aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca). De los datos podemos concluir que en la concentración de aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca) al 100% se presenta una potencia de superior frente al *Staphylococcus aureus*.

Tabla N° 6 Valores exactos de los rangos promedio de concentraciones del aceite de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca)

Concentración de aceite	N	Rango promedio
25%	20	10.50
50%	20	32.00
75%	20	50.40
100%	20	69.10
Total	80	

Tabla N° 7 Valores exactos de los contrastes entre pares de concentraciones del aceite de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca)

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.
25%-50%	-21,500	7,219	-2,978	,003	,017
25%-75%	-39,900	7,219	-5,527	,000	,000
25%-100%	-58,600	7,219	-8,118	,000	,000
50%-75%	-18,400	7,219	-2,549	,011	,065
50%-100%	-37,100	7,219	-5,140	,000	,000
75%-100%	-18,700	7,219	-2,591	,010	,057

Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas.
 Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es ,05.
 Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni para varias pruebas.

En la tabla 7 se muestra la comparación de los halos de inhibición a una concentración de aceite 25% y 50%, la estadística chi cuadrado es -21.5 y el valor de la significación es de 0.017, por lo que este contraste es significativo ya que el p-valor es inferior al nivel de significación del 5%, es decir que existe diferencias significativas entre las medianas en los halos de inhibición en concentraciones 25% y 50% de aceite, es decir corroboramos que en los halos de inhibición en concentraciones de aceite esencial al 50% son mayores a los correspondientes del 25%. Por lo que la potencia del halo de inhibición en concentraciones de aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca) al 50% tienen mayor potencia antibacteriana frente al *Staphylococcus aureus*.

En las parejas de concentración de aceite 25% - 75%, 25% -100% y 50% -100%, tenemos un estadístico de prueba chi cuadrado de -39.9, -58.6 y -37.1 respectivamente y las significaciones P-valor son 0.000 en los tres casos, por lo tanto, sí que existen diferencias significativas en los tres casos, entre: 25% - 75%

favorables a la concentración del 75% ya que el rango del halo de inhibición (50.40) es superior al de 25% de concentración (10.50); por otro lado, en el par de concentración 25% -100%, las diferencias son favorables a la concentración del 100% ya que el rango del halo de inhibición (69.10) es superior al rango de 25% (10.50), además, para el par 50% - 100%, se encontró que es favorable a la concentración del 100% puesto que su rango del halo de inhibición (69.10) es superior al de la concentración de 50% (32.0).

Finalmente, la comparación de halos de inhibición del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca) entre las parejas de concentración 50%-75% y 75% -100%, resultan ser no significativos ya que los p-valores son 0.065 y 0.057 que son superiores al nivel de significación del 0.05, por lo que podemos manifestar que no existen diferencias significativas entre las medianas de estos pares de grupos, es decir que, los halos de inhibición del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca) a dichas concentraciones no son significativamente diferentes.

3.3. Análisis estadístico de la actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa L.* (Chipaca) frente a *Escherichia coli*

Tabla N° 8 Mediciones de los halos de inhibición

		Concentración del Aceite Esencial de hojas y tallos de <i>Bidens pilosa L.</i> (Chipaca)				Ceftriaxona Mm
Halo de inhibición en (mm)	Placa N°	25%	50%	75%	100%	
	1	6	11	14	16	25
	2	6	11	14	16	25
	3	6	11	13	15	25
	4	6	11	13	16	25
	5	6	11	14	16	25
	6	6	11	14	15	25
	7	6	10	13	15	25
	8	6	10	13	15	25
	9	6	10	13	15	25
	10	6	11	13	16	25
	11	6	11	14	15	25
	12	6	11	14	15	25
	13	6	11	13	16	25
	14	6	11	13	16	25
	15	6	10	13	15	25
	16	6	11	14	16	25
	17	6	11	14	16	25
	18	6	11	14	15	25
	19	6	10	13	15	25
	20	6	11	13	16	25

Probando normalidad de los datos:

- **Formular la hipótesis:**

Ho: La variable concentración de aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens Pilosa L.* al 25, 50, 75 y 100% en la población tiene distribución normal.

H₁: La variable concentración de aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens Pilosa L.* al 25, 50, 75 y 100% en la población es distinta a la distribución normal.

- **Nivel de significancia:** = 5 % = 0,05
- **Estadístico de prueba:** Shapiro Wilk
- **Decisión:** si $p = 0,000 < = 5 \% = 0,05$, entonces se acepta H₁

Tabla N° 9 Pruebas de normalidad de los halos de inhibición

Concentración de aceite esencial	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	Gl	Sig.	Estadístico	Gl	Sig.
Halos de 25% inhibición		20			20	
50%	0.463	20	0.000	0.544	20	0.000
75%	0.361	20	0.000	0.637	20	0.000
100%	0.335	20	0.000	0.641	20	0.000

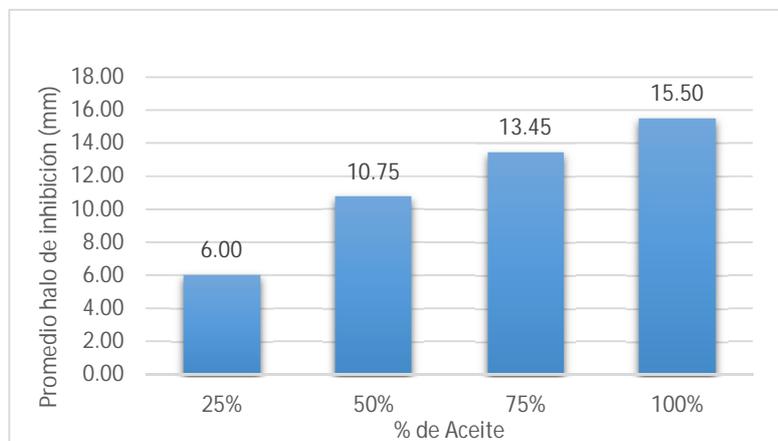
Conclusión: Se elaboró el examen de normalidad (tabla 9) para dichos halos de inhibición de todas las concentraciones con el propósito de demostrar que estos tienen una repartición normal ($P \geq 0.05$) al 95% de nivel de confianza. Se halló que los halos de inhibición en el aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa L.* (Chipaca) en concentraciones de 50, 75 y 100% no muestran distribución normal ($P \leq 0.05$).

