



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

EFFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Ranunculus*
praemorsus Kunth ex DC (centella) FRENTE A CEPAS DE
Staphylococcus aureus ATCC: 25923

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO
FARMACÉUTICO

AUTORES:

Bach. MUÑOZ MENDO, JHAN CARLOS JOEL

<https://orcid.org/0000-0002-8088-615X>

Bach. IDROGO HUAMAN, GUIDO

<https://orcid.org/0000-0003-4439-5801>

ASESOR:

Dr. VILCHEZ CÁCEDA, HÉCTOR ALEXANDER

<https://orcid.org/0000-0001-7094-0821>

LIMA – PERÚ

2022

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación está dedicado de manera especial a mis padres, Baldomero Muñoz Gallardo y María Nelly Mendo Cabrera, grandes pilares de mi vida, por su infinito amor, preocupación, consejos, dulzura y confianza; que junto a mis hermanos, Wester Braulio Muñoz Mendo, Juan Baldomero Muñoz Mendo, Cinthya Nataly Muñoz Mendo y Adrián Valdelomar Muñoz Mendo, son mi fuerza que me incentivan a seguir adelante y a continuar con todos mis proyectos de vida para mi desarrollo personal y profesional.

Jhan Carlos Joel Muñoz Mendo.

El presente trabajo lo dedico especialmente a Dios, por darme las fuerzas y ser el inspirador de mi vida para concluir con mis metas trazadas. A mis padres Augusto Idrogo Mejía y Luz Marina Huamán Eugenio, por el gran ejemplo y apoyo incondicional, a mi querida hermana María Olga y a mis hermanos Willan, Ilder, Yober, Ulises, por darme la confianza, preocupación, paciencia, y gran ejemplo de perseverancia, para continuar con este proceso de obtener uno de mis anhelos más deseados de mi vida.

Guido Idrogo Huamán

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios Padre Celestial, por haber estado presente en todas mis acciones, por guiar siempre mis pasos, protegerme y haberme permitido tener la salud y la oportunidad de continuar con mis estudios de manera satisfactoria.

A la Universidad María Auxiliadora y sus autoridades, de manera particular al Dr. Héctor Alexander Vilchez Cáceda, por su asesoramiento incondicional y brindarme su paciencia, apoyo y tiempo para hacer realidad la presente investigación.

Jhan Carlos Joel Muñoz Mendo.

A nuestro creador, que nos guía cada día, ilumina nuestro camino y darnos la salud que esperamos para lograr nuestras metas trazadas.

A todos nuestros maestros por compartir sus conocimientos con nosotros para ser mejores profesionales.

A las autoridades de la Universidad María Auxiliadora, por darnos la oportunidad de culminar nuestra formación profesional.

Al Dr. Héctor Alexander Vilchez Cáceda, por su asesoramiento incondicional y brindarme su paciencia, apoyo y tiempo para hacer realidad la presente investigación.

A todos los que de una y otra manera contribuyeron en nuestro desarrollo personal y profesional.

Guido Idrogo Huamán

Índice General

	Páginas
Resumen	viii
Abstract	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MATERIALES Y MÉTODOS	8
II.1 Enfoque y diseño de la investigación	8
II.2 Población, muestra y muestreo	9
II.3 Variables de investigación	10
II.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	12
II.5 Proceso de recolección de datos	13
II.6 Métodos de análisis estadístico	16
II.7 Aspectos éticos	17
III. RESULTADOS	18
IV. DISCUSIÓN	25
IV.1 Discusión de resultados	25
IV.2 Conclusiones	28
IV.3 Recomendaciones	29
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
ANEXOS	38

Índice de Tablas

Tabla 1. Solubilidades del extracto	18
Tabla 2. Tamizaje fitoquímico	19
Tabla 3. Resultado del análisis in vitro por el método Kirby Bauer	20

Índice de Figuras

Figura 1. Tratamiento de la muestra	45
Figura 2. Análisis fitoquímico	46
Figura 3. Análisis microbiológico	47

Índice de Anexos

Anexo A. Instrumento de recolección de datos	39
Anexo B. Matriz de consistencia	39
Anexo C. Operacionalización de variables	40
Anexo D. Clasificación taxonómica	42
Anexo E. Certificado de análisis de laboratorio	43
Anexo F. Certificado de la cepa	44
Anexo G. Evidencias fotográficas del trabajo de campo	45

RESUMEN

Hay bacterias que han desarrollado fácilmente resistencia a muchos medicamentos entre ellos a los antibacterianos; resultando casos difíciles de tratar. A nivel mundial la resistencia bacteriana es un problema de salud que alarga el tratamiento y costos tanto económicos como para el bienestar de los afectados que no tienen capacidad de afrontar; esto genera la necesidad de utilizar recursos vegetales medicinales que contengan fuentes de compuestos importantes como efecto antibacteriano, para considerarlo como alternativa farmacéutica y así poder reducir la resistencia bactericida. **Objetivo:** Evaluar el efecto antibacteriano in vitro el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923. **Metodología:** La susceptibilidad in vitro de *Staphylococcus aureus* frente al extracto hidroalcohólico con actividad antibacteriana, fue evaluada mediante el método de Difusión en disco – Kirby Bauer, en concentraciones de 20 %, 40 %, 60 % del extracto, comparado con discos embebidos de Gentamicina de 10 µg como positivo y discos embebidos con alcohol de 70°. El extracto se realizó basándose en la consistencia del producto a una concentración efectiva inhibitoria del extracto. Luego se evaluó los halos de inhibición bacteriana comparado con los controles positivo y negativo para ver el efecto. **Resultados:** Los resultados evidenciaron que no presenta efecto antibacteriano el extracto hidroalcohólico de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, no evidenciándose halos de inhibición. **Conclusión:** El extracto hidroalcohólico de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) no tiene efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923.

Palabras clave: *Ranunculus praemorsus*, *Staphylococcus aureus*, halos de inhibición, antibacteriano.

ABSTRACT

There are bacteria that have easily developed resistance to many drugs, including antibacterials; resulting in difficult cases to treat. At a global level, bacterial resistance is a health problem that lengthens treatment and costs both economically and for the well-being of those affected who do not have the capacity to cope; This generates the need to use medicinal plant resources that contain sources of important compounds as an antibacterial effect, to consider it as a pharmaceutical alternative and thus be able to reduce bactericidal resistance. Objective: To evaluate the antibacterial effect in vitro of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923. Methodology: The in vitro susceptibility of *Staphylococcus aureus* against the hydroalcoholic extract with antibacterial activity, It was evaluated by means of the disk Diffusion method - Kirby Bauer, in concentrations of 20 %, 40 %, 60 % of the extract, compared with 10 µg Gentamicin soaked disks as positive and 70 ° alcohol soaked disks. The extract was made based on the consistency of the product at an inhibitory effective concentration of the extract. The halos of bacterial inhibition were then evaluated compared to the positive and negative controls to see the effect. Results: The results showed that the hydroalcoholic extract of *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) does not present antibacterial effect against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, with no evidence of inhibition halos. Conclusion: The hydroalcoholic extract of *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) has no antibacterial effect against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923.

Key words: *Ranunculus praemorsus*, *Staphylococcus aureus*, inhibition halos, antibacterial.

I. INTRODUCCIÓN

Muchas infecciones bacterianas son la causa de patologías, con importantes costos tanto económicos como para el bienestar de los afectados, el valor del control y prevención de las infecciones bacterianas multirresistentes se debe a que genera dificultades en el ámbito de la salud en todo el mundo debido al abuso de los antibióticos¹.

Según la Organización Mundial de la Salud la cepa bacteriana son los principales patógenos involucrados en infecciones sistémicas con alta morbilidad y según una reciente publicación del Centro Europeo para la Prevención y Control de las Enfermedades, *Staphylococcus aureus* ocupa segundo lugar como agente bacteriano en la infección nosocomial después de *Escherichia coli* con un 15,9 % de los casos; el primer caso de resistencia fue a la meticilina lo cual se publicó en inicios de los sesenta del siglo pretérito; después de 20 años, el agente etiológico de SARM se expandió volviéndose una de las primordiales causas de las infecciones intrahospitalarias².

En Perú, se reportaron varios casos de infección producidos por *Staphylococcus aureus* los primeros casos de resistencia comunitaria a la meticilina, estas cepas por lo tanto estarían rodeando la sociedad mediante el asentamiento nasal. De acuerdo a informes de infecciones graves por AC-SARM producidos en países cercanos, se está volviendo prioridad monitorear los reservorios de esta cepa bacteriana³.

Desde el año 2006 al 2014 en el Hospital Nacional Hipólito Unanue se demostró 1037 casos y fueron separados para tratamiento de MRSA y 76 de VRE, las cuales van de forma creciente por año, la colonización continua de *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* siguen siendo resistentes a meticilina (MRSA) y vancomicina (VRE), por lo general se presentó en los departamentos de cuidados intensivos e intermedios. Lima, Perú 2006-2014⁴.

