



Universidad
Norbert Wiener

Powered by **Arizona State University**

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE FARMACIA Y
BIOQUÍMICA

Tesis

Efecto antimicrobiano in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de
Columellia obovata Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de
Staphylococcus aureus ATCC 25923 Y Escherichia coli ATCC 25922. Lima,
2023

Para optar el Título Profesional de
Químico Farmacéutico

Presentado por:

Autor: Cerdan Díaz, Percy

Código ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9162-8252>

Autor: Moreto Arraiza, Brian Denzel


Código ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-3149-5127>

Asesor: Mg. Ñañez Del Pino, Daniel

Código ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9605-8594>

Lima – Perú

2024

 Universidad Norbert Wiener	DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIA Y DE ORIGINALIDAD DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN	
	CÓDIGO: UPNW-GRA-FOR-033	VERSION: 01 REVISIÓN: 01

Yo, Cerdan Diaz, Percy - Moreto Arraiza, Brian Denzel egresados de la Facultad de **Farmacia y Bioquímica** y Escuela Académica Profesional de **Farmacia y Bioquímica** de la Universidad privada Norbert Wiener declaro que el trabajo de investigación "Efecto antimicrobiano in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. "pisca pisca" frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Lima, 2023" Asesorado por el docente: Mg. Daniel Ñañez Del Pino DNI 23528875 ORCID...0000-0002-9605-8594. tiene un índice de similitud de (19) (diecinueve) % con código oid:14912:412703714_verificable en el reporte de originalidad del software Turnitin.

Así mismo:

1. Se ha mencionado todas las fuentes utilizadas, identificando correctamente las citas textuales o paráfrasis provenientes de otras fuentes.
2. No he utilizado ninguna otra fuente distinta de aquella señalada en el trabajo.
3. Se autoriza que el trabajo puede ser revisado en búsqueda de plagios.
4. El porcentaje señalado es el mismo que arrojó al momento de indexar, grabar o hacer el depósito en el turnitin de la universidad y,
5. Asumimos la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión en la información aportada, por lo cual nos sometemos a lo dispuesto en las normas del reglamento vigente de la universidad.



.....
 Firma de autor 1
 Percy, Cerdan Diaz
 DNI: 43629760



.....
 Firma de autor 2
 Brian Denzel, Moreto Arraiza
 DNI: 72217774



.....
 Firma
 Nombres y apellidos del Asesor
 Mg. Daniel Ñañez Del Pino
 DNI: ...23528875....

Lima, 04 de diciembre de 2024

citas, la bibliografía y las fuentes que tengan menos de 1% de palabras. EN caso se utilice cualquier otro ajuste o filtros, debe ser debidamente justificado en el siguiente recuadro.

Debido que se repite varias veces el formato o guía de redacción de la tesis, se realizó la exclusión con el fin de disminuir la similitud.

Dedicatoria

A nuestros padres y hermanos con apego y gratitud por su apoyo y entusiasmo con el que colaboraron en el arduo desarrollo de nuestra profesión.

Agradecimiento

A Dios y nuestros familiares, por su constante apoyo, comprensión y motivación a lo largo de cada trayecto de nuestra vida.

A nuestros maestros de la Universidad Norbert Wiener, en especial a los de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica quienes compartieron sus conocimientos y experiencias, y nos brindaron un valioso soporte a lo largo de nuestra carrera universitaria. Sin su guía y enseñanzas, este logro no hubiera sido posible.

Un agradecimiento especial, a nuestro asesor al Mg. Daniel Ñañez Del Pino, quien nos impulsó y nos ayudó en la ejecución del presente trabajo de investigación.

Finalmente, al Dr. Manuel Jesús Marín Bravo por su preciada colaboración y por apoyarnos de buen afán con los procedimientos de obtención de muestra para los análisis y también al microbiólogo Mg. Otoniel Juárez Vilcapuma, Otoniel de Scientific Quality S. A. C., por su asistencia en la ejecución de tesis.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. EL PROBLEMA.....	1
1.1. Planteamiento del problema.....	1
1.2. Formulación del problema	3
1.2.1 Problema general	3
1.2.2 Problemas específicos	3
1.3. Objetivos de la investigación.....	4
1.3.1 Objetivo general.....	4
1.3.2 Objetivos específicos	4
1.4. Justificación de la investigación	5
1.4.1 Teórica	5
1.4.2 Metodológica	5
1.4.3 Práctica.....	6
1.5. Limitaciones de la investigación.....	6
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	8
2.1. Antecedentes de la investigación.....	8
2.2.1 Antecedentes Internacionales.....	8
2.2.2 Antecedentes Nacionales	10
2.2. Bases teóricas.....	14
2.2.1 Aspectos botánicos de la especie en estudio.....	14

2.2.1.1 Clasificación taxonómica.....	14
2.2.1.2 Relación filogenética	15
2.2.1.3 Descripción botánica.....	16
2.2.1.4 Usos medicinales	16
2.2.1.5 Distribución y hábitat.....	17
2.2.1.6 Extracto Hidroalcohólico de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav.....	17
2.2.1.7 Tamizaje Fitoquímico	18
2.2.2 Actividad antimicrobiana.....	20
2.2.2.1 Inhibición in vitro	20
2.2.2.1.1 Métodos de difusión.....	21
2.2.2.1.2 Métodos de dilución.....	22
2.2.2.1.3 Concentración inhibitoria mínima (CIM)	22
2.2.2.1.4 Concentración bactericida mínima (CBM)	22
2.2.2.1.5 Plantas como fuente de antimicrobianos.....	23
2.2.2.2 Características de las cepas en estudio.....	24
2.2.2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	24
1.2.2.2.2 <i>Escherichia coli</i>	25
2.3. Formulación de hipótesis (si aplica)	25
2.3.1 Hipótesis general.....	25
2.3.2 Hipótesis específicas	26

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA	27
3.1. Método de la investigación	27
3.2. Enfoque investigativo	27
3.3. Tipo de investigación.....	27
3.4. Diseño de la investigación	28
3.4.1 Corte.....	28
3.4.2 Nivel.....	28
3.5. Población, muestra y muestreo	28
3.5.1. Población.....	28
3.6. Variables y operacionalización	29
3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos	31
3.7.1 Técnica.....	31
3.7.2 Descripción de instrumentos.....	31
3.7.3 Validación	33
3.7.4 Confiabilidad.....	33
3.8. Plan de procesamiento y análisis de datos	33
3.9. Aspectos éticos.....	34
CAPÍTULO IV. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	35
4.1 Resultados	35
4.1.1 Análisis descriptivo de resultados.....	39

4.1.2 Prueba de hipótesis (Si aplica	44
4.1.3 Discusión de resultados.....	49
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	52
5.1 Conclusiones.....	52
REFERENCIAS.....	54
Hipótesis específicas.....	63
Materiales.....	75
Lista de Anexos	
Anexo 2: Instrumentos.....	67
Anexo 3: Validez del instrumento	70
Anexo 5: Aprobación del comité de Ética	73

|

INDICE DE TABLAS

Tabla 1

Nombres comunes de Columellia Columellia obovata, según lugares de ubicación 15

Tabla 2

Variable y operacionalización..... 30

Tabla 3

Características organolépticas del extracto obtenido..... 35

Tabla 4

Análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de Columellia obovata 36

Tabla 5

Determinación de CMI y CMB del EHH de Columellia obovata Ruiz & Pav. sobre cepas de Staphylococcus aureus ATCC 25923 37

Tabla 6

Efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de Columellia obovata Ruiz & Pav. “Pisca pisca”..... 39

INDICE DE GRÁFICOS

Figura 1	
<i>Extracto liofilizado de Columellia obovata Ruiz & Pav. “Pisca pisca”</i>	35
Figura 2	
Análisis fitoquímico el EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca”	37
Figura 3	
Concentración mínima inhibitoria del EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. frente	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	38
Figura 4	
Diagrama de cajas del extracto hidroalcohólico de <i>Columellia obovata</i> con <i>Staphylococcus</i>	
<i>aureus</i> ATCC 25923	40
Figura 5	
Comparación del halo de inhibición para <i>Staphylococcus aureus</i> entre las concentraciones y	
gentamicina.	41
Figura 6	
Comparación del halo de inhibición para <i>Staphylococcus aureus</i> entre las concentraciones y	
suero fisiológico.	42
Figura 7	
Comparación del halo de inhibición para <i>Staphylococcus aureus</i> entre las concentraciones. ...	43

Resumen

El siguiente estudio tuvo como objetivo determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “Pisca pisca” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Estudio experimental *in vitro*, corte transversal, nivel explicativo, tipo aplicada, enfoque cuantitativo y método hipotético deductivo. La población estuvo compuesta por 24 medios de cultivo de las cepas ATCC. Se emplearon seis grupos, cuatro experimentales inducidos por el extracto de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. y controles a gentamicina y suero fisiológico. Para la recolección de datos se usó el método de difusión en agar en pozos, prueba que permitió medir la susceptibilidad *in vitro* de las bacterias. El análisis de resultados se realizó en el programa SSPS versión 25, a través de la prueba estadística Kruskal Wallis; $p < 0.05$. Se determinó que el efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “Pisca pisca” a concentraciones 25%; 50%; 75% y 100% mostraron diámetros de halos de inhibición en cultivos de *Staphylococcus aureus*, con valores $11,84 \pm 2,51\text{mm}$; $14,65 \pm 1,49\text{mm}$; $16,75 \pm 2,65\text{mm}$; $18,17 \pm 3,48\text{mm}$ respectivamente; en comparación de Gentamicina $34,10 \pm 0,79\text{mm}$. En cambio, no presentó la actividad inhibitoria frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 en todas concentraciones estudiadas y el ensayo fitoquímico identificó presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, antraquinonas, alcaloides y saponinas. Se concluye que el extracto hidroalcohólico de las hojas *Columellia obovata* demostró efecto antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Palabras clave: *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “Pisca”, efecto antimicrobiano, *in vitro*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* 25922.

Abstract (inglés)

The following study aimed to determine the *in vitro* antimicrobial effect of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “Pisca pisca” against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922. *In vitro* experimental study, cross-sectional, explanatory level, applied type, quantitative approach and hypothetical deductive method. The population was composed of 24 culture media of the ATCC strains. Six groups were used, four experimental groups induced by the extract of *Columellia obovata* Ruiz & Pav. and controls to gentamicin and physiological saline. To collect data, the agar diffusion method in wells was used, a test that allowed measuring the *in vitro* susceptibility of the bacteria. The analysis of results was carried out in the SSPS version 25 program, through the Kruskal Wallis statistical test; $p < 0.05$. It was determined that the antimicrobial effect of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “Pisca pisca” at 25% concentrations; fifty%; 75% and 100% showed diameters of inhibition zones in *Staphylococcus aureus* cultures, with values 11.84 ± 2.51 mm; 14.65 ± 1.49 mm; 16.75 ± 2.65 mm; 18.17 ± 3.48 mm respectively; compared to Gentamicin 34.10 ± 0.79 mm. On the other hand, it did not present inhibitory activity against *Escherichia coli* ATCC 25922 at all concentrations studied and the phytochemical assay identified the presence of phenolic compounds, flavonoids, tannins, anthraquinones, alkaloids and saponins. It is concluded that the hydroalcoholic extract of *Columellia obovata* leaves demonstrated antimicrobial effect against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Keywords: *Collumelia obovata* Ruiz & Pav. “Pisca pisca”, antimicrobial effect, *in vitro*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* 25922.

INTRODUCCIÓN

En el Perú, contamos con una rica diversidad de flora vegetal que posee una amplia gama de propiedades biológicas, las cuales pueden ser utilizadas para la medicación de diversas afecciones. Es importante destacar la relevancia de investigar estas especies vegetales que poseen un potencial efecto terapéutico, atribuido principalmente a los principios activos presentes en ellas. Entre estas especies se encuentra la planta *Columellia obovata* Ruiz & Pav., conocida como "pisca pisca". En el caso de esta planta, se utilizan las hojas con fines terapéuticos.

La investigación se esquematizó de la siguiente manera:

En Capítulo I se presentó la problemática y los objetivos de nuestra investigación.

En el Capítulo II, se desarrolló el Marco Teórico, se presentan los antecedentes de la tesis, se proyecta las bases teóricas fundamentales que asientan el análisis de las variables de estudio, las definiciones conceptuales y se incluye la formulación de la hipótesis.

En el Capítulo III, de Metodología, se expone el diseño, el tipo, nivel y método de la investigación, así como la población, muestra, técnicas e instrumentos de recolección, procesamiento de datos, así como los aspectos éticos del presente estudio.

En el Capítulo IV, se suscitan la presentación y discusión de resultados a través de la prueba de hipótesis.

Finalmente se alegan las conclusiones y se brindan las recomendaciones de esta investigación.