3.3.1. Actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa L.* (Chipaca) frente a *Escherichia coli*

Tabla N° 10 Halo de inhibición promedio según diferentes concentraciones del aceite

Concentración de aceite	Nº	Media	Mediana	Desv. Est.	95% de intervalo de confianza para la media	
					Límite inferior	Límite superior
25%	20	6.00	6.00	0.00	6.00	6.00
50%	20	10.75	11.00	0.44	10.54	10.95
75%	20	13.45	13.00	0.51	13.21	13.68
100%	20	15.50	15.50	0.51	15.25	15.75

Figura N° 5 Halo de inhibición promedio según diferentes concentraciones del aceite



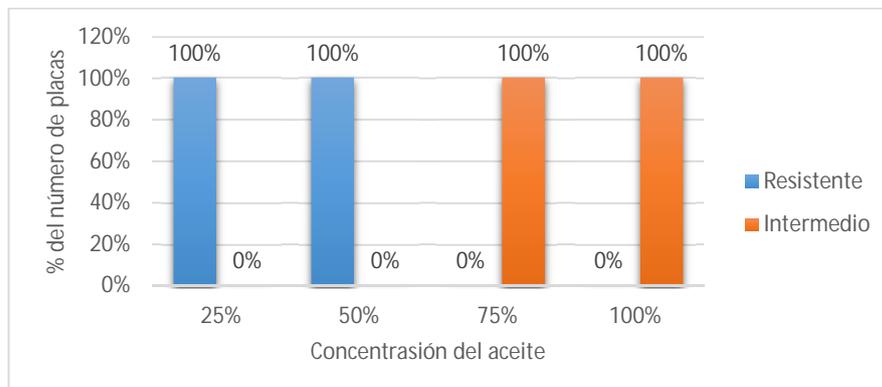
Los halos de inhibición de más grande diámetro se muestran en la concentración del aceite al 100%, con un promedio de 15.50 mm y mediana de 15.50 mm; le sigue los halos de inhibición en concentración del aceite al 75%, con un promedio de 13.45 mm y mediana de 13.00 mm; seguido de halos de inhibición en concentración de aceite al 50% que presenta un promedio de 10.75 mm con una mediana de 11.00 mm; finalmente, los halos de inhibición en concentración del aceite al 25% que presentan de menor tamaño, con una media de 6.00 mm y mediana de 6.00 mm, Ver tabla 10 y Figura 5.

3.3.2. Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca) frente a *Escherichia coli*

Tabla N° 11 Efecto de las diferentes concentraciones del aceite de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca) Frente a *Escherichia coli*

Concentración de aceite	Grado de sensibilidad						Total
	Resistente entre < 13 mm		Intermedio entre 14 - 20 mm		Sensible entre > 21 mm		
	N	%	N	%	N	%	
25%	20	100	0	0	0	0	20
50%	20	100	0	0	0	0	20
75%	0	0	20	100	0	0	20
100%	0	0	20	100	0	0	20

Figura N° 6 Efecto de las diferentes concentraciones del aceite de hojas y tallos *Bidens pilosa* L. (Chipaca) frente al *Escherichia coli*



En la tabla 11 y Figura 6, se establece el nivel de sensibilidad según a los promedios de los halos de inhibición de acuerdo con la escala. Observando que en concentraciones de aceite esencial al 25% y 50% el grado de sensibilidad son inferiores a 13 mm es decir resistente, a concentraciones de aceite esencial de 75% y 100%, el grado de sensibilidad esta entre 14 a 22 mm es decir intermedio.

3.3.3. Comparación del efecto del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca) en diferentes concentraciones sobre el *Escherichia coli*

- **Formular la hipótesis:**
 H_0 : Las muestras provienen de poblaciones idénticas
 H_1 : Las muestras provienen de poblaciones diferentes
- **Nivel de significancia:** = 5 % = 0,05
- **Estadístico de prueba:** H de Kruskal-Wallis
- **Decisión:** si $p = 0,000 < = 5 \% = 0,05$, entonces se acepta H_1

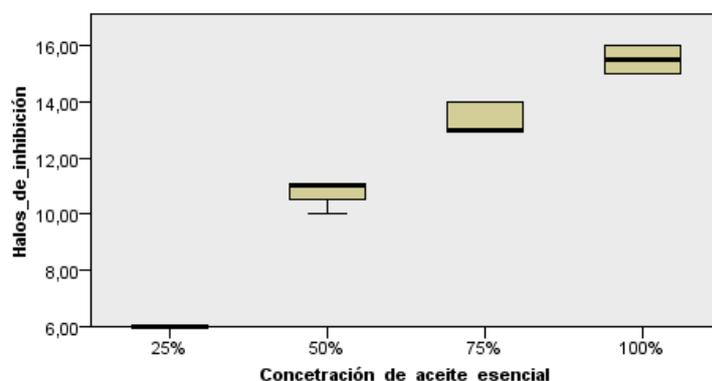
Tabla N° 12 Estadísticas de prueba

N total	80
Estadístico de contraste H de Kruskal-Wallis	76.384
Grados de libertad	3
Sig. Asintótica (prueba bilateral)	0.000

1. Las estadísticas de prueba se ajustan para empates.

Conclusión: se concluye que hay diferencias importantes entre los promedios de tratamientos, ya que $p = 0,05$ es más grande que la significación $0,000$ entonces, se rechaza la hipótesis nula con un nivel de confianza del 95 %, es decir de la tabla 5, tenemos la posibilidad de deducir que, el nivel de eficiencia del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa L. (chipaca)* frente al *Staphylococcus aureus*, difiere entre los niveles de concentración del 25, 50, 75 y 100%.