Desde tiempos ancestrales la fitoterapia ha sido parte del tratamiento de enfermedades crónicas y leves, las plantas medicinales tienen un gran aporte fitoquímico para el organismo, confiriendo a la medicina andina un carácter

fundamentalmente fitoterapéutica; la manufactura farmacéutica en la actualidad se está basado en este conocimiento para la síntesis y elaboración de fármacos, verificando científicamente estas tradiciones y descubriendo nuevas aplicaciones para la salud⁵.

En nuestro país disponemos diversas riquezas naturales medicinales, presentes en raíces, tallos, hojas entre otros; *Origanum vulgare* (orégano), *Tagetes elliptica* (chincho) tiene efecto antimicrobiano que se comparó con Clorhexidina al 0,12 % y Colgate Plax contra agentes etiológicos de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 así mismo de *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277; *Tagetes minuta* (huacatay) también posee efecto antimicrobiano⁶.

En nuestro Perú se realizó un estudio del recurso vegetal de *Anacardium occidentale* Linn. (casho), usando el procedimiento del antibiograma de discos; encontrándose efectos antibacterianos comparados con Gentamicina 10 microgramos, mostrando índices de 17.5 mm, 8.0 mm, 6.7 mm y 6.0 mm en la zona de inhibición, donde la cepa bacteriana de experimentación fue *Staphylococcus aureus*⁷.

Las bacterias como *Staphylococcus aureus* colonizan e infectan a pacientes con o sin anomalías inmunológicas y hospitalizados⁸.

Staphylococcus aureus está manifestando gradualmente resistencia a casi todos los bactericidas y bacteriostáticos disponibles para tratar infecciones que la producen. Hay 3 formas de resistencia frente antibióticos contra betalactamasas de *S. aureus*, mediados por catalizador (penicilinasas o β -lactamasas) que inactivan al antibiótico⁹.

Staphylococcus aureus es caracterizada por ser una principal causa de bacteriemia nosocomial a nivel mundial, por su patogenicidad, virulencia y la expresión grandes variedad de proteínas pertenecientes a las moléculas de su matriz adhesiva (MSCRAMM), formando una biopelícula y sobreviviendo a los factores antimicrobianos¹⁰.

El género *Ranunculus* se halla en América del Sur principalmente en Ecuador, Colombia, Venezuela, Perú y Bolivia extendiéndose por las cadenas montañosas

del Sur, Centro de la selva Paranaense de Argentina y al Norte por las septentrionales selvas de México (Lourteig, 1956)¹¹. La especie de *Ranunculus praemorsus* se distribuye en nuestro país por las regiones de la sierra central de Ancash, Cusco, Apurímac, Puno, Junín y Cajamarca; distribuyéndose geográficamente desde Colombia hasta Bolivia (Weberbauer, 1945; Roersch, 1994)¹².

Los usos tradicionales de la especie vegetal que se conocen son:

- Su preparación es de cocimiento y al estado fresco¹².
- A las hojas y tallo se le atribuye su propiedad medicinal¹².
- Se usa molido en forma de pasta tópica aplicando sobre la piel, que se usa para tratar los hongos de las uñas, heridas, quemaduras, alergias, tratamiento de los abscesos y dolores reumáticos. (Soukup, 1965, Roersch, 1994, García, 1992)¹³.
- Actúa como antibacteriano a nivel de la piel¹³.
- No debe usarse internamente, se considera tóxico, en dosis adecuadas y usado externamente es medicinal (Pérez, 1990)¹³.

El recurso vegetal en investigación contiene Antraquinonas, flavonoides, alcaloides, triterpenos y esteroides, Lactonas alfa- beta insaturadas, cumarinas, antocianinas, azúcares reductores, saponinas, compuestos fenólicos¹³.

Entre los antecedentes al desarrollo del trabajo de investigación se dispone de los siguientes:

Condori L. (2018), Demostro que el extracto hidroalcohólico de *Ranunculus praemorsus* H.B.K ex DC, tiene efecto cicatrizante. En el estudio fitoquímico preliminar del extracto de las raíces secas determino que presenta metabolitos secundarios como son los alcaloides, flavonoides. Y en condiciones experimentales del extracto hidroalcohólico al 20 % demostró actividad cicatrizante a dosis de 200 mg/kg^{12,31}

Dejhima A, et al (2021), Caracterizaron la composición de los extractos de acetato de etilo y *n* -butanol de *Ranunculus macrophyllus* Desf. así como

dilucidar y comparar su efecto frente a la inflamación aguda de la piel. Además, también se estudió la actividad antioxidante y la toxicidad aguda de los extractos de plantas. La fracción de acetato de etilo mostró las mayores cantidades de compuestos fenólicos totales y Triterpenoides, además una capacidad antioxidante^{14,32}.

Madhulika, et al (2020), Determinaron mediante análisis de espectroscopia y cromatografía la presencia de fitoconstituyentes en *Ranunculus sceleratus* Linn. Revelando la presencia de flavonoides y fenoles que pueden ayudar con fines medicinales y comerciales^{15,34}.

Atci H, et al (2018), Determinaron la actividad antimicrobiana de *Ranunculus cericeus* Banks & Sol frente a *Staphylococcus aureus* y la actividad antifúngica contra hongos de tipo *Alternaria sp.* Los resultados indicaron que las fracciones de acetona y metanol tiene una actividad antibacteriana y antifúngica moderada^{16,36}.

Nolasco A, et al (2020), determinaron la efectividad antimicrobiana en el experimento de la solución que contiene un extracto hidroalcohólico del recurso vegetal de *Passiflora ligularis* Juss. “Granadilla” contra cepas certificadas de *Staphylococcus aureus*. La prueba de control en el que se basó fue el fármaco Amoxicilina, usando la prueba de análisis de varianza (ANOVA) hubo una desigualdad importante de tratamientos con una estimación de $p < 0,05$. Por último, el preparado que contiene la solución hidroalcohólica tuvo efectos antibacterianos contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923¹⁷.

Pérez S, et al (2019), determinaron la actividad antimicrobiana de los principios activos de *Aspergillus fumigatus* sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. Finalmente concluyeron lo siguiente, el extracto de *Aspergillus fumigatus* tiene alcaloides, esteroides y terpenos; que contiene acción antibacteriana en agentes etiológicos de *Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes¹⁸.

Aranguri D, et al (2017), determinaron que *Gentianella bicolor* "campanilla morada" en estudio in vitro que las propiedades físicas y químicas de la planta tiene inhibición antibacteriana contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*¹⁹. Se identificaron antocianidinas, alcaloides, azúcares reductores, saponinas, aminoácidos, Triterpenoides y / o esteroides cualitativos, lípidos, flavonoides y taninos. Finalmente concluyeron que presenta efecto antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*^{19,21}.

La justificación del estudio fue debido al incremento de enfermedades por infecciones bacterianas, entre ellas *Staphylococcus aureus* que presentan resistencia a meticilina, que con frecuencia se dio en personas que acudieron al Hospital "Dr. Gustavo Aldereguía Lima", 55,0 %, ocasionando especialmente contagios en la epidermis y mucosas 50,6 %. Quedando evidencia de la pérdida del efecto farmacológico a macrólidos de segunda generación como azitromicina y eritromicina, mostrándose en pacientes que estaban en proceso de recuperación como en personas que se atendieron por consulta externa²⁰. Razón por lo cual se estudia nuevas alternativas farmacológicas para combatir a patógenos oportunistas con recursos naturales medicinales, la especie *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella), las hojas machacadas se aplican contra la micosis de las uñas, heridas, quemaduras, alergias y tratamiento de abscesos como también para dolores reumáticos; el cocimiento es empírico y tradicional.

El objetivo general del estudio fue evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923.

La hipótesis general del estudio se describió como:

El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) presenta efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923

II. MATERIALES Y MÉTODOS

II.1. Enfoque y diseño de la investigación

Enfoque: Cuantitativo.

Experimental: Ya que se vieron manipuladas las variables en condiciones altamente controladas.

Analítico: Porque fue un estudio que evaluó la igualdad entre las variables de correlación o causalidad.

Descriptivo: Se trató de una investigación que se limita a medir la presencia, distribución o características de un fenómeno en una población durante un periodo de tiempo corto; una determinada enfermedad, mortalidad en la población entre otras.

Explicativo: Porque se buscó interpretar la ocurrencia de un fenómeno.

Correlacional: Fueron procedimientos investigados en los cuales se trata de determinar la relación existente entre dos o más variables de estudio, manipulándolas específicamente.

II.2. Población, muestra y muestreo

La población vegetal: Fue constituida por 8 kilos de tallos y hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella) procedentes del caserío Matarita, distrito de Matara, provincia de Cajamarca, a una altitud de 2819 m.s.n.m, en las coordenadas UTM: E: 803376.9 y N: 96773.7.