CAPÍTULO I. EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

La creciente crisis de salud pública mundial de la resistencia a los antimicrobianos es un problema cada vez más grave, con más de 700,000 muertes al año y una proyección de 10 millones para 2050 ⁽¹⁾. Entre los microorganismos resistentes se encuentran *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella spp*, que presentan una tendencia al aumento de la resistencia a múltiples generaciones de antibióticos ⁽²⁾.

En respuesta a esta crisis, la medicina herbal continúa siendo uno de los métodos de tratamiento para alrededor del 75-80% de la población general, y la mayoría de las prácticas curativas tradicionales se basan en la aplicación de extractos de plantas y sus compuestos bioactivos para combatir los agentes infecciosos ⁽³⁾. Esto es especialmente relevante, ya que se cree que el 10% de todas las plantas de la Tierra se utilizan con fines medicinales ^(4,5).

El uso de plantas medicinales es generalizado y no se limita a las comunidades rurales y de bajos ingresos. Se basa en alternativas asequibles y de libre acceso, arraigadas en prácticas culturales tradicionales ⁽⁶⁾. De hecho, su uso es frecuente en comunidades metropolitanas de muchas clases socioeconómicas, con una frecuencia de uso superior al 80% ⁽⁷⁾.

A nivel mundial, las propiedades antimicrobianas de los extractos de hojas de diferentes plantas se han investigado ampliamente. Entre ellos se encuentran, los extractos de hojas de *Commiphora africana*, *Chromolaena odorata* y *Colocasia esculenta* que han demostrado notables efectos antimicrobianos contra varios agentes causantes de enfermedades ⁽⁸⁾. De manera similar, los extractos hidroalcohólicos derivados de *Andrographis paniculata*, hojas de henna, *Cosmos caudatus* y varias otras plantas medicinales han mostrado notables propiedades antimicrobianas ^(9,10).

Además, los extractos de *Tinospora cordifolia*, *Costus igneus* y *Tridax procumbens* han mostrado potentes efectos antibacterianos contra diferentes patógenos, superando la eficacia de la ciprofloxacina ⁽¹¹⁾. Sin embargo, a pesar del creciente interés por las hierbas medicinales, aún existe una falta de conocimiento en torno al uso adecuado y seguro de numerosas variedades de plantas medicinales ^(12,13).

Este aspecto es especialmente relevante en países como el Perú, donde existe una rica tradición en el uso de hierbas medicinales, y se requiere más investigación para autenticar y publicitar formalmente el uso generalizado de hierbas terapéuticas en la comunidad ^(14,15). Un estudio específico sobre la *Columellia obovata* Ruiz & Pav. "pisca pisca" utilizada por los pobladores del centro poblado de Masingana en el Perú, ha demostrado la presencia de componentes fitoquímicos como alcaloides, flavonoides, iridoides, fenoles y taninos, glicósidos cardiotónicos, saponinas y catequinas, que podrían ser responsables de los efectos farmacológicos ⁽¹⁶⁾.

Dado que muchas comunidades en el país carecen de acceso hospitalario y atención médica, la medicina tradicional se considera una opción viable para el tratamiento de enfermedades

⁽¹⁷⁾. Por lo tanto, el análisis de la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto hidroalcohólico de hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. "pisca pisca", frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922, es crucial para verificar la existencia de las propiedades atribuidas a esta planta en la medicina tradicional. La investigación y validación científica de estos conocimientos comunes son cruciales para preservar y promover el uso de estas plantas medicinales.

1.2. Formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿Cuál es el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas (EHH) de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. "pisca pisca" frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 Lima, 2023?

1.2.2 Problemas específicos

1. ¿Cuáles son los metabolitos secundarios, con posible efecto antimicrobiano, del EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. "pisca pisca"?
2. ¿Cuál es el efecto antimicrobiano *in vitro* del EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. "pisca pisca" frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?
3. ¿Cuál es el efecto antimicrobiano *in vitro* del EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. "pisca pisca" frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922?
4. ¿Cuál es la concentración del EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. "pisca pisca" que presenta mayor efecto antimicrobiano *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922?

5. ¿Cuál será la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922?

1.3. Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del EHH *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Identificar los metabolitos secundarios, con posible efecto antimicrobiano, del EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca”.
2. Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
3. Determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922
4. Determinar la concentración del EHH *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” que presenta mayor efecto antimicrobiano *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.
5. Determinar la CMI y CMB del EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

1.4. Justificación de la investigación

1.4.1 Teórica

Un componente clave de la etnofarmacología y la medicina tradicional desde la antigüedad hasta el presente es la enorme diversidad y abundancia de plantas medicinales locales que se encuentran en el Perú. Por ello, varios de ellos se aplican empíricamente en medicina debido a sus efectos beneficiosos, como la *Columellia obovata* Ruiz & Pav. conocida popularmente como “pisca pisca”, la cual es usada para el tratamiento de dolencias de las vías respiratorias, digestivas, antipirético, y antisépticas⁽¹⁸⁾.

La especie vegetal *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” contiene flavonoides, alcaloides, saponinas, taninos y fenoles, que le otorgan grandes propiedades antimicrobianas⁽¹⁹⁾, lo que nos induce a que logrará eficacia antimicrobiana sobre cepas patógenas de importancia clínica. Es por ello, que se evaluó la actividad antimicrobiana mediante los ensayos *in vitro* frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 a concentraciones de 25 %, 50 %, 75 %, 100 %. Se realizó la investigación a estas dosis en los ensayos *in vitro* con la finalidad de comprobar la actividad antimicrobiana.

1.4.2 Metodológica

Desde una perspectiva metodológica, la prueba utilizada para determinar la susceptibilidad antimicrobiana fue el método de difusión en agar en pozo, dado que demuestra una mayor sensibilidad respecto a la inhibición del crecimiento bacteriano; debido a que permite una mejor interacción del medio de cultivo con los componentes de la especie vegetal. La metodología para la obtención del EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. fue la maceración en frío, ya que,

permite obtener una mayor cantidad de extracto, además de que no hay pérdida, ni alteración de las propiedades medicinales de las plantas.

Para el desarrollo de la marcha fitoquímica se siguió el procedimiento de Olga Lock⁽²⁰⁾, el cual se realizó para determinar los metabolitos presentes en el EHH *Columellia obovata* Ruiz & Pav. de forma cualitativa, los cuales se evidenciaron de acuerdo a las reacciones químicas tanto por coloración o precipitación.

La actividad antimicrobiana del EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” se determinó de acuerdo con la metodología descrita por Chafla-Moina y Silva-Déley⁽²¹⁾ se determinó mediante el método de difusión en pozos de agar. Se empleó la técnica de macrodilución en caldo para determinar la CIM y CBM.

1.4.3 Práctica

Esta investigación ayudo a conocer el valor biológico y farmacológico de la especie vegetal *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca”, como alternativa en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Además, contribuye al aporte de conocimiento para las futuras investigaciones relacionadas a la actividad antimicrobiana, no existen estudios realizados sobre esta especie vegetal, por tanto, al finalizar el análisis experimental será difundida la información.

1.5. Limitaciones de la investigación

Los resultados de este estudio deben considerar algunas limitaciones.

- Primero, sólo se utilizó las hojas de Pisca pisca; las otras partes de la planta, como la raíz, el tallo y las flores, también deben explorarse por su potencial antimicrobiano.
- Segundo, que no se realizó con varios tipos de extractos en diferentes concentraciones y solo se estudiaron los extractos hidroalcohólicos de la planta.

- Tercero, únicamente se utilizó dos cepas bacterianas ATCC que podrían no representar a las bacterias comunitarias.
- Cuarto, los resultados de la investigación no pueden ser extrapolados en animales y humanos debido a que se desconoce el grado de toxicidad del *Columellia obovata* y sus efectos sobre el microbiota normal en un organismo animal o humano.
- Finalmente, limitada información sobre la planta *Columellia Obovata* Ruiz & Pav. “Pisca pisca” con relación al efecto antimicrobiano.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes de la investigación

2.2.1 Antecedentes Internacionales

Cantoni ⁽²²⁾ (2021), tuvo como objetivo “Evaluar el efecto antimicrobiano de las concentraciones del extracto hidroalcohólico y el aceite esencial de *Campomanesia xanthocarpa* (guavirá) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* ATCC 25922”. Fue una investigación aplicada con diseño experimental. Elaboró un extracto hidroalcohólico a tres diferentes concentraciones (50, 60 y 70%) a partir de dicho extracto evaluó el efecto antimicrobiano, mediante el método de difusión en pozo. Observó que hubo una inhibición de 14 mm de las cepas de *Staphylococcus aureus* frente a el extracto de *C. xanthocarpa* al 70%. Concluyendo que el extracto hidroalcohólico de *C. xanthocarpa* al 70% posee efecto inhibitorio frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Chiavari *et al.* ⁽²³⁾ (2020), en su estudio el objetivo fue “Evaluar las actividades antibacterianas de extractos acuosos derivados de *Bidens sulphurea*, *Bidens pilosa* y *Tanacetum vulgare* (Asteraceae) frente a cepas estándar de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922)”. Fue un estudio experimental, emplearon microdilución para determinar la CIM y la CBM de los extractos. Se encontró que, frente a *S. aureus* ATCC 25923

los extractos de *B. pilosa* (CMI = 13,02 mg/ml) y *B. sulphurea* (CMI = 7,81 mg/ml) mostraron mayor actividad en comparación de *T. vulgare* (CMI = 41,66 mg/ml). Sin embargo, para *E. coli* ATCC25922 mostraron inhibición estadísticamente significativa los extractos de *T. vulgare* (52,08 mg/ml) y *B. Sulphurea* (31,25 mg/ml). Y los valores de CMM oscilaron entre 7.81 y > 500,00 mg/ml. Concluyendo que las especies de Asteraceae, en especial *B. sulphurea*, presentaron actividad antimicrobiana contra cepas estándar.

Mohamed *et al.*⁽²⁴⁾ (2020), buscaron “Evaluar la eficacia antimicrobiana de extractos metanólicos crudos derivados de *Pulicaria crispera* y *Pulicaria undulata* (Asteraceae) frente a dos Gram positivos: *Bacillus subtilis* (ATCC 8236) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y dos Gram negativos: *Escherichia coli* (ATCC 25922) y *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)”. Fue una investigación de tipo experimental, la preparación de los extractos crudos fue mediante maceración, la actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en disco y dilución en placa agar para determinar CMI. Además, la detección fitoquímica fue mediante exámenes cualitativos. El extracto crudo metanólico de *P. crispera* mostró alta actividad contra *S. aureus* (19 mm) y actividad moderada contra *B. subtilis* (16 mm), *E. coli* (15 mm) y *P. aeruginosa* (15 mm). El extracto crudo metanólico de *P. undulata* mostró alta actividad contra *B. subtilis* (18 mm) y actividad moderada contra *E. coli* (16 mm), *P. aeruginosa* (16 mm) y *S. aureus* (15 mm), que también es similar en actividad a la tetraciclina. Respecto a la CMI, el extracto crudo metanólico de *P. crispera* fue de 6,25 mg/ml para *P. aeruginosa*, 25 mg/ml para *E. coli* y *S. aureus* y 100 mg/ml para *B. subtilis*. Mientras que la concentración mínima inhibidora del extracto crudo metanólico de *P. undulata* fue 12,5 mg/ml para *P. aeruginosa* y *S. aureus*, 50 mg/ml para *E. coli*. y 100 mg/ml para *B. subtilis*. En los resultados fitoquímicos se encontraron esteroides, terpenos, taninos, comarinas y saponinas, y ausencia de alcaloides, flavonoides y antraquinonas. Concluyeron que los extractos crudos metanólicos de *P. crispera* y *P. undulata* tienen actividad antimicrobiana.

Ahmed *et al.* ⁽²⁵⁾ (2019), buscaron “Determinar la actividad antimicrobiana de extractos solventes de *Pimpinella anisum* frente a *Bacillus cereus* ATCC 33018, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* NTCC 12023y *Escherichia coli* ATCC 25922”. Fue una investigación de tipo experimental, utilizaron el método de difusión de pozo para determinar la actividad antimicrobiana. Se obtuvo para el extracto etanólico de semillas, las siguientes zonas de inhibición contra *B. cereus* y *S. aureus*, 21.0 ± 1.2 y 18.3 ± 1.5 mm, respectivamente. Sin embargo, para el extracto acuoso de semillas a baja concentración, 1.25 mg/ml, inhibió el crecimiento solo de *S. aureus* y *B. cereus*, 2.7 ± 0.3 y 3.3 ± 0.7 mm, respectivamente. Una concentración más alta ,5 mg/ml, inhibió el crecimiento de *S. typhimurium* y *E. coli*, 4.0 ± 0.6 y 2.7 ± 0.7 mm, respectivamente. Concluyeron que los extractos de solvente de las partes aéreas fueron menos efectivos como agentes antimicrobianos en comparación con los extractos de solvente preparados a partir de las semillas de anís.