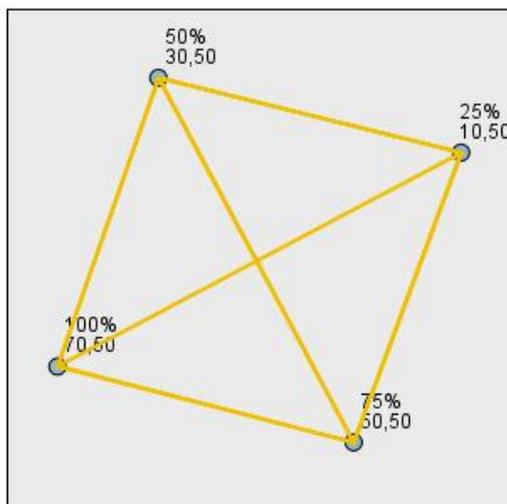
Figura N° 7 Distribución de los halos de inhibición según concentraciones de aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa L. (Chipaca)*.



El Figura 7, nos muestra la distribución de los halos de inhibición en cada una las concentraciones de aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa L. (Chipaca)*, observamos que, los halos de inhibición en una concentración de aceite esencial del 100% tiene una puntuación mediana y distribución con puntuaciones un poco superiores a las concentraciones del 25, 50 y 75% de aceite esencial.

Pruebas Post Hoc

Figura N° 8 Gráfica de nodos de la comparación entre parejas de las concentraciones de aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca).



Los contrastes se grafican en la gráfica 8, cada uno de los nodos representa un grado de concentración de aceite esencial (25%, 50%, 75% y 100%), en donde cada una de las líneas representa el contraste realizado, en donde las líneas amarillas representan contrastes significativos, podemos notar que todas son significativas, por otro lado, los valores 10.50, 30.50, 50.50 y 70.50 se corresponden con los rangos promedio de las muestras de concentración de aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca).

Tabla N° 13 Valores exactos de los rangos promedio de concentraciones del aceite de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca)

Concentración de aceite esencial	N	Rango promedio
Halos de inhibición 25%	20	10.50
50%	20	30.50
75%	20	50.50
100%	20	70.50
Total	80	

Tabla N° 14 Valores exactos de los contrastes entre pares de concentraciones del aceite de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (chipaca)

Cada nodo muestra el rango promedio de muestras de Concentración_de_aceite_esencial.

Muestra 1-Muestra 2	Estadístico de contraste	Error Error	Desv. Estadístico de contraste	Sig.	Sig. ajust.
25%-50%	-20,000	7,237	-2,764	,006	,034
25%-75%	-40,000	7,237	-5,528	,000	,000
25%-100%	-60,000	7,237	-8,291	,000	,000
50%-75%	-20,000	7,237	-2,764	,006	,034
50%-100%	-40,000	7,237	-5,528	,000	,000
75%-100%	-20,000	7,237	-2,764	,006	,034

Cada fila prueba la hipótesis nula de que las distribuciones de la Muestra 1 y la Muestra 2 son las mismas.
Se muestran las significaciones asintóticas (pruebas bilaterales). El nivel de significación es ,05.
Los valores de significación se han ajustado mediante la corrección de Bonferroni para varias pruebas.

En todas las parejas de concentración de aceite 25% -50%, 25% - 75%, 25% -100%, 50% - 75%, 50% -100% y 75% - 100%, tenemos un estadístico de prueba chi cuadrado de -20.00, -40.00, -60.00, -20.00, -40.00 y -20.00 respectivamente y las significaciones P-valor son inferiores al nivel de significación 0.05, por lo tanto, sí que existen diferencias significativas en todos los casos, así, entre: 25% - 50% favorables a la concentración del 50% ya que el rango de éste (30.50) es superior al de 25% de concentración (10.50); entre: 25% -75% favorables a la concentración del 75% ya que el rango de éste (50.50) es superior al de 25% de concentración (10.50); entre: 25% - 100% favorables a la concentración del 100% ya que el rango de éste (70.50) es superior al de 25% de concentración (10.50); entre: 50% - 75% favorables a la concentración del 75% ya que el rango de éste (50.50) es superior al de 50% de concentración (30.50); entre: 50% - 100% favorables a la concentración del 100% ya que el rango de éste (70.50) es superior al de 50% de concentración (30.50); entre: 75% - 100% favorables a la concentración del 100% ya que el rango de éste (70.50) es superior al de 50% de concentración (30.50).

IV DISCUSIÓN

4.1 DISCUSIÓN DE RESULTADO

Se evaluaron 20 ensayos válidos para todas las concentraciones del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (*Chipaca*), tanto para el *Staphylococcus aureus* como para el *Escherichia coli*, al instante de la medición de los halos de inhibición se registrará en la ficha de recolección de datos, que se observan en la tabla 1 y tabla 8 respectivamente.

Se ejecutó la prueba de normalidad (tabla 2) para los halos de inhibición todas las concentraciones con el propósito de demostrar que estos tienen una distribución normal ($P \geq 0.05$) al 95% de nivel de confianza. Se descubrió que el aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (*chipaca*) en concentraciones de 25, 50, 75 y 100% no muestra distribución normal ($P \leq 0.05$).

Los halos de inhibición de más grande diámetro se exponen en la concentración del aceite al 100%, con un promedio de 14.60 mm y mediana de 14 mm; le sigue la concentración del aceite al 75%, con halos de inhibición cuya media es de 12.45 mm y mediana de 12.00 mm; seguido de la concentración de aceite al 50% que presenta halos de inhibición con promedio de 10.40 mm con una mediana de 10.00 mm; por último, la concentración del aceite al 25% presenta los halos de inhibición de menor tamaño, con una media de 6.60 mm y mediana de 6.00 mm. Ver tabla 3 y Figura 1.

En la tabla 14 y Figura 2, se comprueba el grado de sensibilidad de acuerdo a los promedios de los halos de inhibición según la escala. Observando que en concentraciones de aceite esencial al 25% el grado de sensibilidad son inferiores a 12 mm es decir resistente, a concentraciones de aceite esencial de 50%, el grado de sensibilidad esta entre 12 a 14 mm es decir entre resistente e intermedio, finalmente a concentraciones de aceite esencial de 70% y 100%, el grado de sensibilidad esta entre 13 a 15 mm es decir entre intermedio y sensible.