La población Microbiológica: Fue constituida por cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923, facilitadas por el Laboratorio Santa Rosa.

La muestra: Estuvo constituida por 317.4 gramos de hojas secas.

El muestreo: Fue no aleatorio considerando la zona de cultivo. Los 8 kilos de hojas fue recolectadas en el caserío de Matarita, Distrito Matara, provincia Cajamarca.

Muestra:

- Hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella)

1. Recepción de muestra

- Fecha : 15-11-21
- Cantidad recibida : 1582.6 g

2. Tratamiento y extracción de la droga vegetal

2.1 Tratamiento de la droga vegetal

Con el fin de adecuar la muestra para el posterior proceso de preparación del extracto hidroalcohólico, se realizaron las siguientes operaciones previas:

Selección y Limpieza

Se eliminó cuidadosamente los tallos y la tierra que pudiera estar adherida sobre la superficie de las hojas, así como aquellas que estuvieran en mal estado o con signos de contaminación microbiana o por insectos.

- Cantidad de muestra : 1582.6 g
- Cantidad hojas selecta: 1501.4 g
- Cantidad de residuos: : 81.2 g

Lavado

Con este proceso se eliminó todos los vestigios de tierra que pudieran haber quedado sobre las hojas aplicando un flujo continuo de agua potable a temperatura ambiente, posteriormente se desinfectó empleando una solución de hipoclorito de sodio, se enjuagó con agua destilada y se dejó a escurrir.

Secado

Este proceso consiste en eliminar gran parte del agua de la especie. Esto debido a que la presencia de agua es el principal responsable de la

alteración de la planta recolectada. Al descender la cantidad de agua, las enzimas detienen su actividad, quedan inhibidas y la planta se conserva. Así mismo facilita el proceso de extracción.

En este caso la muestra fue distribuida sobre bandejas de papel kraft y secada por 72 horas empleando una estufa con aire recirculante a una temperatura de 40 °C.

- Tiempo de secado: 72 horas
- Temperatura de secado: 40 °C
- Peso obtenido luego de proceso: 317.4 g

Molienda

La muestra una vez seca fue sometida a trituración mecánica empleando un mortero y pilón de porcelana, con la finalidad de reducir el tamaño de partículas y aumentar el número de las mismas para de esta manera hacer más eficiente el proceso de extracción al incrementar la superficie de contacto.

- Peso obtenido luego de la molienda: 316.8 g

Extracción

Macerado

El proceso de extracción se realizó macerando, dentro de un frasco ámbar, el material obtenido luego de la molienda con etanol de 70°. El proceso de maceración se realizó durante 7 días, sometiéndose a agitación mecánica cada 8 horas.

- Cantidad de muestra a macerar: 200 g
- Solvente: etanol 70 °
- Cantidad de solvente: 1500 mL
- Días de macerado: 7 días

Filtrado

El líquido resultante del proceso de maceración fue filtrado empleando papel de filtro whatman N°1 y un embudo de vidrio.

- Cantidad líquido filtrado: 1250 ml

□ **Obtención extracto seco**

Para facilitar la evaporación del disolvente, el líquido filtrado fue vertido sobre placas petri de vidrio y fue llevado a estufa de aire recirculante a una temperatura de 40 °C hasta sequedad.

- Cantidad líquido a secar: 1250 ml
- Temperatura: 40 °C
- Tiempo de secado: 72 horas
- Cantidad extracto obtenido: 27.8 g

II.3. Variables de investigación

Variable independiente: Extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella).

Variable dependiente: Efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

II.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Ficha ad doc. de obtención de datos para la acción farmacológica:

- Prueba de solubilidad
- Marcha fitoquímica
- Actividad antibacteriana

II.5. Plan metodológico para recolección de datos

Los datos se expresaron como la media \pm la desviación estándar de la media (DS) del grupo problema y del grupo control.

II.5.1 Análisis previo del extracto hidroalcohólico

a. **Índice afrosimétrico (IA):** Colocamos 1.0 g de melcocha en una probeta, luego adicionamos 10 ml de agua desionizada. Se agitó por un tiempo de 2 minutos donde se evidenció espuma. Lo que indica la existencia de saponinas²².

b. **Determinación de pH a 25 °C:** En un tubo de ensayo, se adicionó 0,5 g de extracto fluido de la muestra en 5 ml de etanol al 70 %, se agita constantemente hasta disolución a 25 °C. obteniendo 6.5 de pH.

Se analizó el pH con un equipo para medir denominado pHmetro marca Hanna.

c. **Prueba de solubilidad:** En diferentes tubos de ensayo se agregó 0,5 gramos de extracto seco (melcocha) y 5 ml de solventes Éter de petróleo, cloroformo, Diclorometano, Butanol, etanol 96, etanol de 70, Metanol y agua destilada, lo cual presentó solubilidad en la escala polar ligeramente alcohólica.

II.5.2. Marcha fitoquímica

El screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, se orientará la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés, siguiendo los lineamientos de Olga Look de Ugaz²³.

En el siguiente estudio fotoquímico inicial se encontró la presencia de compuestos fenólicos, taninos, flavonoides, alcaloides, triterpenoides y glicósidos cardiotónicos²⁴.

II.5.3. Actividad antibacteriana por el método Kirby Bauer

Método

Método: Difusión en disco - Kirby Bauer

Consistió en depositar sobre la superficie de una placa de petri con agar previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante

impregnados con diferentes sustancias antibióticas.

a) Preparación de Medio de Cultivo

- Agar Mueller Hinton

El medio de cultivo fue preparado partiendo de la base deshidratada y siguiendo las indicaciones proporcionadas por el fabricante.

- ✓ Se pesó 7.6 de Agar Mueller Hinton deshidratado y se adicionó 200 ml de agua destilada, posteriormente se procedió a calentar con agitación constante hasta lograr la disolución total del medio de cultivo, por último, se esterilizó empleando una autoclave sometiendo al medio de cultivo a 15 libras de presión (121 °C) durante 15 minutos.
- ✓ Una vez finalizado el proceso en la autoclave se dejó enfriar hasta que el medio de cultivo alcanzó una temperatura entre 45 °C – 50 °C y se distribuyó en placas petri estériles de 90 x 15 mm.

b) Activación de la cepa antibacteriana: Kwik-stik microbiologics - *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Para preparar el inóculo se empleó el producto Kwik-stik microbiologics® que contiene a las cepas de *Staphylococcus aureus* en un pellet.

- El Kwik-stik tiene en la parte superior una ampolla con líquido hidratante, el cual fue liberado al apretar una sola vez la mencionada ampolla que se encuentra en la tapa. Luego de realizar esta operación el Kwik-stik se mantuvo en posición vertical para facilitar el flujo del líquido por el mango hasta la parte inferior de la unidad, que contiene el gránulo.
- Por último, se presionó la parte inferior de la unidad para lograr una suspensión homogénea.
- De inmediato se procedió a saturar el hisopo, que contiene el producto, con el material hidratado y se transfirió a una placa con agar TSA, la cual fue incubada a 35 ± 2 °C. durante 16-18 horas.

- c) Preparación de los extractos a ensayar:** fue preparada a diferentes concentraciones con etanol al 70 %, (20 %, 40 %, 60 %) para posteriormente usarlos en pruebas microbiológicas²⁵.
- d) Reactivación de la cepa:** Después de obtener la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 liofilizada, ésta fue inoculada usando agar tripticasa soja (TSA) y se incubó a 35 °C. por 24 a 48 horas como se indica²⁶.
- e) Preparación del inóculo:** Usando probetas con caldo nutritivo, se usó un asa de Kolle a un diámetro de diez centímetros de un mechero para siembra del inóculo en placas de laboratorio que contengan agar Mueller-Hinton, seguidamente las placas inoculadas se colocarán en una incubadora a 37 °C por 24 horas, que será adaptada a turbidez de 0,5 escala de McFarland ($1,0 \times 10^8$ UFC/ml)²⁷.

Se realizó la suspensión directa, en solución salina (cloruro de sodio 0.9 %), de colonias obtenidas de cada una de las placas anteriormente incubadas durante 24 horas²⁸.