2.2.2 Antecedentes Nacionales

Juárez *et al.* ⁽²⁶⁾ (2023), llevaron a cabo un estudio con el propósito de "Evaluar la actividad antimicrobiana de hojas y tallos de la especie vegetal *Jungia axillaris* (Lag. ex DC.) Spreng". Realizaron un estudio experimental en el cual obtuvieron el extracto etanólico mediante maceración y posteriormente identificaron su composición química mediante una marcha fitoquímica. Utilizaron el método de difusión en pozos para evaluar el efecto inhibitorio frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Los resultados mostraron un efecto antimicrobiano muy sensible sobre *Staphylococcus aureus*, con halos de inhibición de 17 mm, mientras que no se observó sensibilidad en las otras cepas estudiadas. En la marcha fitoquímica identificaron la presencia de flavonoides, alcaloides, carbohidratos, taninos, compuestos aromáticos y compuestos terpenoides. Además, el extracto etanólico presentó una Concentración

Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) de 12,5mg/mL para *Staphylococcus aureus*. Se concluye que el extracto etanólico de *Jungia axillaris* solo exhibe actividad antimicrobiana muy sensible sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Huamaní⁽²⁷⁾ (2022), buscó “Determinar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico derivado de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma” frente a distintas bacterias”. Fue un estudio experimental. Se determinó la actividad antimicrobiana se realizó por método de difusión en agar y reacciones de precipitación y/o coloración para identificar los metabolitos secundarios. Se identificaron los siguientes metabolitos: lactonas sesquiterpénicas/ cumarinas, antraquinonas, esteroides/ triterpenos, flavonoides y alcaloides. La actividad antimicrobiana frente a gran positivos fue: *B. cereus* a una concentración de 20 mg/ml se obtuvo en promedio 2,5 cm con un porcentaje de inhibición de 87.80% en relación al control positivo, *S. aureus* (80 mg/ml, 1,79 cm, 29,88%). Frente a Gram negativos: *E. coli* (20 mg/ml, 1,97 cm, 79,12%) y *S. tiphy* (80 mg/ml, 1,70 cm, 29.41%). Concluyendo que la planta en estudio presente una alta sensibilidad frente a *E. coli* y *B. cereus*, sin embargo, frente a *S. aureus* y *S. tiphy* presentó una sensibilidad baja.

Coarita *et al.*⁽²⁸⁾ (2022), realizaron un estudio para “Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* de un extracto hidroalcohólico derivado de las hojas de “Janqo janqo” (*Senecio candollei* Wedd)”. El tipo de investigación fue experimental. Se logró identificar metabolitos secundarios del extracto mediante análisis cualitativos, precipitación. Se identificaron los siguientes metabolitos: triterpenos, alcaloides, fenoles, flavonoides y esteroides. Se evaluó la actividad antibacteriana de este extracto mediante difusión con disco, contra *Staphylococcus aureus* a diversas concentraciones ,10%, 25%, 50% y 75%, obteniendo un halo de inhibición de 7.40 mm, 9.97 mm, 13,87 mm y 19,57 mm, respectivamente y un porcentaje inhibición promedio de 5.30%, 15%, 29.71% y 51.27% respectivamente con respecto al control positivo (ciprofloxacino 5ug). Concluyendo que sí tenía efecto antibacteriano frente a *S. aureus*.

De la Cruz ⁽²⁹⁾ (2020), tuvieron como objetivo “Evaluar el efecto bactericida del extracto de aceite de *Artemisia absinthium* en concentraciones del 25 %, 75 %, 50 % y 25 % contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en comparación con un control neutro y oxacilina 1 µg”. Fue un estudio experimental. Se descubrió que las concentraciones del 25% y del 50% no tenían ningún efecto inhibitorio. La inhibición máxima observada fue de 21,36 mm 75% y 13,18 mm al 100%, lo que indica un efecto bactericida pero no supera el de Oxacilina (media: 42,45 mm). Concluyendo, que, en una concentración más alta, se encontró que el extracto de aceite de *Artemisia absinthium* tiene un efecto bactericida contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Anco *et al*⁽³⁰⁾ (2019), el objetivo de los investigadores fue “Evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana del extracto etanólico derivado de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984”. La investigación fue experimental. Se emplearon dos métodos: difusión en agar y microdilución colorimétrica (microplaca). Se identificó que los compuestos fenólicos de tipo flavonoide constituyeron la mayoría. Los resultados del revelaron que a concentraciones de 200 mg/mL, 100 mg/mL y 50 mg/mL, los halos de inhibición promedio contra cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 fueron de 19 mm, 18 mm y 17,3 mm, respectivamente; contra las cepas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 (18 mm, 17 mm y 16,6 mm) contra *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15448, no se observaron halos de inhibición en las distintas concentraciones. El extracto etanólico de hojas tuvo una CMI de 1000 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 y ninguna actividad frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 a una concentración de 200 mg/mL, determinada por el método de microdilución colorimétrica en microplaca. Concluyendo que si poseen efecto antimicrobiano el extracto etanólico derivado de

las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984.

Carbajal ⁽¹⁹⁾ en el año (2015) tuvo como objetivo “Identificar los metabolitos secundarios y evaluar el efecto sobre la motilidad intestinal del extracto hidroalcohólico de hojas de *Columellia obovata* R. & P. “pisca pisca” en cuyes. Realizaron un estudio experimental, utilizando muestras del distrito de Quinua, provincia de Huamanga. Para evaluar el impacto sobre la motilidad intestinal, utilizaron un modelo in vivo de tránsito intestinal en cuyes, y el carbón activado como indicador de la motilidad del tracto digestivo. Se administraron diversos tratamientos a seis grupos de cinco animales. Tras analizar la presencia de metabolitos secundarios, se observó la mayor concentración de alcaloides y flavonoides. La atropina y la loperamida tuvieron un porcentaje de tránsito intestinal del 28,20 y el 45,50%, respectivamente, mientras que los extractos hidroalcohólicos a las dosis mencionadas rindieron un 84,00%, un 69,50% y un 48,50%, respectivamente. La dosis de 400 mg/kg del extracto hidroalcohólico mostró los resultados más prometedores en cuanto a motilidad intestinal, que fue comparable a la del fármaco de referencia Loperamida. Se concluyó que el extracto hidroalcohólico de hojas de *Columellia obovata* R. & P. “pisca pisca” tiene efecto sobre la motilidad intestinal y no mostró signos de toxicidad aguda hasta una dosis de 2000 mg/Kg.

2.2. Bases teóricas

2.2.1 Aspectos botánicos de la especie en estudio

Familia Columelliaceae

La Columelliaceae comprende 2 géneros y 8 especies, su distribución se da por América del Sur. La *Columellia* va desde el sur de Colombia hasta Bolivia; comprende 5 spp aproximadamente. La *Desfontainia* desde Costa Rica a Cabo de Hornos; 3 ssp⁽³¹⁾.

2.2.1.1 Clasificación taxonómica

La clasificación Taxonómica según el Herbario del Museo de Historia Natural de la “U.N.M.S.M”. e identificado por la MSc. Hamilton Beltrán Santiago, según el Sistema de Clasificación APG IV (2016).

REINO: Plantae

PHYLUM: Tracheophyta

CLASE: Magnoliopsida

ORDEN: Bruniales

FAMILIA: COLUMELLIACEAE

GÉNERO: *Columellia*

ESPECIE: *Columellia obovata* Ruiz & Pav. ^(19,32)

Nombres comunes: Esta familia Columelliaceae, pertenece a las especies endémicas casi amenazadas, conocidos como ullus, ullux, ulus, usllus, vara⁽³³⁾.

Familia: *Columellia obovata* es miembro de la familia Columelliaceae. Numerosas especies pertenecientes a esta pequeña familia se encuentran en las zonas tropicales y subtropicales de América.

Tabla 1

Nombres comunes de Columellia obovata, según lugares de ubicación

Lugares	Nombres comunes
Abancay	huamanripa
Ayacucho	pisca pisca, suqu suqu, chicha, oqe sacha ^(34,35)
Cajamarca	chachacoma ⁽³⁶⁾
Cusco	huamanpinta, romero de jalca, vara ⁽³⁷⁾
Huancavelica	Piska piska ⁽¹⁸⁾
Junín	shepita, jaya-chipita ⁽³⁸⁾

Características morfológicas distintivas: El arbusto de hoja perenne *Columellia obovata* normalmente crece hasta una altura de dos a tres metros. Sus hojas son de color verde oscuro brillante, de forma ovalada a obovada y normalmente miden de 3 a 7 cm. El arbusto tiene flores diminutas, de color amarillo pálido o blanco. Los frutos con semillas siguen a las flores, que pueden aparecer solas o en racimos⁽³⁶⁾.

Distribución geográfica de la planta: Originaria de partes de América del Sur, incluidos Perú y Ecuador, *Columellia obovata* es una planta natural. Este tipo de planta es originaria de regiones particulares dentro de estas naciones y se ha adaptado para vivir en bosques secos, bosques tropicales y otros lugares de vegetación natural⁽³⁴⁾.

2.2.1.2 Relación filogenética

Se menciona que Columelliaceae ha sido relacionada con Bruniaceae y ambas se incluyeron en Bruniales. Además, se señala que Bruniaceae/Bruniales ahora ocupa una posición más basal en el Clado Asterid II. Por lo tanto, se puede inferir que la planta en el presente estudio está conectada con el clado asterid II debido a su ubicación dentro de este grupo^(39,40).

El clado Asterid II es un grupo de plantas con flores (Angiospermas) que comparten un ancestro común más reciente entre sí que con otras familias fuera del clado. En otras palabras, estas familias comparten un linaje evolutivo común dentro de las Angiospermas. Escalloniales.

Asterales, Bruniales, Apiales, Paracryphiales, Dispacales, pertenecen al clado Asterid II, significa que tales comparten un antepasado común más reciente entre sí que con otras fuera de este grupo. Además, comparten características evolutivas específicas que las identifican como miembros de este grupo dentro del vasto mundo de las plantas con flores ^(39,40).

La información proporcionada es relevante para la presente investigación, ya que respalda la relación de Asteraceae, Apiaceae con Bruniaceae. Es importante destacar que las dos primeras familias son ampliamente utilizadas en investigaciones actuales, lo que permite utilizar los estudios realizados sobre ellas como antecedentes. Esto cobra importancia debido a la falta de investigación sobre la planta objeto de estudio en esta investigación ^(39,40).

2.2.1.3 Descripción botánica

Es una planta arbustiva monóica, de aproximadamente 2 a 4 metros de alto, tallos densamente ramosos bastante pubescentes. De hojas perennes de 1- 2,7 cm de largo, ovaladas, elípticas a obovadas, con los márgenes a menudo dentados. Con flores pequeñas solitarias o agrupadas en inflorescencias terminales. El fruto es una cápsula conteniendo numerosas⁽⁴¹⁾.

La familia Columelliaceae es una categoría botánica que incluye una serie de especies de plantas que se encuentran en áreas tropicales y subtropicales de América. Estas especies suelen ser arbustos o árboles pequeños. Esta familia botánica tiene ciertos rasgos físicos únicos a pesar de ser un miembro menor del reino vegetal. Estas plantas a menudo presentan hojas enteras, simples y opuestas con venas visibles. Las flores hermafroditas tienen simetría radial en su arquitectura floral y típicamente tienen pétalos blancos o amarillo pálido. Los frutos son bayas o cápsulas repletas de semillas⁽³⁴⁾.

2.2.1.4 Usos medicinales

La *Columellia Obovata* Ruiz. & Pav. tiene sus hojas amargas, la cuales se usan en infusión como antipirético, antiséptica y estomáquica⁽³⁷⁾. Además, los pobladores andinos del Perú

emplean las hojas y cortezas de *pisca pisca* en infusiones en el tratamiento de problemas respiratorios tales como: procesos infecciosos, problemas bronquiales, neumonía. Según los reportes de los lugareños se utilizan en infusión sus ramas como hipoglucemiantes e hipocolesterolemia ⁽¹²⁾.

Los pobladores de Huancavelica utilizan el zumo de las ramas de dicha planta medicinal con fines etnoveterinarios⁽¹⁸⁾.

2.2.1.5 Distribución y hábitat

Prospera de forma natural, entre 2500 y 3500 metros sobre el nivel del mar; en las zonas arbustivas de las laderas de Jalca en la parte más alta de las vertientes occidentales; crear vallas en pueblos pequeños, generalmente en suelos húmedos en hondonadas y barrancos⁽⁴¹⁾. Se encuentra en las zonas andinas de los departamentos de Ayacucho, Huancavelica, Junín, Cusco, Cajamarca, Piura⁽⁴²⁾.