Se concluye que existe diferencias significativas entre los promedios de tratamientos, puesto que $p = 0,05$ es mayor que la significación 0,000 por lo tanto, se

rechaza la hipótesis nula con un nivel de confianza del 95 %, es decir de la tabla 5, podemos concluir que, el nivel de efectividad del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca) frente al *Staphylococcus aureus*, difiere entre los niveles de concentración del 25, 50, 75 y 100%.

Los halos de inhibición de mayor diámetro se demuestran en la concentración del aceite al 100%, con una media de 15.50 mm y mediana de 15.50 mm; le sigue los halos de inhibición en concentración del aceite al 75%, con una media de 13.45 mm y mediana de 13.00 mm; seguido de halos de inhibición en concentración de aceite al 50% que presenta un promedio de 10.75 mm con una mediana de 11.00 mm; por último, los halos de inhibición en concentración del aceite al 25% que presentan de menor tamaño, con una media de 6.00 mm y mediana de 6.00 mm, Ver tabla 10 y Figura 5.

En la tabla 11 y Figura 6, se establece el grado de sensibilidad de acuerdo a los promedios de los halos de inhibición según la escala. Observando que en concentraciones de aceite esencial al 25% y 50% el grado de sensibilidad son inferiores a 13 mm es decir resistente, a concentraciones de aceite esencial de 75% y 100%, el grado de sensibilidad esta entre 14 a 22 mm es decir intermedio.

Se rechaza la hipótesis nula con un nivel de confianza del 95 %, es decir de la tabla 5, podemos concluir que, el nivel de efectividad del aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca) frente al *Staphylococcus aureus*, difiere entre los niveles de concentración del 25, 50, 75 y 100%.

El Figura 7, nos muestra la distribución de los halos de inhibición en cada una las concentraciones de aceite esencial de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca), observamos que, los halos de inhibición en una concentración de aceite esencial del 100% tiene una puntuación mediana y distribución con puntuaciones un poco superiores a las concentraciones del 25, 50 y 75% de aceite esencial.

En todas las parejas de concentración de aceite 25% -50%, 25% - 75%, 25% -100%, 50% - 75%, 50% -100% y 75% - 100%, tenemos un estadístico de prueba chi cuadrado de -20.00, -40.00, -60.00, -20.00, -40.00 y -20.00 respectivamente y las

significaciones P-valor son inferiores al nivel de significación 0.05, por lo tanto, sí que existen diferencias significativas en todos los casos, así, entre: 25% - 50% favorables a la concentración del 50% ya que el rango de éste (30.50) es superior al de 25% de concentración (10.50); entre: 25% -75% favorables a la concentración del 75% ya que el rango de éste (50.50) es superior al de 25% de concentración (10.50); entre: 25% - 100% favorables a la concentración del 100% ya que el rango de éste (70.50) es superior al de 25% de concentración (10.50); entre: 50% - 75% favorables a la concentración del 75% ya que el rango de éste (50.50) es superior al de 50% de concentración (30.50); entre: 50% - 100% favorables a la concentración del 100% ya que el rango de éste (70.50) es superior al de 50% de concentración (30.50); entre: 75% - 100% favorables a la concentración del 100% ya que el rango de éste (70.50) es superior al de 50% de concentración (30.50).

4.2 CONCLUSIONES

El estudio realizado en el presente trabajo nos permite llegar a las siguientes conclusiones:

Se determinó que en las concentraciones 25%,50% y 75 % frente a *Staphylococcus aureus* no presento efectividad como lo demuestra en la tabla N°4 en cambio en la concentración del 100% si presento efectividad antibacteriana sin embargo en *Escherichia coli* en las concentraciones del 25%,50%,75%, y 100% no presenta efectividad antibacteriana como lo demuestra la tabla N° 11

4.3 RECOMENDACIÓN

Se recomienda a los nuevos investigadores buscar y demostrar las ventajas farmacológicas de las plantas medicinales en la búsqueda de alternativa de solución de enfermedades.

Se recomienda a la población el empleo de plantas medicinales como tratamiento inicial de sus males con el objeto de reducir riesgos de automedicación y de resistencia bacteriana.

Se recomienda a las universidades motivar la investigación en plantas medicinales para determinar nuevas alternativas de tratamiento que eviten las consecuencias que conllevan el uso inapropiado de los medicamentos.

Se recomienda a los nuevos investigadores realizar la caracterización de *Bidens pilosa* L. (chipaca)

BIBLIOGRAFÍA

1. Melgarejo L ÁBAA. Plantas medicinales: guía para su uso en la atención de la salud. [Online].; Buenos Aires. Ed. Corpus. 2008 [cited 2021 Febrero 07]. Available from: http://site.ebrary.com/lib/bibliocauladechsp/detail.action?docID=10804298&p00=p_lantas+medicinales.
2. Gomes M GVMGPJ. Las plantas medicinales de Perú. [Online].; 2010 [cited 2021 Febrero 07]. Available from: <http://www.reduniversitaria.es/ficheros/Plantas%20medicinales.%20LIBRO.pdf>.
3. Kemper M ER. Plantas Medicinales de Uso Popular en la Amazonía Peruana. [Online].; 200 [cited 2021 Febrero 07]. Available from: <http://www.iiap.org.pe/upload/publicacion/I017.pdf>.
4. Boffil, Cardellá. la bidens pilosa: planta medicinal que posee una amplia potencialidad terapeutica. [Online].; 2005 [cited 2021 Febrero 07]. Available from: <http://www.medicentro.sld.cu/index.php/medicentro/article/%20view/2244/1769>.
5. Reisancho L. Influencia del método de extracción del aceite esencial de hojas de amor seco (Bidens pilosa L.) en la actividad antimicrobiana. [Online].; 2019 [cited 2021 Febrero 07]. Available from: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/18659/1/T-UCE-0008-CQU-126.pdf>.
6. Mamani G. Lujan D PG. sensibilidad y resistencia de Staphylococcus aureus. Experiencia en el Hospital Nacional Hipólito Unanue. [Online].; 2006 [cited 2021 Febrero 07]. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v67n2/a04v67n2.pdf>.