- f) Inoculación de placas:** Los inóculos bacterianos ya estandarizados se depositaron sobre la superficie del medio de cultivo sólido, con ayuda de un hisopo esterilizado y siguiendo tres direcciones de siembra. Se logrará una buena disgregación del inóculo.
- Dentro de los 15 minutos posteriores al ajuste de la turbidez del inóculo, se procedió a sumergir un hisopo estéril en la suspensión obtenida; el hisopo se frotó varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo y por encima del nivel del líquido, esto con la finalidad de remover el exceso de inóculo.
 - Posteriormente se inoculó sobre la superficie seca del agar Muller Hinton, para esto se realizaron estrías en tres direcciones diferentes rotando la placa 60° cada vez, esto con la finalidad de asegurar una distribución uniforme del inóculo.
 - Previamente todas las placas fueron marcadas para posteriormente colocar los discos.

g) Grupos a ensayar:

Para la preparación de los discos se emplearon discos de papel whatman N° 1 de 6 mm de diámetro previamente esteriles. Cada uno de los discos fue embebido con 10 uL de muestra de la siguiente manera:

- Discos embebidos con extracto de hojas de centella 60 %
- Discos embebidos con extracto de hojas de centella 40 %
- Discos embebidos con extracto de hojas de centella 20 %
- Discos embebidos con alcohol de 70 °
- Discos de gentamicina de 10 ug.

Posteriormente los discos fueron puestos sobre la superficie del medio de cultivo sólido previamente inoculado con las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923.

h) Incubación:

Las placas se incubaron durante 16- 18 horas en posición invertida a 35 ± 2 °C dentro de los 15 minutos siguientes a la aplicación de los discos.

i) Interpretación de resultados: La lectura de los halos de inhibición se realizó con ayuda de un vernier.

II.6. Procesamiento del análisis estadístico

Estos antecedentes se analizaron utilizando un software estadístico SPSS versión 25, y las estadísticas descriptivas de los conjuntos de datos se obtuvieron con un 95 % de confianza. Confirmado una vez esto, se realizaron las pruebas de ANOVA y Tukey usando un alfa de 0,05.

II.7. Aspectos éticos

La presente propuesta de estudio se basó en estándares éticos durante su desarrollo, ya que se respeta normas de bioseguridad en laboratorios y respeto al medio ambiente, disponiendo del manejo adecuado de los residuos sólidos y biocontaminados, aplicando la normativa de bioseguridad y lineamientos de Helsinki³⁰.

III. RESULTADOS

III.1. Análisis de pH

En la tabla 1 se muestran los resultados del análisis de pH del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (centella).

Tabla 1. Resultados del ensayo de pH

N°	ANALISIS	RESULTADO
1	pH	6.5

Fuente: Elaboración propia

Los resultados de pH muestran 6.5 para el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (Centella).

3.1. Prueba de Solubilidad

Tabla 2. Resultados del ensayo de solubilidad

N°	SOLVENTE	RESULTADOS
1	Éter de petróleo	-
2	Diclorometano	-
3	Cloroformo	+
4	Butanol	-
5	Etanol 96	+
6	Etanol 70	+++
7	Metanol	++
8	Agua destilada	++

Dónde: (-) Insoluble (+) Poco soluble (++) Soluble (+++) Muy soluble

En la tabla 2 se puede apreciar que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (Centella) fue muy soluble en etanol de 70°, soluble en metanol y agua, poco soluble en etanol de 96° y Cloroformo. A diferencia de los solventes orgánicos que fue insoluble.

III.2. Tamizaje fitoquímico

Tabla 3. Resultados del ensayo fitoquímico

N°	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	Benedict	Azúcares reductores	++
12	Fehling A y B	Azúcares reductores	+++
13	Espuma	Saponinas	+
14	Shinoda	Flavonoides	-
15	Ninhidrina	Aminoácidos libres	-

Dónde: (-) Ausencia (+) Leve (++) Moderado (+++) Abundante

En la tabla 3 del tamizaje fotoquímico en las pruebas de Cloruro férrico, Dragendorff, Baljet, Fehling A y B las identificaciones fueron abundantes para Compuestos fenólicos, Alcaloides, Lactonas α , β -insaturadas y Azucars reductores. Con las pruebas de Dragendorff, NaOH 10 %, Benedict, Liebermann-Burchard, Mayer, Wagner, Gelatina-sal, Espuma dieron leve a moderado para Antraquinonas, Antocianinas, Azucars reductores, Terpenos y esteroides, Alcaloides, Taninos y Saponinas. Cabe resaltar que no se logró identificar flavonoides y aminoácidos libres.

III.3. Ensayo microbiológico

Tabla 4. Halos de inhibición del ensayo microbiológico en *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm				
	20 %	40 %	60 %	Gentamicina 10 ug	Etanol 70°
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6	6	6	25,09	6
	6	6	6	25,04	6
	6	6	6	25,15	6
	6	6	6	24,96	6
	6	6	6	25,05	6
	6	6	6	24,98	6
	6	6	6	25,14	6
	6	6	6	25,00	6
	6	6	6	25,04	6
	6	6	6	25,03	6
Media	6	6	6	25,05	6

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

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

En la tabla 4 se muestran los resultados del ensayo microbiológico in vitro. Esto hace evidencia que el mayor halo de inhibición medio lo obtuvo el grupo Gentamicina 10 ug con 25,05 mm frente a *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923. Sin embargo, los grupos experimentales 20, 40 y 60 % evidenciaron un halo inhibición medio de 6,00 mm.

Tabla 5. Estadísticos descriptivos de los resultados del ensayo microbiológico

Descriptivos			
		Estadístico	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Media	9,8096	
	95 % de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	7,6223
		Límite superior	11,9969
	Media recortada al 5 %	9,1699	
	Mediana	6,0000	
	Varianza	59,238	
	Desv. Desviación	7,69660	
	Mínimo	6,00	
	Máximo	25,15	
	Rango	19,15	
	Rango intercuartil	,00	
	Asimetría	1,547	
	Curtosis	,407	

En la tabla 5 se muestran los datos que corresponden a la estadística descriptiva con 95 % de intervalo de confianza para las medidas de tendencia central (media, mediana) y medidas de dispersión (rango, desviación estándar) correspondientemente.

Para determinar la docimasia de las hipótesis planteadas es indispensable saber si la distribución de los resultados del ensayo microbiológico in vitro es normal o no, para esto se usó la prueba estadística de Shapiro-Wilk ubicada en la tabla 6.

Tabla 6. Prueba de normalidad por la prueba de Shapiro-Wilk

Pruebas de normalidad						
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	,490	50	,000	,491	50	,000
a. Corrección de significación de Lilliefors						

La tabla 6 muestra que el valor de la significancia asintótica bilateral es menor al 0.05 ($p < 0,05$) según la prueba de Shapiro-Wilk para los resultados del ensayo microbiológico in vitro. Esto es evidencia de que no existe distribución normal en los resultados.

Tabla 7. Comparación de medias por ANOVA.

ANOVA					
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923					
	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	2902,610	4	725,653	913153,450	,000
Dentro de grupos	,036	45	,001		
Total	2902,646	49			

Ya que no se evidenció distribución normal de los resultados, se ejecutó un estadístico inferencial para determinar diferencia de medias a través del análisis de varianzas (ANOVA). La tabla 7 muestra un valor de significancia asintótica bilateral menor al 0.05 para los resultados del ensayo microbiológico in vitro con la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* ATCC: 25923. Esto es evidencia de que existe diferencia estadísticamente significativa entre los halos de inhibición medio entre los grupos del ensayo microbiológico según el estadístico ANOVA.

Para determinar si existen diferencias entre los halos de inhibición medio entre los grupos mediante múltiples comparaciones se utilizó el estadístico de Tukey.

La tabla 8 muestra que los valores de significancia asintótica bilateral son mayores al 0.05 en las comparaciones entre los grupos al 20, 40 y 60 % frente al grupo control (Etanol 70 °) en el ensayo microbiológico con la cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Esto es evidencia de que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos experimentales y el control. Sin embargo, se evidencia una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo Gentamicina 10 ug y los grupos experimentales que favorece al grupo Gentamicina. Esto es evidencia de que los grupos experimentales al 20, 40 y 60 % no presentan efecto inhibitor del crecimiento de la cepa *Staphylococcus aureus*.