2.2.1.6 Extracto Hidroalcohólico de *Columellia obovata* Ruiz & Pav.

A nivel común, suele ser suficiente extraer los compuestos activos mediante una infusión o decocción de las siguientes fuentes: raíces, hojas, flores y tallos. Por otro lado, con frecuencia se emplean técnicas de extracción más sofisticadas para investigar las características biológicas de las drogas vegetales. Estas técnicas permiten la adquisición de procedimientos repetibles y, si es práctico, la medición de componentes activos. Las técnicas de extracción más utilizadas son la extracción con vapor, la lixiviación, Soxhlet y la maceración, ya sea en frío o en caliente⁽⁴³⁾

Esta es una técnica de extracción sólido-líquido donde los químicos solubles en el líquido de extracción están presentes en el material vegetal que se va a extraer. Este procedimiento consiste en cortar el material vegetal en trozos pequeños, ya sea fresco o seco, y colocarlo en recipientes adecuados. A continuación, se añade el disolvente elegido en función de la polaridad, empezando por hexano (o éter de petróleo), luego cloroformo y finalizando con metanol o etanol. A

continuación, se deja reposar la mezcla o se agita continuamente durante cinco días a temperatura ambiente⁽⁴³⁾.

1.2.1.6 Composición química de *Columellia obovata* Ruiz & Pav.

En el análisis fitoquímico de los EHH de *Columellia obovata* Ruiz. & Pav. “pisca pisca” los alcaloides y flavonoides fueron encontrados en mayor concentración, seguido de fenoles, taninos, glicósidos cardiotónicos, saponinas, catequinas y iridoides⁽¹⁹⁾.

2.2.1.7 Tamizaje Fitoquímico

Los grupos químicos primarios que se encuentran en la planta se pueden identificar cualitativamente mediante un cribado fitoquímico, que luego ayuda a dirigir la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para aislar los grupos que sean más interesantes.

Las plantas desempeñan un papel vital en la biosíntesis y el almacenamiento de una amplia gama de moléculas químicas conocidas como metabolitos primarios y secundarios, que tienen un uso potencial en la industria farmacéutica.

a) Metabolitos primarios

Las sustancias más frecuentes en la naturaleza son los subproductos del metabolismo primario, que son proteínas, ácidos nucleicos y las formas más frecuentes de carbohidratos y lípidos. Estas sustancias se encuentran en todas las plantas y son cruciales para su metabolismo básico⁽⁴⁴⁾.

b) Metabolitos secundarios

Estos son los compuestos activos producidos por muchas especies de plantas que son vitales para el crecimiento y la reproducción de las plantas pero que tienen funciones importantes dentro del reino de las plantas. Además, los metabolitos secundarios tienen una distribución restringida dentro del reino vegetal, lo que la diferencia de los metabolitos primarios (aminoácidos, nucleótidos, azúcares y acilípidos). En otras palabras, los metabolitos primarios están presentes

en todo el reino vegetal, mientras que un metabolito secundario particular a menudo se encuentra en una sola especie vegetal o en un grupo de especies relacionadas⁽⁴⁵⁾.

Las siguientes son las categorías principales de sustancias producidas por plantas que exhiben actividad antibacteriana:

Fenoles y heterósidos fenólicos

a. Compuestos fenólicos simples. Su actividad antibacteriana está ligada a sus grupos hidroxilo, que conducen a una inhibición enzimática por sustancias oxidadas, por interacciones con grupos sulfhidrilo o por contacto inespecífico con proteínas. Estos compuestos están compuestos por un anillo fenólico sustituido.

b. Quinonas. Estas sustancias están formadas por anillos aromáticos con dos funcionalidades, ceto que se combinan formando complejos con los aminoácidos hidrófilos de las proteínas, inactivando y anulando sus acciones.

c. Taninos. Se trata de compuestos fenólicos poliméricos que tienen la capacidad de unirse a proteínas de membrana para crear complejos que bloquean enzimas, privan a las células de su sustrato, dañan la membrana y otros efectos.

d. Cumarinas. Estas sustancias se originan a partir de la benzo- α -pirona, que es una combinación de anillos de pirona y benceno. Su actividad antibacteriana está mediada por su contacto con el ADN eucariota, lo que también explica su asociación con la actividad antiviral.

e. Flavonas y compuestos relacionados. Su efecto antibacteriano se debe a que son compuestos fenólicos con un grupo carbonilo; se unen a la pared bacteriana y a las proteínas extracelulares de forma similar a las quinonas.

Alcaloides. Se trata de sustancias químicas nitrogenadas heterocíclicas y parece que su forma de funcionar es intercalándolas entre el ADN del microorganismo y la pared celular.

Polipéptidos. Son moléculas grandes compuestas de aminoácidos y funcionan inhibiendo competitivamente la unión de las proteínas de los microbios a los receptores de polisacáridos del huésped o formando canales iónicos en la membrana bacteriana.

2.2.2 Actividad antimicrobiana

La inmunidad innata de las plantas abarca varios mecanismos de defensa, como proteínas vinculadas a enfermedades, fabricación de enzimas líticas, refuerzos de la pared celular y formación de metabolitos secundarios. Las plantas acumulan metabolitos secundarios, que proporcionan barreras químicas contra los ataques microbianos y producen antimicrobianos para defenderse de los microbios dañinos⁽⁴⁶⁾.

La actividad antimicrobiana en las plantas se ha investigado durante siglos y sigue siendo un campo de estudio interminable. Para defenderse de patógenos dañinos como bacterias, hongos y virus, las plantas han desarrollado una serie de mecanismos defensivos naturales. Entre estos sistemas de defensa se encuentra la síntesis de moléculas químicas con cualidades antibacterianas, que les permiten defenderse y resistir infecciones. Estas sustancias, que reciben el nombre de fitoalexinas y fitoanticipinas, son esenciales para la forma en que las plantas se defienden contra las invasiones microbianas. Las plantas crean sustancias químicas llamadas fitoalexinas como reacción a una infección microbiana. Estas sustancias previenen la propagación de infecciones actuando como armas químicas⁽⁴⁷⁾.

2.2.2.1 Inhibición *in vitro*

Describe la capacidad de una sustancia para detener o disminuir una función o actividad biológica en un laboratorio bajo condiciones controladas, es esencial para la investigación biomédica y farmacéutica para evaluar la capacidad de una sustancia y bloquear procesos biológicos concretos, como el crecimiento de microbios nocivos, la proliferación celular o la actividad enzimática, en este contexto se emplea con frecuencia la inhibición *in vitro*. Los efectos

de las sustancias químicas se pueden observar de forma independiente gracias a estos experimentos, que se llevan a cabo en entornos controlados y alejados de organismos vivos⁽⁴⁸⁾.

Debido a que la inhibición in vitro se realiza en un laboratorio, los investigadores tienen control total sobre los parámetros y circunstancias del experimento. Los cultivos celulares o microbianos se utilizan para evaluar los efectos de una sustancia química sobre el crecimiento, la viabilidad o la función de microorganismos como virus, hongos, bacterias o células eucariotas. Los microorganismos suelen estar expuestos a concentraciones variables del fármaco en estudio en experimentos in vitro, lo que permite determinar la concentración mínima necesaria para ejercer un efecto inhibitorio. En el caso de los agentes antimicrobianos, este valor se denomina CMI, y es fundamental para evaluar la eficacia de los tratamientos y la sensibilidad de los microbios a estos medicamentos.

Los métodos más usados para las pruebas de inhibición in vitro se basan en difusión y dilución.

2.2.2.1.1 Métodos de difusión

Este enfoque cualitativo es adecuado para microorganismos no exigentes y de rápido crecimiento y se distingue por su facilidad de estandarización.

a) El método de difusión en pozos de agar

Evalúa la actividad antibacteriana de una planta o un extracto microbiano. Igual al método de difusión en disco, se extiende un volumen del inóculo microbiano sobre toda la superficie del agar para inocularlo. Posteriormente, se utiliza un punzón o punta de corcho estéril para perforar asepticamente un orificio de 6 a 8 mm de diámetro. Luego se añade al pocillo un volumen de 20 a 100 μl del agente antimicrobiano o solución de extracto en la concentración deseada. A continuación, se aplican a las placas de agar las condiciones de incubación específicas del

microorganismo de prueba. Se evita que la cepa microbiana en estudio crezca a medida que el fármaco antimicrobiano impregna el medio de agar⁽⁴⁸⁾.

2.2.2.1.2 Métodos de dilución

Estas técnicas son adecuadas para determinar cuantitativamente la actividad antibacteriana. Este método implica mezclar una cierta cantidad de medio de crecimiento con una cierta cantidad de extracto de planta o componente activo. Se puede realizar con un material líquido o sólido⁽⁴⁹⁾.

a) Macro-dilución en caldo

La utilización del método de macrodilución en caldo es una forma útil de evaluar nuevos compuestos antibacterianos. Con este método se puede encontrar la concentración mínima inhibidora (CMI), que es la concentración más baja requerida para detener el crecimiento del microorganismo objetivo⁽⁵⁰⁾. Esto se logra preparando una serie de tubos (dilución en caldo), inoculándolos con un cierto volumen del medio de cultivo que contiene concentraciones progresivamente mayores del antimicrobiano a evaluar y luego agregándoles el inóculo bacteriano. Después de un período de incubación predeterminado, se toma en consideración el tubo de la serie que no muestra crecimiento; la concentración antimicrobiana allí está en línea con la concentración mínima inhibitoria (CIM).

2.2.2.1.3 Concentración inhibitoria mínima (CIM)

Posiblemente sea el método más adecuado para estudiar la sensibilidad. Es la concentración más baja de un antibiótico, cuando se aplica a un inóculo estándar del microorganismo diluido uno a uno en un caldo de agar, inhibe el crecimiento bacteriano observable en 16 a 24 horas⁽⁵¹⁾.

Esto permitirá determinar la concentración necesaria del antibiótico para detener el crecimiento de las bacterias.

2.2.2.1.4 Concentración bactericida mínima (CBM)

Es la concentración mínima del antibiótico que reduce la población de colonias viables en un 99,9% de las iniciales, después de una incubación de 16-24 horas en caldo de cultivo⁽⁵¹⁾.

2.2.2.1.5 Plantas como fuente de antimicrobianos

Las plantas han sido una de las fuentes más valiosas de moléculas con valor terapéutico a lo largo de la historia de la humanidad. Gran parte de la medicina tradicional de cada civilización se basa en productos naturales⁽⁵²⁾. Se sabe que las plantas sintetizan una amplia gama de compuestos, como quinonas, taninos, terpenoides, alcaloides, flavonoides y polifenoles que tienen propiedades para contrarrestar diferentes enfermedades infecciosas⁽⁵²⁾.

Los flavonoides son metabolitos secundarios presentes en todas las plantas verdes y juegan un papel clave en la protección de las plantas contra los patógenos. Los flavonoides presentan actividad bactericida e impiden la formación de biopelícula (un conjunto de células microbianas que se mantienen unidas entre sí gracias a una sustancia elaborada por estos mismos microorganismos). Además, pueden actuar sinérgicamente con los antibióticos convencionales para aumentar el efecto bactericida ante algunas bacterias. Los flavonoides interactúan con la membrana bacteriana, donde interrumpen las bicapas de fosfolípidos e inhiben la cadena respiratoria y la síntesis de Adenosín Trifosfato (ATP). Se ha reportado que los flavonoides derivados de las hojas de nuez son efectivos contra *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina⁽⁵²⁾.

Otro ejemplo son los taninos, un metabolito secundario común de muchas plantas, se consideran una opción potencial a los antibióticos convencionales, ya que sus propiedades para secuestrar el hierro, inhiben la síntesis de la pared celular e interrumpir la continuidad de las membranas celulares. Además, pueden inhibir vías biosintéticas y evitar la formación de biopelícula en bacterias gramnegativas y grampositivas. Se ha encontrado que el té negro, que

contiene ácido tánico, puede reducir la colonización nasal y faríngea de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina y evita la formación de biopelícula^(52,53)

Además, las saponinas, metabolitos secundarios de diversas plantas, presentan actividad antimicrobiana contra cepas de enterococos resistentes a la vancomicina⁽⁵⁴⁾.

Los alcaloides son otro ejemplo de metabolitos, derivados de las partes aéreas del *Solanum dulcamara L.*, presentan actividad contra *Streptococcus pyogenes*, *S. epidermidis* y *Staphylococcus aureus*⁽⁵⁵⁾. Además, comprender el modo de acción y concentraciones de estos compuestos a las cuales se inhibe el crecimiento de un patógeno es crucial para desarrollar nuevos tratamientos.

2.2.2.2 Características de las cepas en estudio

2.2.2.2.1 *Staphylococcus aureus*

Los principales reservorios de *Staphylococcus aureus* son las personas y los animales. Es una bacteria esférica (cocos) Gram-positiva, anaeróbica facultativa, con un diámetro de 0,5 a 1,5 μm . Es inmóvil y no genera esporas, sino racimos de células irregulares como racimos de uvas. La forma más común de propagación de la contaminación en el lugar de trabajo es mediante el consumo de alimentos contaminados. También puede transmitirse por contacto con personas y animales, principalmente a través de heridas y mucosas contaminadas. También puede propagarse accidentalmente a través de cortes o pinchazos con objetos contaminados, dando lugar a infecciones localizadas en la piel y mucosas (como el impétigo), así como infecciones internas que pueden empeorar en personas inmunocomprometidas y provocar endocarditis, meningitis, artritis séptica, neumonía y osteomielitis, todas las cuales pueden ser fatales para los humanos⁽⁵⁶⁾.