7. Echegaray J EPMAGJ. fitoterapia y sus aplicaciones. [Online].; 2011 [cited 2021 Febrero 07]. Available from: <http://www.elsevier.es/es-revista-revista-espanola-podologia224-pdf-x0210123811501573>.

8. F. M. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. [Online].; 2002 [cited 2021 Febrero 07]. Available from: <https://books.google.es/books?id=WmX5TibuSrlC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false>.

9. Medicamentos a base de plantas. El reto de la calidad y la Farmacopea como. [Online].; 2013 [cited 2021 Febrero 07]. Available from: https://www.researchgate.net/publication/275031159_Medicamentos_a_base_de_plantas_el_reto_de_la_calidad_y_la_Farmacopea_como_herramienta_para_alcanzarla.

10. J. B. Principios activos y preparaciones farmacéuticas de las plantas medicinales. [Online].; 1994-1995 [cited 2021 Febrero 07]. Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4989379>.

11. M. A. ACEITES ESENCIALES. [Online].; 2003 [cited 2021 Febrero 07]. Available from: http://www.med-informatica.com/OBSERVAMED/Descripciones/AceitesEsencialesUdeA_esencias2001b.pdf.

12. A. G. Obtención, caracterización y evaluación de las propiedades físicoquímicas de los extractos fluidos, blandos y secos, así como de las tinturas del rizoma y de la fronda de calahuala (*phlebodium pseudoaureum*) a nivel de laboratorio. [Online].; 2005 [cited 2001 Febrero 07]. Available from: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_0951_Q.pdf.

13. Mahabir P SAEA. Plantas Medicinales de Panamá. [Online].; 2004 [cited 2021 Febrero 07]. Available from: <http://www.oas.org/es/sedi/femcidi/pubs/Libro%20de%20Plantas%20Medicinales%20de%20Panama.pdf>.

14. Leung YL. Staphylococcus aureus. In Encyclopedia of Toxicology. [Online].; 2014 [cited 2021 Febrero 07]. Available from: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00539-X>.
15. Poolman JT. Escherichia coli. In International Encyclopedia of Public Health. [Online].; 2016 [cited 2021 Febrero 07]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012803678500504X?via%3Dihub>.
16. Long V, DM, & AP. General Chemistry 1046 Laboratory Manual. In General Chemistry 1046. [Online].; 2013 [cited 2021 Febrero 07]. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.03.068>.
17. E. A. EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO ACUOSO DE HOJAS DE Bidens pilosa (CADILLO) FRENTE A Staphylococcus aureus. [Online].; 2019 [cited 2021 Febrero 07]. Available from: http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/123456789/11352/BIDENS_FLAVONOIDES_ALONSO_RAMOS_EBER_GERARDO.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
18. Camus E, DLCN. "CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL ACEITE ESENCIAL DE Cymbopogon citratus". [Online].; 2019 [cited 2021 Febrero 07]. Available from: <http://repositorio.uma.edu.pe/bitstream/handle/UMA/248/14.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
19. Arroyo JB, REBH. Efecto quimioprotector de Bidens pilosa en el cáncer de mama inducido en ratas. [Online].; 2010 [cited 2021 Febrero 07]. Available from: <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v71n3/a03v71n3.pdf>.
20. Carlos CGE. Actividad antibacteriana y determinación de la composición química de los aceites esenciales de romero (Rosmarinus officinalis), tomillo (Thymus vulgaris) y cúrcuma (Curcuma longa) de Colombia. [Online].; 2013-2018

[cited 2021 Febrero 07]. Available from:
<https://www.medigraphic.com/pdfs/revcubplamed/cpm-2013/cpm132g.pdf>.

21.Ortuño W. "DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS ACEITES ESENCIALES DE CHILCA (*Baccharis latifolia*) Y CILANTRO (*Coriandrum sativum*) PARA EL CONTROL DE LA *Xanthomona* sp., EN CONDICIONES *in vitro*". [Online].; 2019 [cited 2021 Febrero 07]. Available from:
https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/17341/1/UPS-CT008278.pdf?fbclid=IwAR2AmfHBF-nnDZAHwOzlxUBWeA9Ah1YqyfTlxXJxM0OYm2EE89B1kd_r0Ts.

22.Sanchez SCE. "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *in vitro* DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE HOJAS DE *Chenopodium ambrosioides* (Paico) POR EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN EN CALDO FRENTE A *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. [Online].; 2015 [cited 2021 Febrero 07]. Available from:
http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/3864/Sergio_Tesis_Ti%20tulo_2016.pdf?sequence=1.

23.Noguera B. Principales métodos de extracción de aceites esenciales. [Online].; 2020 [cited 2021 Mayo 7]. Available from:
<https://www.ingenieriaquimicareviews.com/2020/08/extraccion-aceites-esenciales-principales-metodos.html>.

24.Dueñas C. Lectura interpretada de antibiograma: un enfoque basado en preguntas. [Online].; 2020 [cited 2021 Mayo 17]. Available from:
<https://www.elsevier.es/es-revista-acta-colombiana-cuidado-intensivo-101-avance-resumen-lectura-interpretada-antibiograma-un-enfoque-S0122726220300987>.

25.Laboratorio de Microbiología. DETERMINACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LAS BACTERIAS A LOS ANTIBIOTICOS (ANTIBIOGRAMA). [Online].; 2015 [cited 2021 Mayo 17]. Available from:

http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/10_Anti_biograma.pdf.

26. Malbran C. [http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/02-METODO DE DETERMINACION DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSION](http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/02-METODO_DE_DETERMINACION_DE_SENSIBILIDAD_ANTIMICROBIANA_POR_DIFUSION). [Online].; 2012 [cited 2021 Mayo 12]. Available from: [http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/02-METODO DE DETERMINACION DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR DIFUSION 2012.pdf](http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/02-METODO_DE_DETERMINACION_DE_SENSIBILIDAD_ANTIMICROBIANA_POR_DIFUSION_2012.pdf).