Tabla 8. Comparaciones múltiples por la prueba de Tukey

Comparaciones múltiples						
Variable dependiente: <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923						
HSD Tukey						
(I) Grupo	(J) Grupo	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Gentamicina 10 ug	Control (Etanol 70 °)	19,04800*	,01261	,000	19,0122	19,0838
	Ext. 20 %	19,04800*	,01261	,000	19,0122	19,0838
	Ext. 40 %	19,04800*	,01261	,000	19,0122	19,0838
	Ext. 60 %	19,04800*	,01261	,000	19,0122	19,0838
Control (Etanol 70°)	Gentamicina 10 ug	-19,04800*	,01261	,000	-19,0838	-19,0122
	Ext. 20 %	,00000	,01261	1,000	-,0358	,0358
	Ext. 40 %	,00000	,01261	1,000	-,0358	,0358
	Ext. 60 %	,00000	,01261	1,000	-,0358	,0358
Ext. 20 %	Gentamicina 10 ug	-19,04800*	,01261	,000	-19,0838	-19,0122
	Control (Etanol 70 °)	,00000	,01261	1,000	-,0358	,0358
	Ext. 40 %	,00000	,01261	1,000	-,0358	,0358
	Ext. 60 %	,00000	,01261	1,000	-,0358	,0358
Ext. 40 %	Gentamicina 10 ug	-19,04800*	,01261	,000	-19,0838	-19,0122
	Control (Etanol 70 °)	,00000	,01261	1,000	-,0358	,0358
	Ext. 20 %	,00000	,01261	1,000	-,0358	,0358
	Ext. 60 %	,00000	,01261	1,000	-,0358	,0358
Ext. 60 %	Gentamicina 10 ug	-19,04800*	,01261	,000	-19,0838	-19,0122
	Control (Etanol 70 °)	,00000	,01261	1,000	-,0358	,0358
	Ext. 20 %	,00000	,01261	1,000	-,0358	,0358
	Ext. 40 %	,00000	,01261	1,000	-,0358	,0358

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

IV. DISCUSIÓN

IV.1. Discusión de resultados

En el presente estudio del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (Centella) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, el primer ensayo fue la prueba de solubilidad, en la que los resultados mostraron que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (Centella), fue muy soluble en etanol 70 °, soluble en metanol y agua destilada, poco soluble en Etanol de 96 y Cloroformo e insolubles en otros disolventes orgánicos apolares como el diclorometano, éter de petróleo y Butanol. Esto es evidencia de la afinidad que posee el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (Centella) por el solvente alcohólico al 70 °; y en cuanto al ensayo de la marcha fitoquímica fueron identificados las antraquinonas, compuestos fenólicos, terpenos y esteroides, alcaloides, lactonas α , β -insaturadas, antocianinas, azúcares reductores, Taninos y saponinas. Cabe resaltar que no se logró identificar flavonoides y aminoácidos libres; empleando el método según los lineamientos de Olga Lock de Ugaz²⁵, esto determina de las posibles evidencias antimicrobianas que podría tener esta planta frente a cepas antimicóticas y/o antibacterianas.

Los resultados del estudio fitoquímico de la presente investigación coinciden con el de Condori L. (2018) que en su estudio farmacológico realizó la marcha fitoquímica identificando alcaloides, triterpenos, esteroides, compuestos fenólicos, taninos y flavonoides. Sin embargo, a pesar de ser provenientes de diferentes lugares como del sector Matarita, distrito de Matara, provincia de Cajamarca y departamento del mismo nombre, este coincide con la muestra proveniente de Condori L.; el cual es originario del anexo de Huayrapampa, Distrito de Lambrama ubicado entre los 3,500 y 4000 m. s. n. m de la Provincia de Abancay y Departamento de Apurímac. Cabe resaltar que el presente estudio fue con las hojas y el estudio de Condori L. con las raíces³¹

De igual importancia coincide con algunos metabolitos del estudio de Deghima *et al* (2021) quienes caracterizaron los extractos de acetato de etilo y n-butanol de *Ranunculus macrophyllus* Desf. identificando un alto contenido tanto de

compuestos fenólicos como de triterpenoides, apoyando el uso generalizado de esta planta tradicional en algunos trastornos de la piel^{14,32}

Por otro lado, los informes de Chang (2018) sugieren que el *Ranunculus Hiperbóreo* puede contener compuestos similares que están vinculados con varias bioactividades. Por otro lado, se sugirió que la bioactividad de la fracción etanólico ocurre a través de sustancias que tienen diferentes estructuras químicas, posiblemente péptidos y azúcares, a diferencia de los compuestos antioxidantes comunes³³

Finalmente, el estudio de Madhulika (2020) mediante el análisis de espectroscopía y cromatografía reveló la presencia de flavonoides, fenoles y varios otros fitoconstituyentes en *Ranunculus sceleratus* Linn. La validación por espectroscopia y cromatografía puede ayudar con fines medicinales y comerciales³⁴. Los estudios realizados con *Ranunculus* coinciden en su mayoría sobre la composición fitoquímica de los metabolitos secundarios, a pesar de tener orígenes diferentes, por otro lado, se asemejan en su composición fitoquímica en los ensayos realizados en hoja y raíz. Considerando la falta de investigación sobre el potencial de bioactividad de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (Centella), este promete un gran potencial biológico.

Por otro lado, el ensayo microbiológico in vitro para determinar la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (Centella) a las concentraciones de 20 %, 40 % y 60 % frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, evidenció que el extracto al 20 %, 40 % y 60 % generaron un halo de inhibición medio de 6,00 mm. Además, se evidenció que los 3 grupos experimentales no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) frente al control (Etanol 70 °) a través de las pruebas estadísticas de ANOVA y Tukey. Por lo tanto, según la escala de Duraffourd esta cepa bacteriana tiene una sensibilidad nula para los 3 extractos.

De igual importancia difiere del estudio de Khan *et al* (2016) quienes determinaron las actividades antimicrobianas y antifúngicas del extracto crudo y las fracciones del extracto de *Ranunculus muricatus* mediante el método de difusión en agar. Se observó una zona de inhibición contra *Micrococcus luteus*. Sin embargo, las actividades antimicóticas fueron altas para los extractos crudos contra *Candida*

albican. Los hallazgos de este estudio muestran que *Ranunculus muricatus* tiene un buen impacto medicinal^{15,34}

De la misma manera coincide con el estudio de Atci y Karagöz (2018) quienes en su estudio determinaron la actividad antimicrobiana de *Ranunculus sericeus* Banks & Sol frente a *Staphylococcus aureus* A: fracción de acetona ($11 \pm 0,6$), M: fracción de metanol ($14 \pm 0,6$) y la actividad antifúngica contra hongos de tipo *Alternaria sp.* A: fracción de acetona (16.11), M: fracción de metanol (14.44) y *Fusarium sp.* A: fracción de acetona (15,56), M: fracción de metanol (6,00), los resultados indican que las fracciones de acetona y metanol tienen una actividad antibacteriana y antifúngica moderada^{16,36}

Finalmente coincide con el estudio de Balemuy (2020) quien determinó la actividad antimicrobiana de *Ranunculus bulbosus*, las actividades antibacterianas y antifúngicas de la planta bajo investigación se llevaron a cabo utilizando extracto crudo mediante la aplicación de disolventes n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y metanol. Los extractos crudos se probaron contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Citrobacter*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi* y tres patógenos fúngicos (*Candida*, *Caspa* y *Tinea versicolor*) utilizando difusión de pocillos de agar a 100 mg, los resultados indicaron que el extracto de acetato de etilo era potente y tenía efectos inhibidores y bactericidas / fungicidas significativos para la mayoría de los organismos probados en comparación con otros extractos. Esta puede ser la posible alternativa para dar respuesta a los problemas de farmacorresistencia que existen actualmente. Otros estudios pueden considerar esta planta como una de las mejores candidatas para los descubrimientos de un potente compuesto antimicrobiano³⁷

A pesar de que existen múltiples estudios a nivel mundial sobre la actividad antibacteriana y antifúngica del género *Ranunculus*; existen mínimos estudios microbiológicos sobre la especie *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (Centella) en el Perú. Se evaluó el efecto antibacteriano sinérgico de rifamicina en propóleo sobre bacterias grampositivas. Los autores presentaron la siguiente conclusión, que la combinación de rifamicina al 1 % unida al propóleo al 40 % presenta una mayor actividad antibacteriana in vitro sobre bacterias grampositivas debido a su efecto sinérgico³⁸.

IV.2. Conclusiones

Los estudios realizados en el presente trabajo nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (Centella) no presenta actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
2. Los metabolitos secundarios que se identificaron en la prueba de la marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (Centella) fueron antraquinonas, compuestos fenólicos, Terpenos y esteroides, alcaloides, lactonas α , β -insaturadas, antocianinas, azúcares reductores, Taninos y saponinas.
3. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (Centella) al 20, 40 y 60 % no poseen efecto antibacteriano in vitro frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
4. El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (Centella) al 20, 40 y 60 % no superan el efecto inhibidor de la gentamicina 10 ug frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

IV.3. Recomendaciones

- Realizar investigaciones con el extracto enólico de las hojas, raíz y flores de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (Centella) frente a bacterias diferentes a *Staphylococcus aureus* que ocasionan infecciones.
- Efectuar análisis con el extracto etanólico de las hojas, raíz y flores de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (Centella) frente a hongos que ocasionan diferentes infecciones.
- Iniciar investigaciones microbiológicas con diferentes solventes (metanol, cloroformo, diclorometano) de las hojas, raíz y flores de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (Centella) frente a hongos y bacterias que ocasionan diferentes infecciones.
- Caracterizar la composición fitoquímica de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (Centella) a través de análisis instrumentales como HPLC, IR, RAMAN, NMR, etc.
- Realizar análisis farmacológicos in vivo del extracto etanólico de las hojas, raíz y flores de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (Centella)
- Realizar análisis farmacológicos in vitro del extracto etanólico de las hojas, raíz y flores de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (Centella)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pachay J. Las infecciones bacterianas y su resistencia a los antibióticos. Caso de estudio: Hospital Oncológico “Dr. Julio Villacreces Colmot Solca”, Portoviejo. Revista Universidad y Sociedad.2018. [acceso: 09/09/21]; 10(5): 219-223. Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2218-36202018000500219
2. Oteo J, Aracil M. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. Revista ELSEVIER. 2015. [acceso: 10/09/21]; 33(Supl 2): 27-3. Disponible en:

<https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-caracterizacion-mecanismos-resistencia-por-biologia-S0213005X15300124>
3. Carmona E, Sandoval S, García C. Frecuencia y susceptibilidad antibiótica del *Staphylococcus aureus* proveniente de hisopados nasales en una población urbano marginal de Lima, Perú. Revista Perú Med Exp Salud Publica. 2012 [acceso: 10/09/21]; 29(2): 206-11. Disponible en:

<http://www.scielo.org.pe/pdf/rins/v29n2/a06v29n2.pdf>
4. Sandival-Ampuero G, Mucching-Toscano S, Champi-Merino R, Alvarado-Gamarra G. Colonización simultánea por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y Enterococcus resistente a vancomicina. Revista Peruana Experimental y Salud Pública. 2015. [acceso: 25/08/21]; 32(2): 395-406.