Esta bacteria grampositiva ha sido objeto de una gran cantidad de investigaciones debido a la variedad de enfermedades que puede causar tanto en personas como en otros animales. Desde infecciones cutáneas menores como forúnculos o impétigo hasta enfermedades más graves como

neumonía, sepsis, osteomielitis y endocarditis, este patógeno puede causarle todas. Un atributo que la distingue debido a su resistencia inherente a numerosos factores ambientales y desinfectantes, es que puede prosperar y propagarse en una amplia gama de entornos. Esta flexibilidad es una de las explicaciones de por qué debido a su resistencia a los medicamentos, plantea un riesgo en entornos hospitalarios donde las infecciones nosocomiales pueden ser difíciles de tratar⁽⁵⁶⁾.

1.2.2.2.2 *Escherichia coli*

Debido a sus flagelos peritricos no encapsulados, estas bacterias aerobias y anaerobias facultativas gramnegativas tienen forma de bacilo con un diámetro de 1 a 3 µm. Suelen ser móviles y sólo se presentan en pares o cadenas cortas. 37°C es la temperatura ideal para su crecimiento. Los intestinos delgado y grueso de muchas especies animales, así como las heces de los humanos, albergan la bacteria *E. coli*. Está presente sin dañar a nadie y es un componente de la flora intestinal natural. Responsable de producir más del 80% de las infecciones del aparato urinario y diarrea⁽⁵⁶⁾.

Esta bacteria gramnegativa se encuentra en los intestinos de humanos y otros animales, y es esencial para los procesos implicados en la síntesis y digestión de vitaminas. No obstante, cepas específicas de *E. coli* pueden provocar dolencias gastrointestinales y otras afecciones porque crece rápidamente y puede adaptarse a una variedad de circunstancias ambientales⁽⁵⁶⁾.

2.3. Formulación de hipótesis (si aplica)

2.3.1 Hipótesis general

Ho: El EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” no presenta efecto antimicrobiano *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

H₁: El EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” presenta efecto antimicrobiano *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

2.3.2 Hipótesis específicas

1. Ho: No existen algunos metabolitos secundarios con posible efecto antimicrobiano, del EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca”

H1: Existen algunos metabolitos secundarios, con posible efecto antimicrobiano, del EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca”

2. Ho: El EHH *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” no presenta efecto antimicrobiano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

H1: El EHH *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” presenta efecto antimicrobiano frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

3. Ho: El EHH *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” no presenta efecto antimicrobiano frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

H1: El EHH *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” presenta efecto antimicrobiano frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922.

Ho: No presenta una concentración específica del EHH *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” con mayor efecto antimicrobiano in vitro frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922

Hi: Presenta una concentración específica del EHH *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” con mayor efecto antimicrobiano in vitro frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922

5. Ho: No presenta la CMI y CMB el EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

H1: Presenta la CMI y CMB el EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

CAPÍTULO III. METODOLOGÍA

3.1. Método de la investigación

La técnica hipotético-deductiva, que se describe como “el método que parte de una hipótesis, para posteriormente obtener conclusiones derivadas de ella, las cuales deben ser verificadas experimentalmente”, sirvió como base para este estudio⁽⁵⁷⁾.

Con este método, primero se formula una hipótesis y luego se prueba y experimenta rigurosamente para llegar a conclusiones respaldadas por evidencia sustancial. La formación de una hipótesis es el primer paso de la técnica hipotético-deductiva en esta situación, la cual puede ser que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. exhibe actividad antimicrobiana contra las cepas indicadas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Esta teoría se basa en el conocimiento previo de las características de la planta, incluido su uso histórico como medicina y las cualidades farmacológicas que se le han relacionado.

3.2. Enfoque investigativo

El estudio fue de enfoque cuantitativo, porque mediante esto, se hizo el uso de datos numéricos y procedimientos estadísticos para describir características y fenómenos específicos relacionados a los variables de la investigación⁽⁵⁷⁾.

3.3. Tipo de investigación

Aplicada, se aplicó el conocimiento previo producto de otros estudios, de forma práctica y aumentó el conocimiento⁽⁵⁷⁾.

3.4. Diseño de la investigación

El diseño de la investigación fue experimental debido a que se manipuló la variable independiente (EHH *Columellia obovata* Ruiz & Pav. en diferentes concentraciones) y se determinó su efecto sobre la variable dependiente (efecto antimicrobiano en cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*). Además, se empleó grupos control para observar que la variación de la variable dependiente no se deba a otras causas.

3.4.1 Corte

Transversal: los datos se recopilaron en un momento y lugar determinados⁽⁵⁷⁾.

3.4.2 Nivel

Explicativo, porque se evaluó una relación de causa y efecto⁽⁵⁸⁾.

Comparativo, porque permite contrastar los resultados del experimento.

3.5. Población, muestra y muestreo

3.5.1. Población

La población de estudio estuvo conformada por 2 kilogramos de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz. & Pav. “pisca pisca” recolectadas en el centro poblado de Masingana, distrito de Santillana, provincia de Huanta-Ayacucho a 3,474 m.s.n.m de altitud, la cual se obtuvo considerando los criterios de inclusión y exclusión detallados a continuación.

Criterios de inclusión: hojas frescas de *Columellia obovata* libres de cualquier tipo de lesión.

Criterios de exclusión: se excluyeron la raíz, tallos, flores, cortezas y hojas lesionadas.

La población bacteriana estuvo conformada por cultivos de cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 en 24 placas Petri de agar Müller-Hinton, las cuales se obtuvieron considerando los siguientes:

Criterios de inclusión: Cepas con características macroscópicas similares.

Criterios de exclusión: Cepas contaminadas o con características diferentes.

3.5.2 Muestra: Se emplearon toda la población.

3.5.3 Muestreo: No se utilizó muestreo.

3.6. Variables y operacionalización

Variable independiente:

-Extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz. & Pav. “pisca pisca”

Variable dependiente:

-Efecto antimicrobiano *in vitro*

Tabla 2*Variable y operacionalización*

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Escala de medición	Escala valorativa
Variable 1: Extracto hidroalcohólico de las hojas, <i>Columellia obovata Ruiz & Pav</i> “pisca pisca”	Disolución conseguida por la extracción de una porción de planta o parte de ella, frecuentemente utilizando un disolvente como alcohol etílico o agua ⁽⁵⁹⁾ .	A partir del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Columellia obovata Ruiz & Pav</i> (pisca pisca) obtenida por maceración con etanol 70 % se prepararon concentraciones de 25 %, 50 %, 75 % y 100%. Además, se harán la marcha fitoquímica.	D1: Concentraciones de extracto hidroalcohólico	-Concentración al 25%	Ordinal	Concentración /porcentual (%p/p)
				- Concentración al 50%		
				- Concentración al 75%		
				- Concentración al 100%		
Variable 2: Efecto antimicrobiano <i>in vitro</i>	La actividad o eficacia antimicrobiana es la capacidad que tiene un agente para inhibir el aumento de una población de bacterias o para exterminarlas y se puede manifestar de forma cuantitativa en pruebas <i>in vitro</i> ⁽⁶⁰⁾ .	El efecto antimicrobiano se medirá de acuerdo con el halo inhibitorio que se forme sobre las placas de microorganismos.	D2. Metabolitos secundarios	-Identificación de componentes fitoquímicos	Nominal	(-) Ausencia (+) Leve
			D1: Grado de sensibilidad antimicrobiana	Diámetro del halo de inhibición (mm).	Ordinal	Escala de Duraffourd: (-) Nula (+) Sensible (++) Muy sensible (+++): Sumamente sensible
			D2: Concentración mínima inhibitoria (CMI) en mg/dL	Unidades Formadoras de colonias (UFC)	Ordinal	(-): < 1 UFC/mL (+) :< 50 000UFC/mL (++) :< 50 000UFC/mL a 100 000 UFC/mL (+++): >100 000 UFC/mL
			D3: Concentración mínima bactericida (CMB) en mg/dL	Grado de turbidez	Nominal	No hay turbidez Hay turbidez

3.7. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.7.1 Técnica

La técnica empleada fue la observación.

El instrumento fue la ficha de recopilación de datos.

3.7.2 Descripción de instrumentos

Se registraron el diámetro de los halos de inhibición obtenidos por medio del efecto del extracto, el cual estuvo conformado por dos grupos, divididos en experimentales (25%, 50%, 75% y 100%) y controles (negativo y positivo) y marcha fitoquímica. (Anexo 2)

3.7.3 Procedimiento para recolección de datos

A. Procedimiento para recolección del extracto vegetal

- Recolección de la Muestra vegetal

Las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. se recolectaron en el centro poblado de Masingana, distrito de Santillana, provincia de Huanta Ayacucho, a una altitud de 3295 msnm. La planta fue identificada en el herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con el ejemplar número 174. (Anexo 9)

B. Ensayo fitoquímicos

- Preparación del extracto hidroalcohólico

El extracto se preparó según Morais *et al.*⁽⁶¹⁾ (2020) con algunas modificaciones. Brevemente, para la preparación de los extractos hidroalcohólicos, las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. Se seco y luego fue pulverizado y se realizó la extracción mediante el método de maceración con etanol al 70%, pasando por el rotavapor, dando como resultado el extracto crudo de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. El extracto obtenido fue reconstituido con etanol al 70% a una concentración de 1000 mg/mL (100%), 750 mg/mL (75%), 500 mg/mL (50%) y 25% (250mg/mL).

Tamizaje Fitoquímico:

Se realizaron las pruebas fitoquímicas preliminares según Lock de Ugaz⁽²⁰⁾, mediante cambios de coloración o formación de precipitados. Para lo cual se utilizó 1g de extracto hidroalcohólico seco de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav “pisca pisca” diluida en 20 mL de etanol. Se colocaron 1 mL del extracto en cada tubo de ensayo y se agregaron los reactivos respectivos, donde se identificaron la presencia o ausencia de los metabolitos primarios y secundarios de esta especie.

C). Actividad antibacteriana:

El estudio se llevó a cabo siguiendo los métodos descritos por Chafla-Moina y Silva-Déley⁽²¹⁾ (2023). La actividad antibacteriana se evaluó mediante la técnica de difusión en pozo. Primero, se activó la cepa en agar caldo cerebro corazón (BHI) utilizando el método de estrías con el liofilizado reconstituido en agua estéril. Luego, se incubó durante 24 horas a 37°C y se observó el crecimiento bacteriano. Se tomaron de dos a cinco asadas de cada colonia de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, y se diluyeron en caldo BHI hasta una concentración de 1.5×10^8 UFC, usando el escalímetro de MacFarland como referencia. Con esta dilución, se sembraron placas de agar Mueller Hinton, dividiéndolas en 12 placas con 3 pocitos cada una y en otras 12 placas con 2 pocitos, destinados para los tratamientos experimentales y los controles, respectivamente. En cada pocito se añadieron 20 uL de muestra y se incubaron durante 24 horas. Después de este periodo, se midieron los halos de inhibición y se registraron en la ficha de recolección de datos.

3.7.3 Validación

El instrumento estructurado en este estudio está sujeto a evaluación de expertos. Los expertos serán seleccionados por la universidad y se reunirán para examinar las guías de observación creadas específicamente para este estudio. Así, los profesionales que serán:

- ✓ Dr. Orlando Juan Marquez Caro
- ✓ Mg. Carmela Gelida Barboza Justiniano
- ✓ Dr. Nesquen José Tasayco Yataco

3.7.4 Confiabilidad

De acuerdo con Guzmán, según lo citado por Arispe *et al* ⁽⁶²⁾ “Existen instrumentos que no necesitan realizar la confiabilidad como: Listas de cotejo, entrevistas, guías de observación, registros, rúbricas”⁽⁶²⁾.

3.8. Plan de procesamiento y análisis de datos

Se procesará y organizará los resultados mediante el programa Microsoft Excel 2016 y software IBM.SPSS versión 25. Mediante el programa inicialmente señalado, se hallará la media muestral, desviación estándar, valores mínimo y máximo con la finalidad de describir cada conjunto de resultados por sustancia de prueba. Por otro lado, con el segundo programa estadístico se realizará la estadística inferencial, la cual, se iniciará con la prueba de Shapiro-Wilk ($n < 50$) con el objetivo de evaluar si los resultados obtenidos de las sustancias de prueba presentarán, o no, una distribución Normal. La evaluación de la normalidad de datos será para definir el tipo de parámetros estadísticos (Prueba de ANOVA u otro estadístico paramétrico o no paramétrico) se deberá usar para establecer las diferencias significativas entre grupos muestrales y, en consecuencia, la concentración de *Columellia obovata* Ruiz & Pav que presentará mayor efectividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* respectivamente. Se trabajará con un nivel de confianza al 95%

3.9. Aspectos éticos

Durante la planificación y ejecución del estudio se respetarán los principios bioéticos de la investigación, además de los expuestos en la Declaración de Helsinki.