27. Riofrio D. Análisis Post-Hoc de un Experimento acerca de TDD. [Online].; 2017 [cited 2021 Mayo 7]. Available from: http://oa.upm.es/39038/1/TM_RIOFRIO_VASCONEZ_DARWIN.pdf.

28. Carrollo C. Contrastes de hipótesis. [Online].; 2012 [cited 2021 MAYO 06]. Available from: http://eio.usc.es/eipc1/BASE/BASEMASTER/FORMULARIOS-PHP-DPTO/MATERIALES/Mat_50140117_P_contraste_hip%C3%B3tesis%202011_1_2.pdf.

29. Manuel M. Composición química de los aceites esenciales de Lavanda y Tomillo. Determinación de la actividad antifúngica. [Online].; 2015-2016 [cited 2021 Febrero 07]. Available from: https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/62057/TFG%20MANUEL%20MARQUES%20CAMARENA_14489064360187381276109123176571.pdf?sequence=1.

ANEXOS

Anexo 1 OPERALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES	DIMENSIONES	TIPO	ESCALA	INDICADORES	UNIDAD DE MEDIDA PUNTO DE CORTE
VARIABLE INDEPENDIENTE 1. <i>Bidens pilosa</i> L. (Chipaca)	1.1. Determinación concentración.	Cualitativo	Ordinal	Dilución a: 25%	Porcentaje
				Dilución a: 50%	
				Dilución a: 75%	
				Dilución a:100%	
VARIABLE DEPENDIENTE 2.Actividad antibacteriana	2.1 Halos de inhibición para <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> .	Cualitativo	Ordinal	Sensible Intermedio Resistente	- Gentamicina > a 15mm 13 - 14mm < a 12mm
				Sensible Intermedio Resistente	- Ceftriaxona > a 21mm 14 - 20mm < a 13mm

Anexo 2 INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Aceite esencial	HALOS DE INHIBICIÓN																				Promedio final de halos (mm)	
	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Placa 4	Placa 5	Placa 6	Placa 7	Placa 8	Placa 9	Placa 10	Placa 11	Placa 12	Placa 13	Placa 14	Placa 15	Placa 16	Placa 17	Placa 18	Placa 19	Placa 20		
[]%	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)	Halos (mm)		
25%																						
50%																						
75%																						
100%																						
Ceftriaxona																						
Gentamicina																						

Anexo 3 CONSTANCIA DE IDENTIFICACIÓN TAXONOMICA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE BIOLOGÍA
HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)



CONSTANCIA N°16 -2021-HUSA

El director del *Herbarium Arequipense* (HUSA) de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

HACE CONSTAR:

Que la muestra del espécimen presentada por Mamani Condori Tania y Quispe Belizario, Paulo Cesar, Bachilleres de la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad María Auxiliadora para la realización de su tesis "Determinación de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de *Bidens pilosa* L (Chipaca) frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*". La muestra fue traída al Laboratorio de Botánica al estado fenológico fresco, para su determinación en el Herbarium Arequipense (HUSA) y corresponde a la siguiente clasificación y especie.

Reyno	Plantae
Division	Magnoliophyta
Clase	Magnoliosida
Subclase	Asteridae
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Genero	Bidens
Especie	<i>Bidens pilosa</i> L.

Se expide la presente a solicitud del interesado para los fines que se estimen convenientes.

Arequipa 8 de junio del 2021

Mg. Leoncio Mariño Herrera
DIRECTOR
Herbarium Arequipense (HUSA)

Avenida Daniel Alcides Carrión s/n cercado
Teléfono: (054) 237755 / 993659045
Apartado Postal: 0028
AREQUIPA – PERÚ

Anexo 4 **CONSTANCIA DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL**

 UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO
FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
Ciudad Universitaria – Apartado 291 – Telefax: (051)366190 – Fax: (051)366190



CONSTANCIA

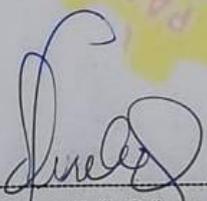
EL QUE SUSCRIBE, EL COORDINADOR DEL LABORATORIO DE OPERACIONES Y PROCESOS UNITARIOS DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO – PUNO.

HACE CONSTAR:

Que, la señorita: **TANIA MAMANI CONDORI**, identificada con DNI 70344325, ha realizado sus pruebas experimentales de su tesis, titulado "DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL ACEITE ESENCIAL DE LA CHIPACA (*BIDENS PILOSA*) FRENTE A *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* Y *ESCHERICHIA COLI*" en el Laboratorio de Operaciones y Procesos Unitarios (L.O.P.U.) de la Facultad de Ingeniería Química de la Universidad Nacional del Altiplano de Puno, del 15 al 18 de julio del 2019.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado para los fines que vea por conveniente.

Puno, C.U. 08 de enero del 2020



Ing. M.Sc. German Quille Calisaya
Coordinador del L.O.P.U.

Anexo 5 CERTIFICADO DE LABORATORIO DE BIOLOGÍA PARA DETERMINAR EL HALO DE INHIBICIÓN

	<p>Laboratorio de Investigación, Análisis y Diagnóstico Clínico</p> <p>LABORATORIO "ORION"</p> <p>Análisis de Sangre, Orina, Heces, Microbiológicos, ADN Jr. Lima N° 208 II piso Of. 09 *** Cel. 977563430 *** helarry@hotmail.com RUC 10013180861 ** RNP S016165 ** Certificación D.S. 023-87/SA ** LM N° 001202</p>	<p>CONVENIOS</p> <p>Laboratorios ROE</p> <p>Biogenómica</p> <p>S.I.B. Puno</p>
---	--	--

CERTIFICADO

El que suscribe, Gerente del Laboratorio de Investigación, Análisis y diagnóstico Clínico "ORION", mediante el presente documento:

CERTIFICA:

Qué, la Bach. TANIA MAMANI CONDORI y el Bach. PAULO CESAR QUISPE BELIZARIO, han ejecutado su proyecto de investigación titulado "DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE *Bidens pilosa* L. (Chipaca) FRENTE A *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*" desde el 29 de Julio del 2019 al 31 Julio del 2019, habiendo cumplido con el desarrollo de sus labores en la parte experimental demostrando habilidad, responsabilidad y eficiencia.