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342015000200033
5. Villanueva-Cuencas A, Velásquez-Cuencas C. Conocimientos tradicionales de las plantas medicinales de Cajamarca. 1ed. CREAT;2012.

https://repositoriodigital.minam.gob.pe/bitstream/handle/123456789/182/BI_V01236.pdf?sequence=1&isAllowed=y

6. Pimentel Ramírez, E. et al. Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en las tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. Revista Estomatológica Herediana. Herediana. 2015. [acceso: 30/08/21]; 25(4): 268-277. Disponible en:

http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1019-43552015000400004&script=sci_abstract

7. Gómez S, Pereira J. Evaluación de la actividad Anti - *Staphylococcus aureus* del extracto alcohólico de hojas de *Anacardium occidentale* Linn. "casho" mediante el método de difusión en disco (Kirby - Bauer). [Tesis para optar el título de: Químico Farmacéutico]. Perú: Universidad Nacional De La Amazonia Peruana; 2016.

<https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/20.500.12737/3850>

8. Paganini H, Rosanova M, Gonzalez F, Casimir L. Bacteriemias por *Staphylococcus aureus* análisis de 102 episodios. Revista Medicina Infantil, Children. 1994. [acceso: 30/08/21]; 1(6): 317-321. Disponible en:

<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-281742>

9. Castellano M, Perozo-Mena A. Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Staphylococcus aureus*. Revista Kasmera.2010. [acceso: 02/09/21]; 38(1): 18-35. Disponible en:

http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222010000100003

10. Pasachova J, Ramírez S, Molina M. *Staphylococcus aureus*: generalidades, mecanismos de patogenicidad y colonización celular. Revista NOVA. 2019. [acceso: 02/09/21]; 17(32): 25-38. Disponible en:

<https://revistas.unicolmayor.edu.co/index.php/nova/article/view/1030>

11. Gutiérrez L. Inventario Florístico del Sector de Buga Alto, del Bosque de Paquiestancia, Cayambe – Ecuador 2008. [Tesis para obtener el título de Ingeniero Agropecuario]. Ecuador: Universidad Politécnica Salesiana Sede Quito; 2010.

<https://dspace.ups.edu.ec/handle/123456789/4590>

12. Charcape J, Palacios C, Mostacero J. Plantas medicinales nativas de la región Piura. 1ed. Lima-Perú: JDE & SERVICE; 2010.

https://www.researchgate.net/publication/322287490_Plantas_Medicinales_Nativas_de_la_Region_Piura_Native_Medicinal_Plants_of_the_Piura_Region

13. Condori L. Efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Ranunculus praemorsus* H.B.K ex DC, en lesiones inducidas en ratas. [Tesis Para optar el Grado Académico de Magíster en Farmacología con mención en Farmacología Experimental]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018.

<https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/9305>

14. Deghima A, Nadjat R, Rosales N, León M, Baali F, Gómez E, Madrid Y, Bedjou F. Anti-inflammatory activity of ethyl acetate and n-butanol extracts from *Ranunculus macrophyllus* Desf. and their phenolic profile. Journal of Ethnopharmacology 265 (2021) 1-9. Disponible en:

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113347>

15. Madhulika, Dwivedi N, Sangeeta G. Validating the properties of *Ranunculus sceleratus* Linn. by performing spectroscopic techniques and modern chromatography. International journal of research in pharmaceutical sciences. 2020, 11(3), 4682-4689. Disponible en:

<https://doi.org/10.26452/ijrps.v11i3.2756>

16. Atci H, Karagöz Y. *Ranunculus sericeus* Banks & Sol. Extract Fractions Possess Antibacterial and Antifungal Activity. *Eastern Anatolian Journal of Science*. 2018, 4 (1) 9-15. Disponible en:

<https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/466999>

17. Sánchez J. Actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus* sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* - Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión" UNMSM. [Tesis Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2019.

<https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/10285>

18. Aranguri D, Ramos R. Efecto in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Gentianella bicolor* "campanilla morada" frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. [Tesis para optar el grado académico de bachiller en farmacia y bioquímica]. Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2017.

<https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/9343>

19. Martínez A. et al. Resistencia antimicrobiana de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en el Hospital Dr. Gustavo Aldereguía Lima. *Revista Medisur*. 2017.[acceso: 16-09-21]; 15(2): 210-216. Disponible en:

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-897X2017000200010

20. Flores A. Efecto antimicrobiano in vitro del extracto hidroalcohólico del rizoma de *Curcuma longa* (Guisador), sobre *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. [Proyecto de tesis para optar el grado de bachiller en medicina]. Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2017.

<https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/11260>

21. Sánchez J. Actividad antimicrobiana de metabolitos secundarios de *Aspergillus fumigatus* sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* - Instituto de Medicina Tropical “Daniel Alcides Carrión” UNMSM. [Tesis Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2019.
- <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/10285>
22. Fabián H. Caracterización Físico-Química para la determinación de la calidad y rendimiento del látex de Sangre de Grado (*Croton perpeciosus* Croizart) en la provincia de San Ignacio – Cajamarca. [Tesis para optar el Título de Ingeniero Forestal]. Lima: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2011.
- <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/433>
23. Chumpe M. EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Berberis vulgaris* L. (agracejo) EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ESTUDIO IN VITRO. [Tesis para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico]. Perú: UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA; 2019.
- <http://repositorio.uigv.edu.pe/handle/20.500.11818/234/browse?type=author&value=Muguruza+L%C3%B3pez%2C+Oscar>
24. Vílchez H, Cervantes L. Evaluación del efecto antibacteriano sinérgico de rifamicina en propóleo sobre bacterias grampositivas. Rev Cubana Med Milit. 2021. [acceso: 17/09/ 2021]; 50(3): [aprox. 0 p.]. Disponible en:
- <http://www.revmedmilitar.sld.cu/index.php/mil/article/view/1336>
25. Linares J. Remoción de Iones plomo (Pb) de Aguas Sintéticas Mediante El Biosorbente Obtenido De La Cáscara De Castaña (*Bertholletia Excelsa*). [Tesis Para Optar El Grado Académico De: Doctor En Ciencias Y Tecnologías Medioambientales]. Perú: Universidad Nacional De San Agustín De Arequipa; 2018.

<http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/6241>

26. Castro V. Actividad Antibacteriana In Vitro De Los Extractos Etanólico Y Clorofórmico De *Flourensia polycephala* Dillon. (Phauka) Y Elaboración De Una Forma Farmacéutica tópica Para Su Evaluación In Vivo En Infecciones Dérmicas Por *Staphylococcus Aureus* En Ratones Albinos. [Tesis Para Optar Al Título Profesional de Químico Farmacéutico]. Perú: Universidad Nacional De San Antonio Abad Del Cusco; 2011.

<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-880314>

27. Mora M, Ramos S. Evaluación De La Actividad Antimicrobiana Del Extracto De Cebolla Colorada (*Allium cepa*) Frente A Microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*. [Trabajo de titulación presentado como requisito previo para optar por el grado de Químicas y Farmacéuticas]. Perú: Universidad De Guayaquil; 2020.

<http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/49302>

28. Laboratorios Britania. Muller Hinton Agar. Argentina: Britania; 2020. [acceso: 06-09-20]. Disponible en:

https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_5e42a06a6fcd3.pdf

29. Nepo S, Vásquez A. Actividad Antibacteriana Del Extracto Hidroalcohólico De *Mentha spicata* L. “Hierba Buena” y *Piper aduncum* L. “Mático” En Cepas Clínicas de *Staphylococcus aureus*. [Tesis Para Optar El Título Profesional De Químico Farmacéutico]. Perú: Universidad María Auxiliadora; 2021.