Se respetarán los principios éticos y las normas de laboratorio para el desarrollo de trabajos de investigación, cumpliendo con la correcta manipulación y eliminación de los microorganismos empleados.

CAPÍTULO IV. PRESENTACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 Resultados

Obtención del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata*

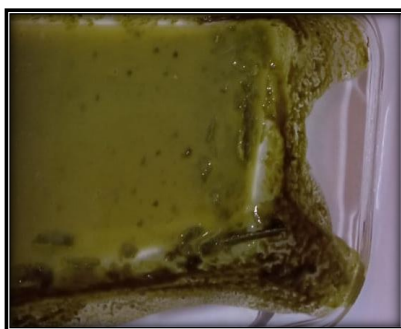
Tabla 3

Características organolépticas del extracto obtenido.

Extracto	Textura	Color de extracto	Olor
Hidroalcohólico	rugosa	Verde musgo	Característico

Figura 1

Extracto liofilizado de Columellia obovata Ruiz & Pav. “Pisca pisca”



Se observan las características organolépticas descritas en la tabla 3 y visualizado en la figura 1.

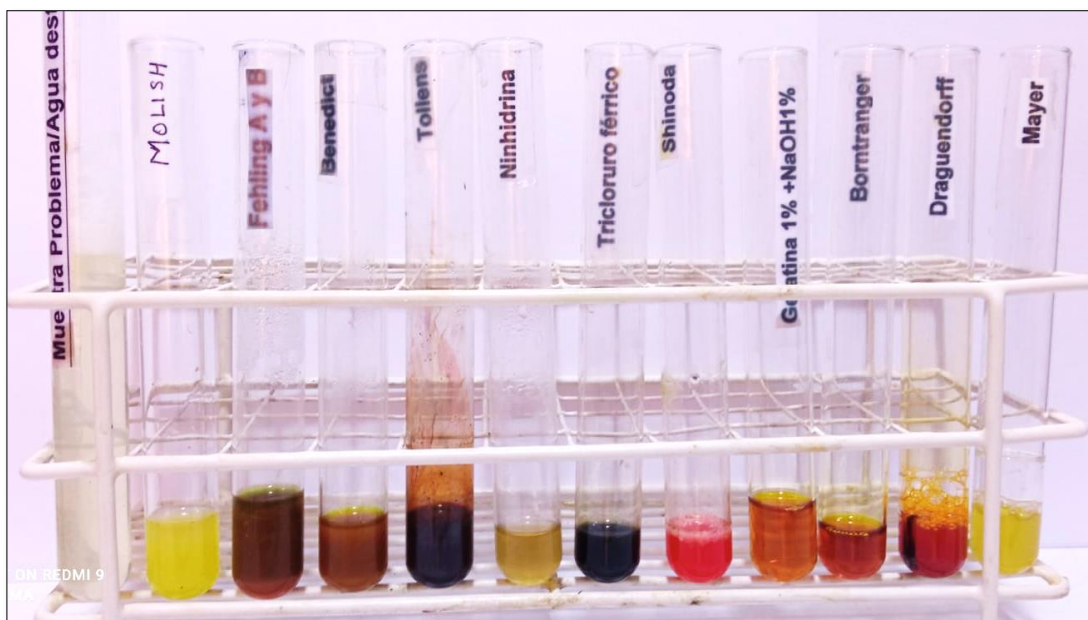
Tabla 4*Análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico de las hojas de Columellia obovata*

Fitoquímicos	Reactivos	Especificación	Resultado
Carbohidratos	Molish	Color verde claro	-
Azúcares reductores	Felhing A y B	Precipitado rojo ladrillo	+
Azúcares reductores	Benedict	Precipitado rojo ladrillo	+
Azúcares reductores	Tollens	Espejo de plata o negro oscuro	+
Grupos Aminos libres	Ninhidrina	No hay color azul	-
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	Coloración azul oscuro	+
Flavonoides	Shinoda	Coloración rojo magenta	+
Taninos	Gelatina/NaOH 1%	Coloración naranja rojiza	+
Antraquinonas	Borntrager	Color rojo naranja	+
Alcaloides	Drangendorff	Precipitado rojo anaranjado	+
Alcaloides	Mayer	Precipitado blanco amarillento	+
Saponinas	Agua destilada	Formación de escasas espumas	+

Leyenda: (+) Presencia (-) Ausencia

Figura 2

Análisis fitoquímico el EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca”



Nota. Fuente propia

En la tabla 4 y figura 2, en el ensayo fitoquímico se detectaron de manera cualitativa la presencia de azúcares reductores, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, antraquinonas, alcaloides y saponinas en el EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “Pisca pisca”.

Tabla 5

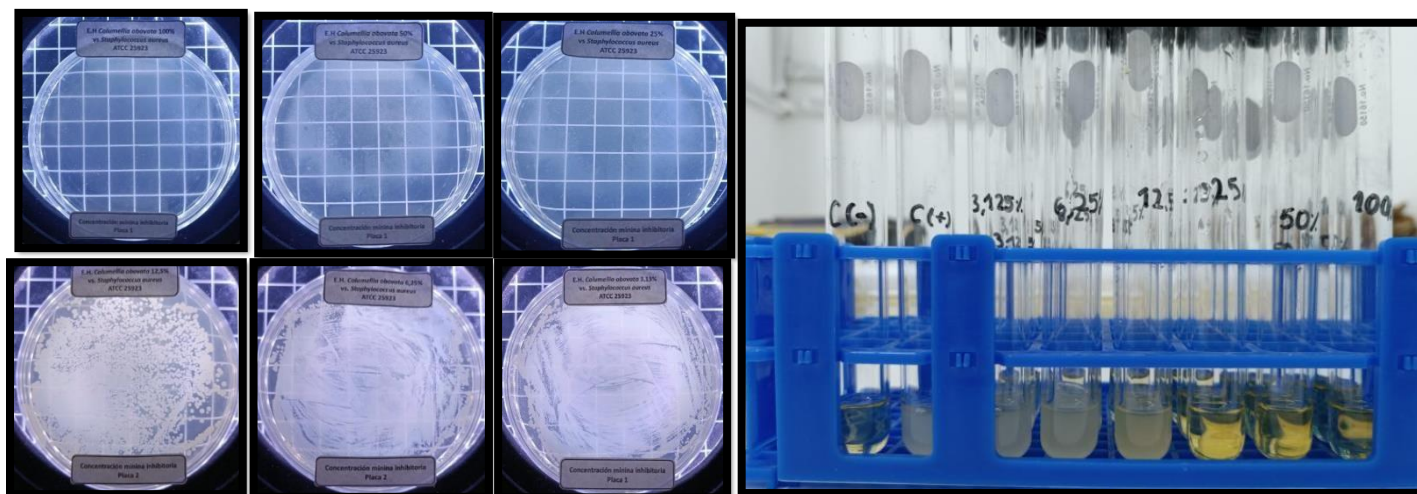
Determinación de CMI y CMB del EHH de Columellia obovata Ruiz & Pav. sobre cepas de Staphylococcus aureus ATCC 25923

Extracto	<i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav.	
Microorganismo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	
Concentración de extracto (mg/mL)	Crecimiento en placa (CMI)	Turbidez visible (CMB)
1000mg/mL (100%)	-	-
500 mg/mL (50%)	-	-
250 mg/mL (25%)	-	-
125 mg/mL (12,5 %)	+	+
62,5 mg/mL (6,25%)	+	+
31,3 mg/mL (3,13%)	+	+

Leyenda: (-): Ausencia de crecimiento (ausencia de turbidez) / (+): crecimiento (presencia de turbidez)

Figura 3

Concentración mínima inhibitoria del EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



En la tabla 5 y figura 3 se observó la concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue a una concentración de 250 mg/mL. En resumen, se evidenció que el extracto presentó capacidad bacteriostática y bactericida.

4.1.1 Análisis descriptivo de resultados

Tabla 6

Efecto antimicrobiano del extracto hidroalcohólico de Columellia obovata Ruiz & Pav. “Pisca pisca”

Cepas bacterianas	<i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav.	n	mm	Duraffourd*	Desv. estándar	Min	Máx.
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	100%	10	18,17	(++)	3,48	14,29	24,50
	75%	10	16,75	(++)	2,65	13,74	20,59
	50%	10	14,65	(++)	1,49	12,76	16,90
	25%	10	11,84	(+)	2,51	9,06	18,13
	Gentamicina 160mg	10	34,10	(+++)	0,79	33,29	35,60
	Suero fisiológico al 0,9%	10	-----	(-)	0,00	-----	-----
	100%	10	-----	(-)	0,00	-----	-----
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	75%	10	-----	(-)	0,00	-----	-----
	50%	10	-----	(-)	0,00	-----	-----
	25%	10	-----	(-)	0,00	-----	-----
	Gentamicina 160mg	10	27,26	(+++)	1,43	24,89	28,45
	Suero fisiológico al 0,9%	10	-----	(-)	-----	-----	-----

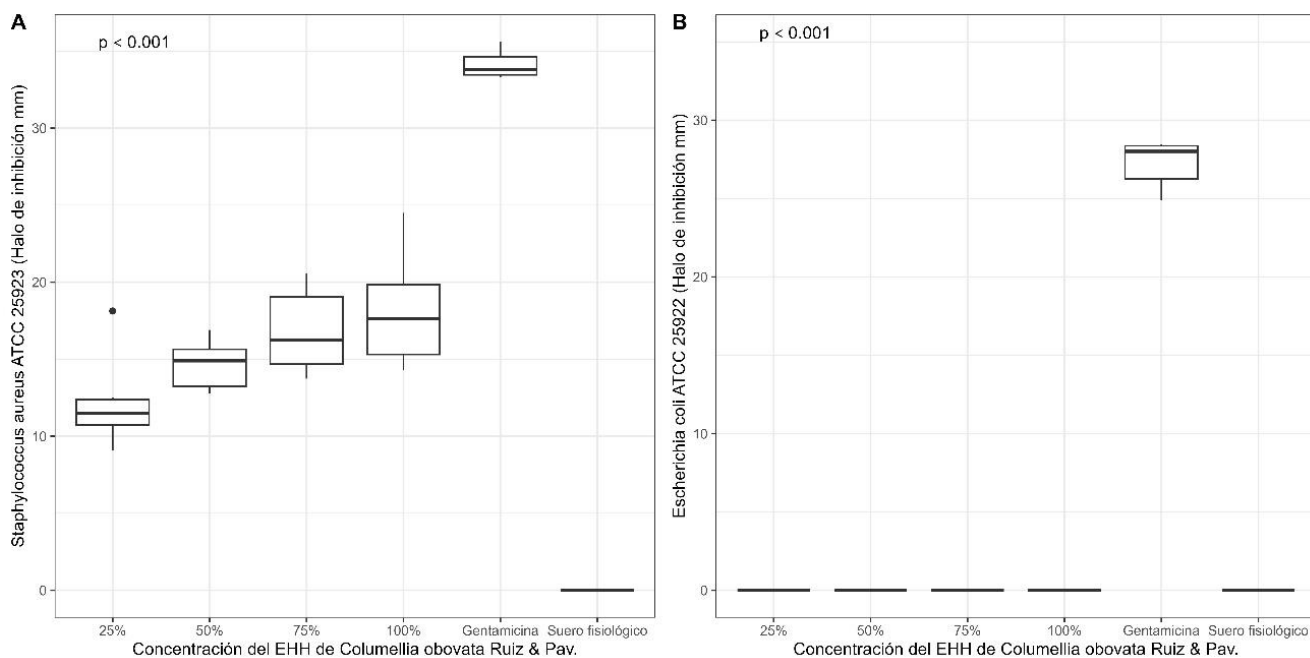
(-----) Ausencia de halo de inhibición

(*) Escala de sensibilidad de Duraffourd: Nula (-): 0 a 8 mm; Sensible (+): 8 - 14 mm; Muy sensible (++) : 14 - 20 mm.; Sumamente sensible (+++) : 20 mm a más.

En tabla 6, mediante los resultados de la investigación se demostró que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. a concentraciones de 100%, 75%, 50% y 25% presentaron efecto inhibitorio sobre *Staphylococcus aureus*. Por lo contrario, no presentaron efecto inhibitorio sobre *Escherichia coli* en las diferentes concentraciones. El control positivo (gentamicina 160mg/mL) mostró una zona de inhibición que varió de 27,26 a 34,10 mm contra las cepas ensayadas.