Se le expide la presente constancia a solicitud de los interesados para los fines que estime por conveniente.

Puno, 02 de Agosto del 2019


Bjpo. Herbert Larry Flores Rodríguez
GERENTE
CBP 4441

Anexo 3 EVIDENCIA FOTOGRÁFICA DE TRABAJO DE CAMPO

Análisis botánico de la extracción

Figura N 1 Recolección, y secado de la muestra botánica



Figura N 2 Extracción del aceite esencial en un equipo por arrastre de vapor



Figura N 3 Obtención Aceite esencial



Análisis microbiológico de *Staphylococcus aureus* y *Echerichia coli*

Figura N 4 Preparación del inóculo, sembrado en placa e incubación



Figura N 5 Aplicación de aceite esencial *Bidens pilosa* L.

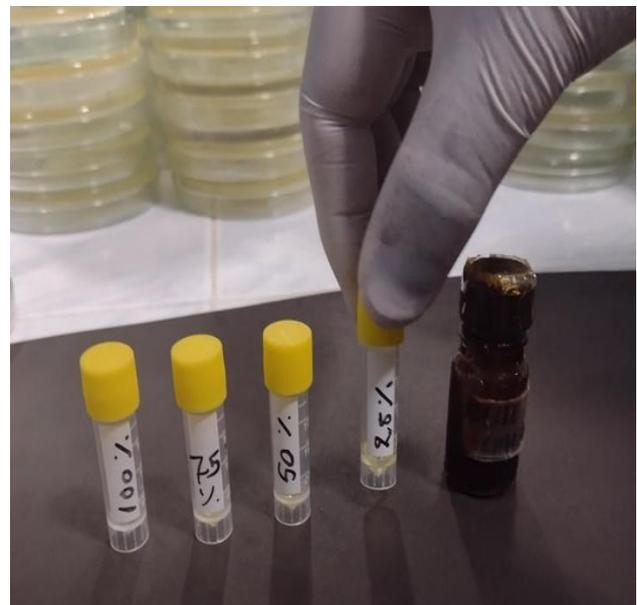


Figura N 6 Aplicación de discos de sensibilidad

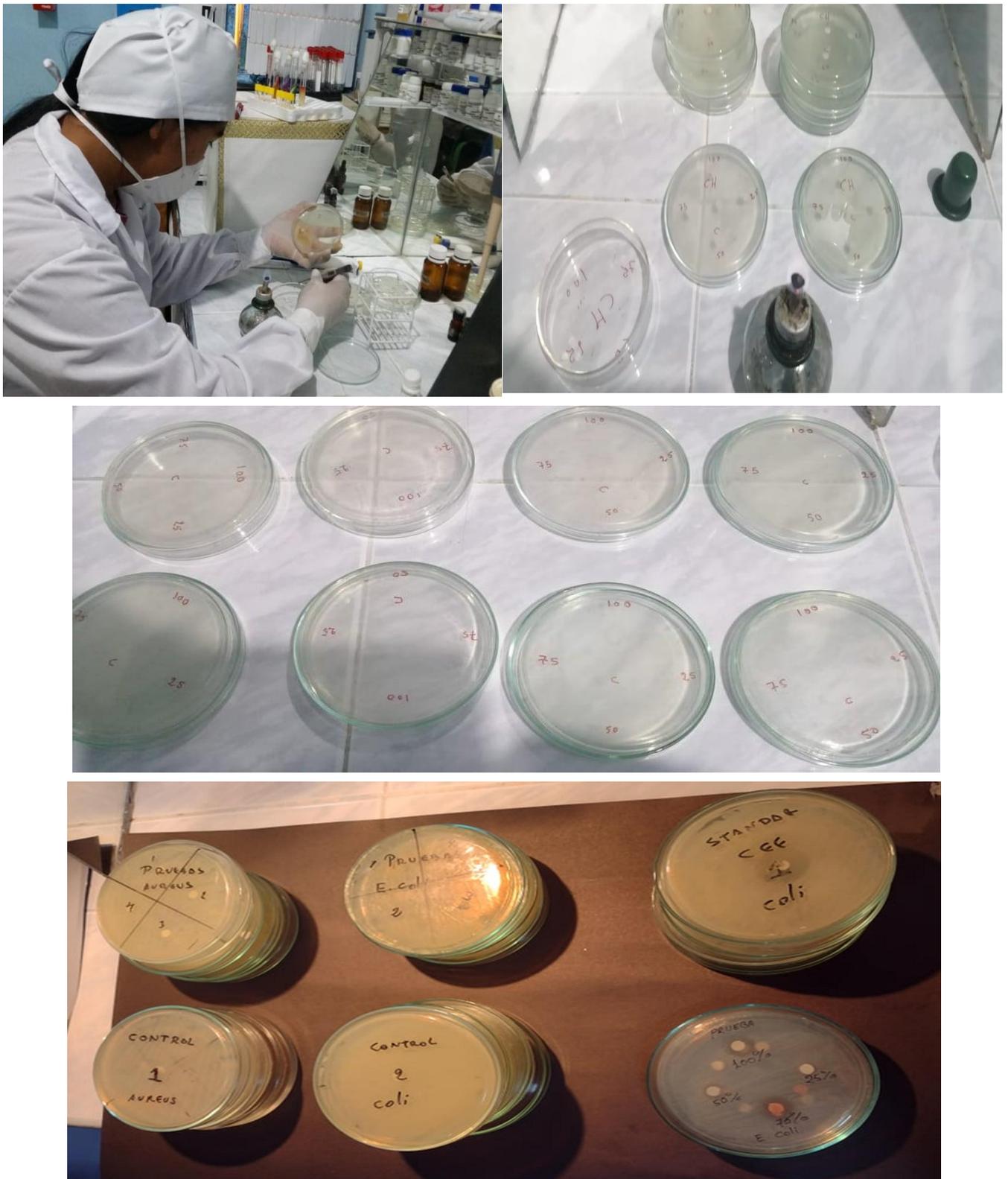
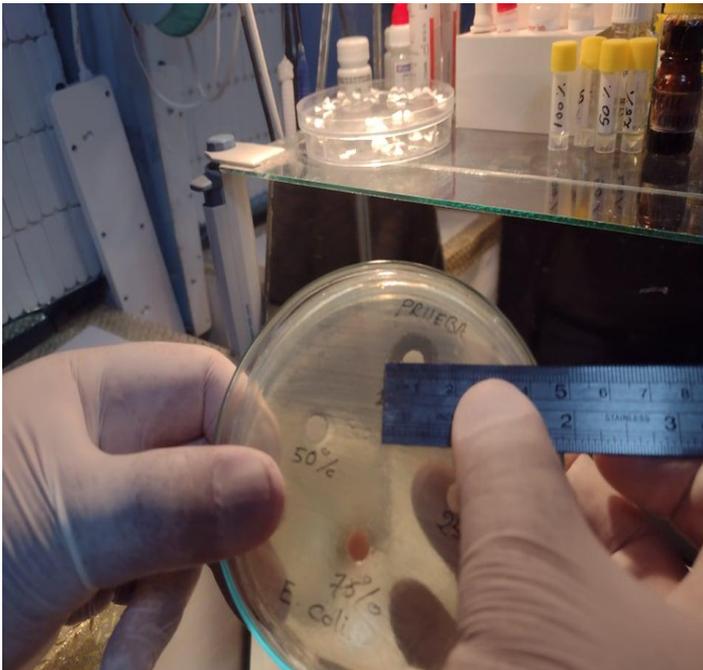
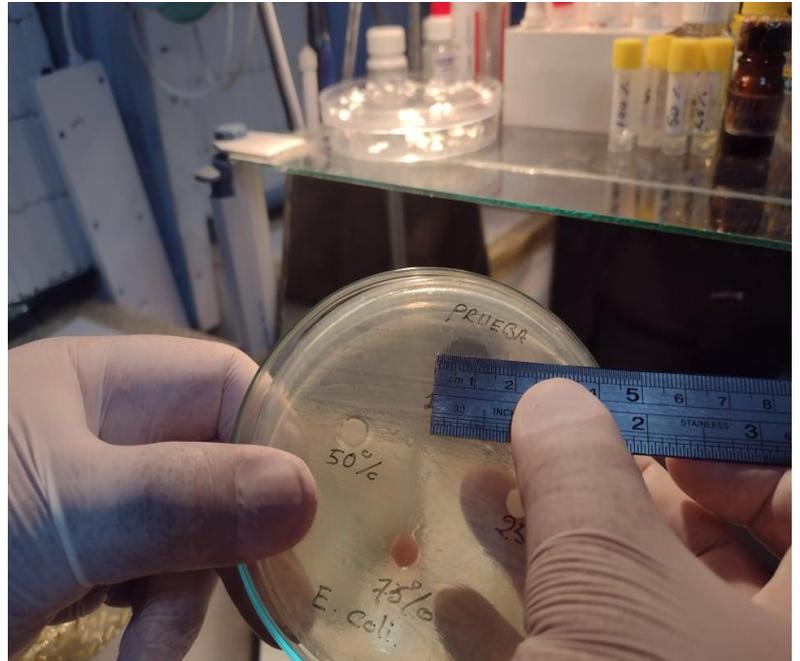