<http://repositorio.uma.edu.pe/handle/UMA/467?show=full>

30. Asociación Médica Mundial. Declaración de Helsinki de la AMM – Principios Éticos para las Investigaciones Médicas en seres humanos. Francia: WMA; 2017. [acceso: 11-09-21]. Disponible en:

<https://www.wma.net/es/polices-post/declaracion-de-helsinki-de-la-amm-principios-eticos-para-las-investigaciones-medicas-en-seres-humanos/>

31. Condori, L. Efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Ranunculus praemorsus* H.B.K ex DC, en lesiones inducidas en ratas. [Tesis para optar el Grado Académico de Magíster en Farmacología con mención en Farmacología Experimental]. Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2021. Disponible en:

<https://hdl.handle.net/20.500.12672/9305>
32. Deghima A, Nadjat R, Rosales N, León M, Baali F, Gómez E, Madrid Y, Bedjou F. Anti-inflammatory activity of ethyl acetate and n-butanol extracts from *Ranunculus macrophyllus* Desf. and their phenolic profile. *Journal of Ethnopharmacology* 265 (2021) 1-9. Disponible en:

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113347>
33. Chang K, Lee J, Karadeniz F, Kim H, Seo Y. Effect of the Arctic terrestrial plant *Ranunculus hyperboreus* on LPS-induced inflammatory response via MAPK pathways. *Z Naturforsch CJ Biosci.* 2018; 73 (7-8): 273-279. Disponible en:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29466245/>
34. Madhulika, Dwivedi N, Sangeeta G. Validating the properties of *Ranunculus sceleratus* Linn. by performing spectroscopic techniques and modern chromatography. *International journal of research in pharmaceutical sciences.* 2020, 11(3), 4682-4689. Disponible en:

<https://doi.org/10.26452/ijrps.v11i3.2756>
35. Khan F, Zahoor M, Khan E. Chemical and biological evaluation of *Ranunculus muricatus*. *Pak. J. Pharm. Sci.*, 29, 2, 2016, pp.503-510. Disponible en:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27087095/>
36. Atci H, Karagöz Y. *Ranunculus sericeus* Banks & Sol. Extract Fractions Possess Antibacterial and Antifungal Activity. *Eastern Anatolian Journal of*

Science. 2018, 4 (1) 9-15. Disponible en:
<https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/466999>

37. Balemuy A. Assessment of antimicrobial activity of *Ranunculus bulbosus* against human pathogenic bacteria and fungi. [Thesis to opt for the academic degree of Master of Science in Biotechnology] Ethiopia. University of Gondar; 2020. Disponible en:
<http://213.55.79.198/xmlui/handle/123456789/3030>

38. Vílchez-Cáceda H, Cervantes-Ganoza L. Evaluación del efecto antibacteriano sinérgico de rifamicina en propóleo sobre bacterias grampositivas. Revista Cubana de Medicina Militar [Internet]. 2021 [citado 23 Dic 2021]; 50 (3)
Disponible en:
<http://revmedmilitar.sld.cu/index.php/mil/article/view/1336>

ANEXOS

ANEXO A. Instrumentos de recolección de datos

MARCHA FITOQUÍMICA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO

CONSTITUYENTES QUÍMICOS	ENSAYO	REACCIÓN
Carbohidratos	Rvo. Molish	
Azúcares reductores	Rvo. Fehling	
Compuestos fenólicos	Rvo. FeCl ₃ 5 %	
Taninos catéquicos	Rvo. Gelatina 1 %	
Flavonoides	Rvo. Shinoda	
Esteroides y triterpenoides	Rvo. Liebermann Burchard	
Cardenólidos	Rvo. Baljet	
Alcaloides	Rvo. Dragendorff	
	Rvo. Mayer	
Antraquinonas	Rvo. Borntranger	

CEPAS	<i>Escherichia</i>			<i>Staphylococcus</i>				
Concentración del extracto hidroalcohólico (%)	Halos de inhibición (mm)							
	N			X	N			X
	1	2	3		1	2	3	
100								
75								
50								
25								

ANEXO B: Matriz de consistencia

Formulación del problema	Objetivos	Hipótesis
Problema General	Objetivo General	Hipótesis General
¿Presentará efecto antibacteriano in vitro el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (centella) frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC: 25923?	Evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (centella) frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC: 25923.	El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (centella) presenta efecto antibacteriano frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC: 25923
Problemas Específicos	Objetivos Específicos	Hipótesis Específicas
¿Tendrá metabolitos secundarios el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (centella)?	Identificar los metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (centella) mediante análisis fitoquímico cualitativo	El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (centella) tiene metabolitos secundarios
¿Cuál será la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (centella) que posee efecto antibacteriano in vitro frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC: 25923?	Precisar la concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (centella) que posee efecto antibacteriano in vitro frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC:25923	Existe una concentración del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (centella) que posee efecto antibacteriano in vitro frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC: 25923.
¿Cuál será la actividad antibacteriana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (centella) en comparación con Gentamicina de 10 µg frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC: 25923?	Comparar la actividad antibacteriana in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (centella) con Gentamicina 10 µg contenido del disco frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC: 25923.	El extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (centella) tiene actividad antibacteriana in vitro en comparación con Gentamicina de 10 µg frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC: 25923.

VARIABLES	Tipo de variable	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	Nº ÍTEM	VALOR FINAL	CRITERIOS
VARIABLE INDEPENDIENTE Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (centella)	Cualitativo y Longitudinal	Se usa alcohol de 70° y vegetales, que puede presentar efecto antibacteriano, antiinflamatorio de acuerdo al vegetal, el alcohol extrae las propiedades presentes en los vegetales.	Extracto hidroalcohólico o es la forma práctica de concentrar y obtener los principios activos que sintetizan los vegetales. El extracto hidroalcohólico favorece la extracción de sustancias que desempeñan algún tipo de actividad en nuestro organismo	Tamizaje fitoquímico	Presencia de metabolitos secundarios	5	++++ Abundante +++ Moderado ++ Leve + Escaso	Rango de presencia o ausencia
				Diluciones del extracto hidroalcohólico	Concentraciones específicas	3	60 % 40 % 20 %	Concentración final después de la dilución

ANEXO C: Operacionalización de las variables

VARIABLES	Tipo de variable	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES	Nº ÍTEM	VALOR FINAL	CRITERIOS
<p>VARIABLE DEPENDIENTES</p> <p>Efecto antibacteriano frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i></p>	Cuantitativo y Longitudinal	Conjunto de compuestos que eliminan o reducen el crecimiento microbiano	La actividad antibacteriana Método Kirby Bauer o antibiogramas ayudará a evaluar la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC (centella) frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .	Inhibición del crecimiento bacteriano	Halo de inhibición (mm)	2	Crecimiento o Sin crecimiento o	Evidencia de inhibición de crecimiento o

ANEXO D: Clasificación taxonómica

 UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA DE BOTÁNICA
HERBARIO CPUN "ISIDORO SÁNCHEZ VEGA-UNC"
herbariocpunisv@gmail.com

 Universidad Nacional de Cajamarca
"Norte de la Universidad Peruana"

CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

El que suscribe:

Director del Herbario CPUN "Isidoro Sánchez Vega-UNC", de la Universidad Nacional de Cajamarca, certifica, que de parte de **Jhan Carlos Joel Muñoz Mendo y Guido Idrogo Huamán**, bachilleres de la Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud, de la Escuela Académico Profesional de Farmacia y Bioquímica, de la **Universidad Privada Alas Peruanas, Filial Cajamarca**; ha recibido una muestra botánica, la misma que fue identificada y ubicada taxonómicamente, en esta dependencia, como:

CATEGORÍA TAXONÓMICA	MUESTRA
Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Ranunculales
Familia:	Ranunculaceae
Sub Familia	Ranunculoideae
Tribu	Ranunculeae
Género:	Ranunculus
Especie:	<i>Ranunculus praemorsus</i> Kunth ex DC. L.

La especie es conocida como "centella", "hierba centella", "cicuta" y otros; fue colectada en el sector Matarita, distrito de Matara, provincia de Cajamarca y departamento de Cajamarca a 2,819 msnm, en las coordenadas UTM siguientes: E: 8033776.9 y N: 96773.7.