Figura 4

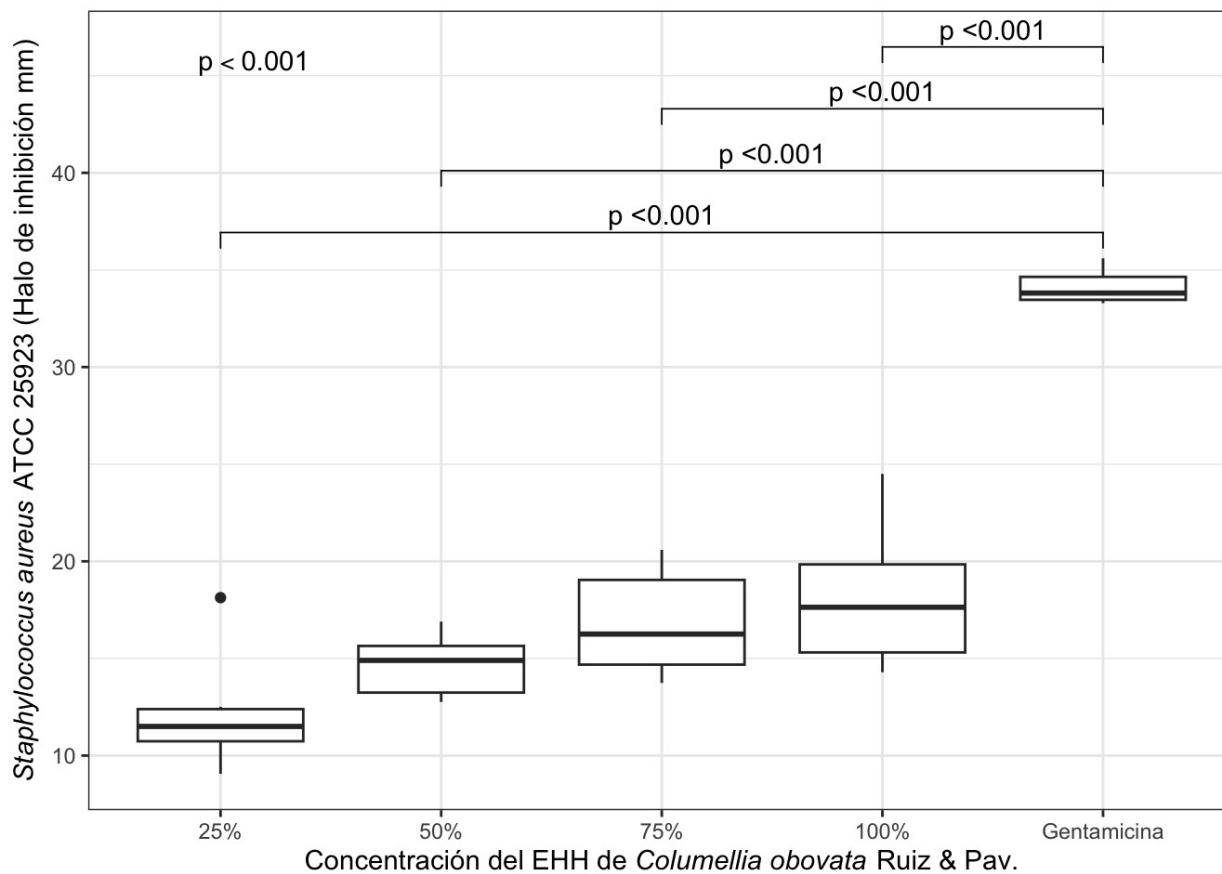
Gráfico de cajas y bigotes del halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* (A) y *Escherichia coli* (B) según el tratamiento.



En la figura 4 se realizó la comparación del promedio de los halos de sensibilidad (mm) de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* frente a las diferentes concentraciones del extracto hidroalcohólico de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. La prueba de Kruskal-Wallis indicó presencia de diferencias significativas ($p < 0.001$). En ambas cepas estudiadas el grupo de gentamicina fue el que presentó mayor halo inhibitorio (media 34.10) a comparación de los otros grupos. Al comparar en el *Staphylococcus aureus* únicamente entre los grupos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* de las distintas concentraciones, la media del halo de inhibición incrementó progresivamente conforme del aumento de la concentración del extracto. Sin embargo, ni el grupo expuesto al 100% presentó un halo mayor que la gentamicina. En el caso de *Escherichia coli* todos los grupos expuestos al extracto presentaron un halo de inhibición cero similar al suero fisiológico.

Figura 5

Comparación del halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* entre las concentraciones y gentamicina.

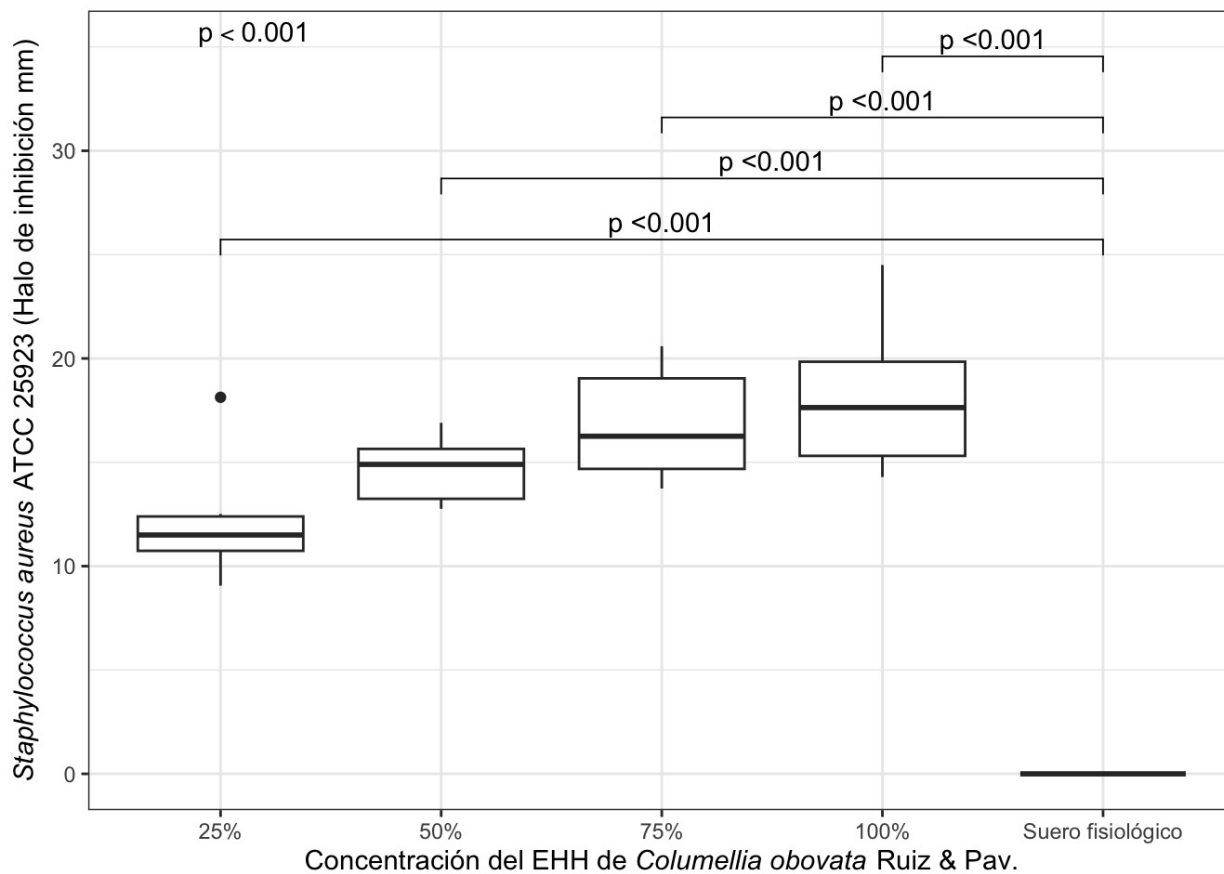


Valor p determinado mediante la prueba de U de Mann-Whitney para la comparación entre pares y Kruskal-Wallis para el valor p global

En la figura 5, al comparar por separado los halos de inhibición observados en cada uno de los grupos del extracto y la gentamicina, tanto el grupo del 25%, 50%, 75% y 100% tuvieron un halo menor que la gentamicina. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.001$)

Figura 6

Comparación del halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* entre las concentraciones y suero fisiológico.

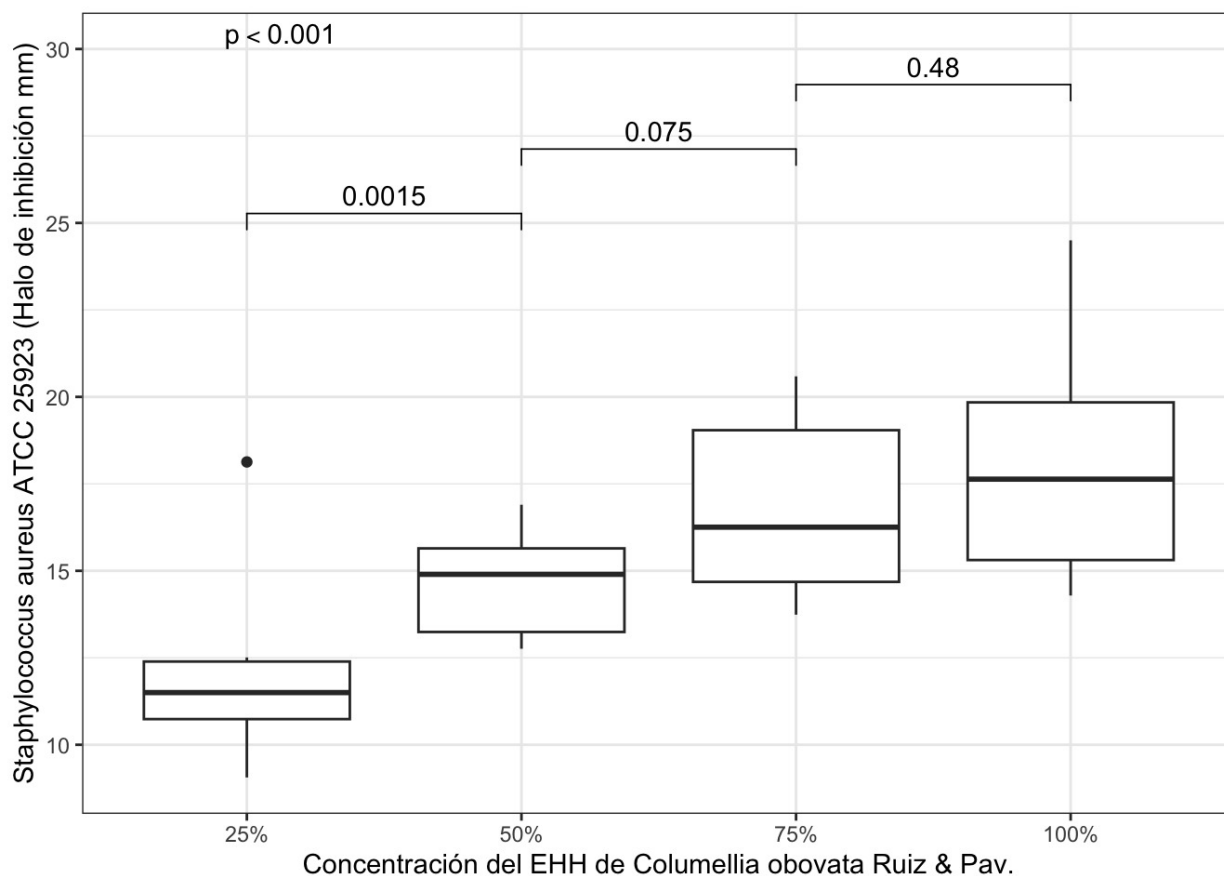


Valor p determinado mediante la prueba de U de Mann-Whitney para la comparación entre pares y Kruskal-Wallis para el valor p global.

En la figura 6 se realizó la comparación para evaluar la capacidad inhibitoria del extracto vs el suero fisiológico, observándose, tanto la concentración 25%, 50%, 75% y 100% tuvieron un halo de mayor longitud que el grupo de suero fisiológico. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p < 0.001$) En resumen que el extracto presentó capacidad inhibitoria, mientras que el control no presentó ninguna actividad frente a *Staphylococcus aureus*.

Figura 7

Comparación del halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* entre las concentraciones.



Valor p determinado mediante la prueba de U de Mann-Whitney para la comparación entre pares y Kruskal-Wallis para el valor p global.

En la figura 7 se realizó la comparación y según la evidencia en la formación del halo de inhibición entre los grupos expuesto a las distintas concentraciones del extracto. La prueba de Kruskal-Wallis nos indicó que sí hubo diferencias entre los cuatro grupos ($p < 0.001$). Al comparar la concentración entre 25% y 50%, observándose el incremento del halo estadísticamente significativa. ($p = 0.002$). Sin embargo, al comparar las concentraciones del 50 y 75% se observó un incremento del halo, y la diferencia ya no fue estadísticamente significativo ($p = 0.075$). Similar situación se observó al comparar el grupo de las concentraciones del 75 y 100% ($p = 0.480$). En

resumen, a la concentración 100% se observó mayor capacidad de inhibición en comparación de las concentraciones 75 y 50% y frente a 25% resultó ser significativamente elevada.