Figura N 7 medición de los halos de inhibición



Anexo 4 **RESULTADOS DE LA SENSIBILIDAD BACTERIANA**

Tabla N° 15 **Efecto de las diferentes concentraciones del aceite de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca) frente al *Staphylococcus aureus***

Concentración de aceite	Grado de sensibilidad						Total
	Resistente entre < 12 mm		Intermedio entre 13 - 14 mm		Sensible entre > 15 mm		
	N	%	N	%	N	%	
25%	20	100		0		0	20
50%	16	80	4	20		0	20
75%	1	5	19	95		0	20
100%		0	14	70	6	30	20

Figura N° 9 **Efecto de las diferentes concentraciones del aceite de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (Chipaca) frente al *Staphylococcus aureus***

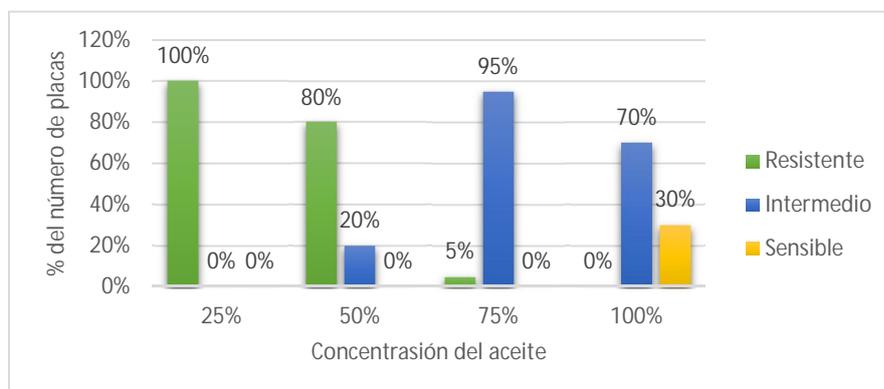


Tabla N° 16 Efecto de las diferentes concentraciones del aceite de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L.(Chipaca) Frente a *Escherichia coli*

Concentración de aceite	Grado de sensibilidad						Total
	Resistente entre < 13 mm		Intermedio entre 14 - 20 mm		Sensible entre > 21 mm		
	N	%	N	%	N	%	
25%	20	100	0	0	0	0	20
50%	20	100	0	0	0	0	20
75%	0	0	20	100	0	0	20
100%	0	0	20	100	0	0	20

Figura N° 10 Efecto de las diferentes concentraciones del aceite de hojas y tallos de *Bidens pilosa* L. (chipaca) frente al *Escherichia coli*