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

Cajamarca, 12 de febrero de 2021



M.Sc. Gustavo IBERICO VELA
DIRECTOR

Av. Atahualpa 1050 Ciudad Universitaria. Edificio 1D-204 - Cajamarca

ANEXO E: Certificado de análisis de laboratorio



"Año del Bicentenario del Perú: 200 años de Independencia"

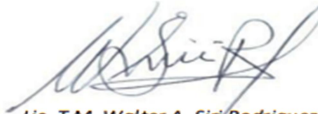
Informe de Resultados

Solicitado por: MUÑOZ MENDO, JHAN CARLOS JOEL
IDROGO HUAMÁN, GUIDO
Muestra: Extracto de hojas de *Ranunculus praemorsus* Kunth ex DC (Centella).
Cantidad: 27.8 gr
Fecha de ensayo: 03-12-2021

Microorganismo	Diámetros de inhibición en mm				
	60%	40%	20%	Gentamicina 10ug	Etanol 70°
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6	6	6	25,09	6
	6	6	6	25,04	6
	6	6	6	25,15	6
	6	6	6	24,96	6
	6	6	6	25,05	6
	6	6	6	24,98	6
	6	6	6	25,14	6
	6	6	6	25,00	6
	6	6	6	25,04	6
	6	6	6	25,03	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 Rodriguez
CTMP. 10808


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

ANEXO F: Certificado de la cepa



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0360 Lot Number: 360-486** Reference Number: ATCC® 25923™** Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2022/5/31 Release Information: Quality Control Technologist: Alexandra D Quevi Release Date: 2020/7/2
--	---

Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 mm (1) Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): 26 - 37 mm (1) Oxacillin (1 mcg - Disk Susceptibility): 18 - 24 mm  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE

**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.

Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

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.

ANEXO G: Evidencias fotográficas del trabajo de campo



Hojas frescas sobre bandejas de papel

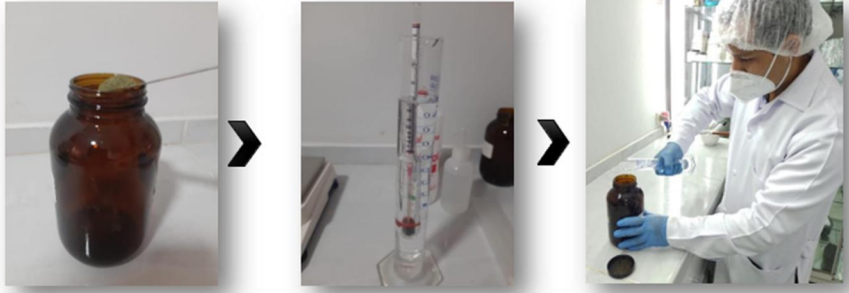


Estufa a 40 °C



Hojas secas luego de proceso de secado





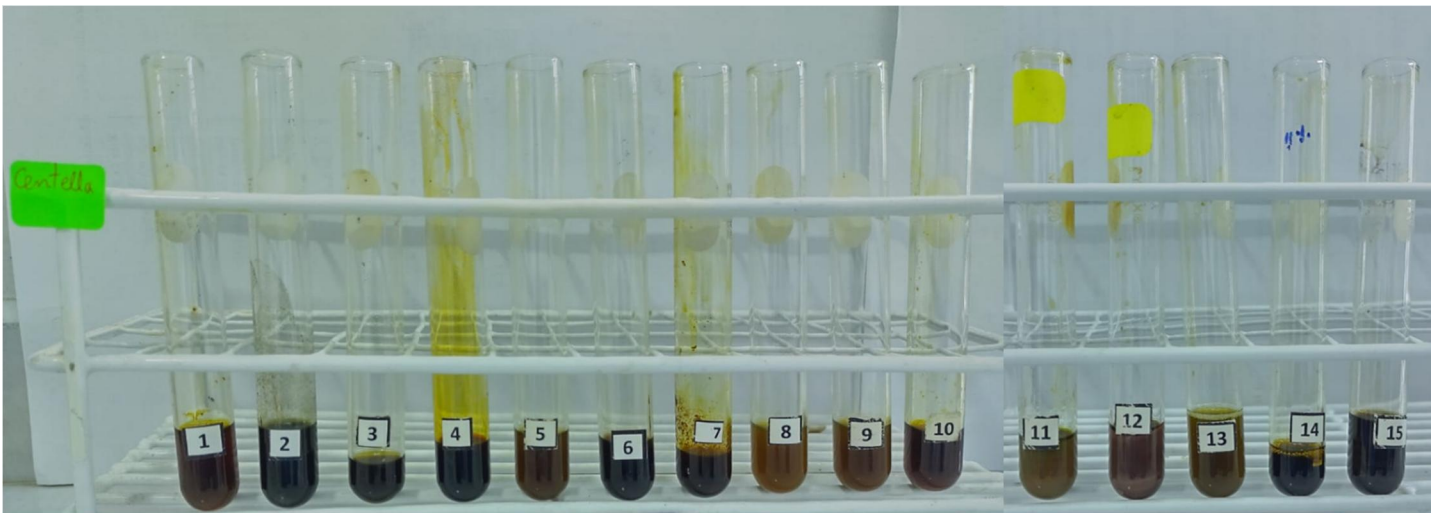
Proceso de maceración



Proceso de filtración

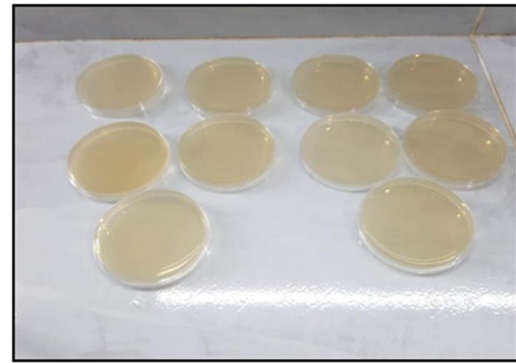
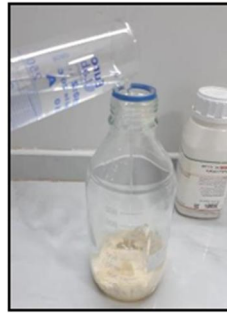
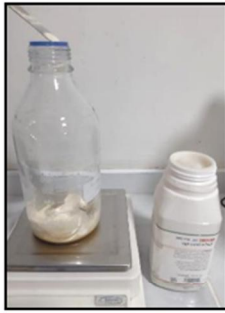


Proceso de obtención de extracto seco

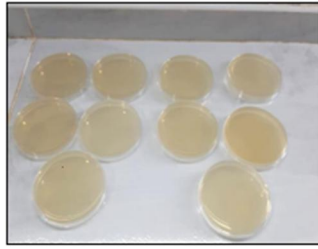


Marcha fitoquímica

ANALISIS MICROBIOLÓGICO



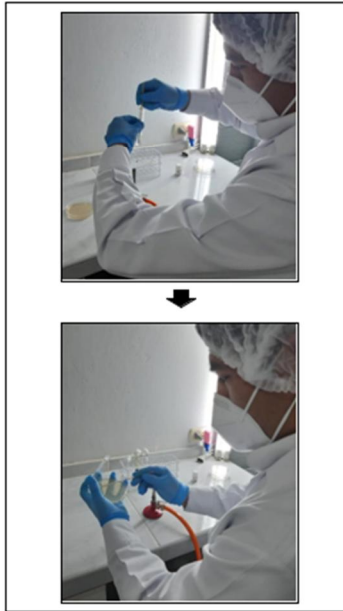
Staphylococcus aureus



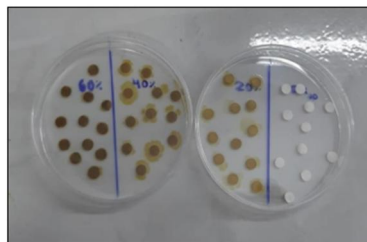
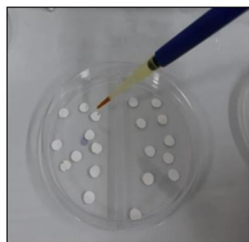
Agar Mueller Hinton



Rotulado de placas

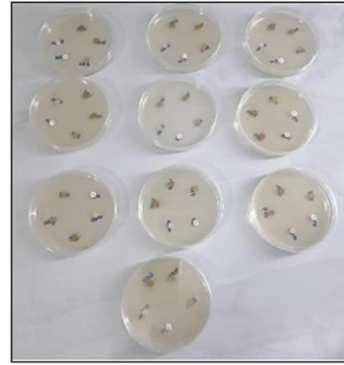


Siembra de placas con *S. aureus*

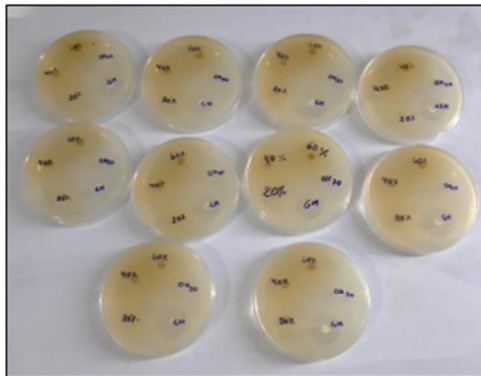




Colocando discos previamente preparados



Placas con *S. aureus* con discos



Resultados de placas inoculadas con *S. aureus*