4.1.2 Prueba de hipótesis

Hipótesis general

El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” presenta efecto antimicrobiano *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Hipótesis estadística

H0: El EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” no presenta efecto antimicrobiano *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

H1: El EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” presenta efecto antimicrobiano *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Nivel de significancia: $\alpha = 0,05 = 5 \%$ de margen máximo de error

Regla de decisión: $p \geq \alpha \rightarrow$ se acepta la Hipótesis nula H_0

$p < \alpha \rightarrow$ se rechaza la Hipótesis nula H_0

Prueba estadística

Microorganismo	Sustancia de prueba	Kruskall Wallis (Valor p)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav vs. Suero fisiológico al 0,9%	0,000
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav vs. Suero fisiológico al 0,9%	1,000

Conclusión: Dado que la probabilidad es 0.000 es menor que el nivel de significancia, se acepta la H_1 ($p = 0.000 > \alpha = 0.05$), por lo tanto, el EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav,

presentó efectividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*. Con respecto a *Escherichia coli*, la probabilidad es 1,000 significó que este último no presentó actividad antimicrobiana frente *E. coli*. Por lo anterior, se aceptó, de manera parcial, la Hipótesis alternativa general (H_1) y con el 95 % de confianza, se pudo afirmar el EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” presentó efecto antimicrobiano *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, pero no frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

Hipótesis Específica 1

1. H_1 : Existen algunos metabolitos secundarios, con posible efecto antimicrobiano, del EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca”

H_0 : No existen algunos metabolitos secundarios con posible efecto antimicrobiano, del EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca”

Para constatar la primera hipótesis específica, se realizó el estudio fitoquímico preliminar del extracto hidroalcohólico, mediante ensayos de coloración y precipitación, dependiendo de los grupos químicos presentes en la muestra vegetal, se identificó los metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, en la tabla 4 y figura 2, se evidencian las reacciones positivas para la presencia de los: compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, antraquinonas, alcaloides y saponinas. La presencia de estos grupos de metabolitos estaría relacionada con el efecto antimicrobiano de la *Columellia obovata*. Por lo tanto, se acepta la hipótesis alterna (H_1) y se rechaza la hipótesis nula (H_0). Conclusión: El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “Pisca pisca”, posee metabolitos secundarios con efecto antimicrobiano.

Hipótesis específica 2

El EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” presenta efecto antimicrobiano *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Hipótesis estadística

H0: El EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” no presenta efecto antimicrobiano *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

H1: El EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” presenta efecto antimicrobiano *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Nivel de significancia: $\alpha = 0,05 = 5 \%$ de margen máximo de error

Regla de decisión: $p \geq \alpha \rightarrow$ se acepta la Hipótesis nula H_0

$p < \alpha \rightarrow$ se rechaza la Hipótesis nula H_0

Microorganismo	Sustancia de prueba	Kruskall Wallis (Valor p)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav vs. Suero fisiológico al 0,9%	0,000

Conclusión: Observamos que la probabilidad (0.000) es menor al valor de significancia $\alpha = 0.05$, lo que nos indica que se rechaza la H_0 , por lo tanto, que el EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav presentó efectividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*.

Hipótesis específica 3

El EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” presenta efecto antimicrobiano *in vitro* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

Hipótesis estadística

H₀: El EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” no presenta efecto antimicrobiano *in vitro* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

H₁: El EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” presenta efecto antimicrobiano *in vitro* frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

Nivel de significancia: $\alpha = 0,05 = 5\%$ de margen máximo de error

Regla de decisión: $p \geq \alpha \rightarrow$ se acepta la Hipótesis nula H₀

$p < \alpha \rightarrow$ se rechaza la Hipótesis nula H₀

Prueba estadística

Microorganismo	Sustancia de prueba	Kruskall Wallis (Valor p)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav vs. Suero fisiológico al 0,9%	1,000

Conclusión: Se acepta la hipótesis nula H₀ dado que $p = 0.1,00 > \alpha = 0.05$, por lo tanto, no el EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav no presentó actividad antimicrobiana frente *Escherichia coli* ATCC 25922

Hipótesis específica 4

Presenta una concentración específica del EHH *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” con mayor efecto antimicrobiano *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC

Ho: No presenta una concentración específica del EHH *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” con mayor efecto antimicrobiano in vitro frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

H1: Presenta una concentración específica del EHH *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” con mayor efecto antimicrobiano in vitro frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Según la figura 7, se observó que la concentración del 100% del EHH *Columellia obovata* presentó mayor halo inhibitorio (18,16mm) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa (H1). En conclusión: La concentración de 100% del EHH *Columellia obovata* posee mejor actividad antimicrobiana frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Hipótesis específica 5

Presenta la CMI y CMB el EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

H0: No presenta la CMI y CMB el EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

H1: Presenta la CMI y CMB el EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

En la tabla 5 y figura 3, mediante el método de macrodilución se determinó la CMI y CMB frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a la concentración de 250mg/mL. Por lo tanto, se acepta la hipótesis alternativa (H₁). En conclusión: El EHH *Columellia obovata* posee efecto extracto presentó capacidad bacteriostática y bactericida frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

4.1.3 Discusión de resultados

En el presente estudio, se identificaron diversos metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* con posibles efectos antimicrobianos, tales como azúcares reductores, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, antraquinonas, alcaloides y saponinas.

En contraste, Mohamed *et al.*⁽²⁴⁾ (2020), se reportaron la presencia de esteroides, terpenos, taninos, comarinas y saponinas en los extractos metanólicos crudos obtenidos de *Pulicaria crispa* y *Pulicaria undulata* (Asteraceae), sin embargo, no se detectaron alcaloides, flavonoides ni antraquinonas en dichos extractos.

Por otro lado, se identificaron lactonas sesquiterpénicas/cumarinas, antraquinonas, esteroides/triterpenos, flavonoides y alcaloides en el extracto etanólico de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma” (Asteraceae)⁽²⁷⁾. Del mismo modo, se encontraron triterpenos, alcaloides, fenoles, flavonoides y esteroides en el extracto de las hojas de “Janqo janqo” (*Senecio candollei* Wedd) (Asteraceae)⁽²⁸⁾. Asimismo, Juárez *et al.*⁽²⁶⁾ (2023), identificaron flavonoides, alcaloides, carbohidratos, taninos, compuestos aromáticos y compuestos terpenoides de hojas y tallos de la especie vegetal *Jungia axillaris* (Lag. ex DC.) Spreng (Asteraceae).

Estos metabolitos también podrían contribuir a la actividad antimicrobiana observada en los diversos extractos. Es importante destacar que, la consideración de la relación filogenética se vuelve especialmente relevante en el caso de *Columellia obovata* debido a la falta de estudios específicos sobre esta especie en particular. Dado que la investigación sobre la actividad antimicrobiana de esta planta es limitada, la comprensión de su relación filogenética con otras especies de plantas dentro de las familias Apiaceae y Asteraceae puede proporcionar información valiosa sobre los posibles metabolitos secundarios presentes y su potencial efecto antimicrobiano.

Con respecto a la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB), en el estudio actual, el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* frente a *Staphylococcus aureus* se determinó en 250 mg/mL (25 %). Esto indica una capacidad bacteriostática y bactericida del extracto. Además, se demostró que el extracto posee efecto inhibitorio sobre dicha bacteria a concentraciones de 100 %, 75 %, 50 % y 25 %, con halos de inhibición de 18,17 mm, 16,57 mm, 14,65 mm y 11,84 mm, respectivamente. Al comparar los diferentes grupos del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* frente a *Staphylococcus aureus*, se observó un incremento progresivo en la media del halo de inhibición conforme aumentaba la concentración del extracto.

En los estudios de Cantoni ⁽²²⁾ (2021) y Chiavari ⁽²³⁾ (2020), se encontró actividad inhibitoria contra *S. aureus* ATCC 25923 utilizando extractos de *Campomanesia xanthocarpa* y especies de Asteraceae, con halos de inhibición de 14 mm y 19 mm, respectivamente. Asimismo, los extractos acuosos de *Bidens pilosa* y *Bidens sulphurea* también mostraron actividad antibacteriana contra *S. aureus*, con concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de 13,02 mg/ml y 7,81 mg/ml, respectivamente ⁽²³⁾. Cantoni ⁽²²⁾ observó que el extracto hidroalcohólico de *C. xanthocarpa* exhibió efecto inhibitorio a una concentración del 70%. Por otro lado, De la Cruz ⁽²⁹⁾ (2020) encontró que el extracto de aceite de *Artemisia absinthium* presentó un efecto bactericida contra esta bacteria, con un halo máximo de inhibición de 21,36 mm.

Mientras que en la presente investigación no se observó un efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* frente a *Escherichia coli*, en varios estudios, se encontró actividad antimicrobiana contra esta bacteria.

Por ejemplo, Ahmed *et al.* ⁽²⁵⁾ (2019) encontraron que los extractos de *Pimpinella anisum* inhibieron el crecimiento de *E. coli*, con zonas de inhibición de 4.0 ± 0.6 mm a una concentración de 5 mg/ml. Además, Huamaní ⁽²⁷⁾ (2022) observó una sensibilidad moderada del extracto de

Senecio nutans frente a esta bacteria, con halos de inhibición de 1,97 cm y 1,70 cm a concentraciones de 20 mg/ml y 80 mg/ml respectivamente.

Se puede suponer que los extractos hidroalcohólicos de la planta, objeto de estudio, no tienen actividad sobre *E. coli* (bacteria Gram negativa), probablemente debido a la presencia de compuestos anfipáticos en estas bacterias, los cuales funcionan como bombas de expulsión de diversas sustancias. Esto podría resultar en la expulsión inmediata del agente antibacteriano, sin que tenga la oportunidad de ejercer su efecto. Otras explicaciones posibles incluyen la incapacidad del compuesto activo para alcanzar el sitio de acción específico o la estructura de las porinas, que podrían obstaculizar el paso del principio activo hacia el interior de la célula bacteriana ⁽⁶³⁾.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

Se determinó el efecto antimicrobiano in vitro del EHH *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 este valor p. es <0.001 según la prueba Kruss Wallis. Mientras para *Escherichia coli* ATCC 25922 no se probó el efecto ya que el valor p es >0.005 .

Se identificaron los metabolitos secundarios presentes en el EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pica pisca” sustentado por el tamizaje fitoquímico compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, antraquinonas, alcaloides y saponinas, que son los posibles responsables del efecto antimicrobiano.

Se determinó el efecto antimicrobiano in vitro del EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 este valor p. es <0.001 según la prueba Kruss Wallis.

No se determinó el efecto antimicrobiano in vitro del EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 25922 ya que el valor p es >0.005 según la prueba Kruss Wallis.

Se determinó la concentración del EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” que presenta mayor efecto antimicrobiano frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 este valor p. es <0.001 según la prueba Kruss Wallis.

Se determinaron las CMI y CMB que presenta el EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 que fue de 250 mg/mL por el método de macrodilución.

5.2 Recomendaciones

- Es necesario realizar estudios in vivo, con el propósito de comprobar el efecto antimicrobiano.
- Aislar y cuantificar los compuestos fitoquímicos de esta especie vegetal para demostrar su importancia.
- Determinar la CMI y CMB por el método microdilución.

REFERENCIAS

1. Organización Panamericana de la Salud (OPS). La resistencia antimicrobiana pone en riesgo la salud mundial [Internet]. 2021 [citado 1 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/noticias/3-3-2021-resistencia-antimicrobiana-pone-riesgo-salud-mundial>
2. Organización Panamericana de la Salud. Patógenos multirresistentes que son prioritarios para la OMS - OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud [Internet]. 2021 [citado 1 de abril de 2024]. Disponible en: <https://www.paho.org/es/noticias/4-3-2021-patogenos-multirresistentes-que-son-prioritarios-para-oms>
3. Chalivendra P, Ganjikunta RK, K UR, Pullakanam RPT. IN VITRO ASSESSMENT OF NATURAL HERBAL EXTRACTS FOR ANTIMICROBIAL ACTIVITY. Int J Curr Pharm Res. 15 de marzo de 2023;22-5.
4. Benítez-Azahares GD. La integración física, química, biológica y geográfica en el uso de la Medicina Natural y Tradicional. Cienc Futuro. 7 de diciembre de 2020;10(4):58-72.
5. Maldonado C, Paniagua-Zambrana N, Bussmann RW, Zenteno-Ruiz FS, Fuentes AF. La importancia de las plantas medicinales, su taxonomía y la búsqueda de la cura a la enfermedad que causa el coronavirus (COVID-19). Ecol En Bolív. abril de 2020;55(1):1-5.
6. Salazar Carranza L, Zambrano Bacusoy M, Gallegos Zurita M, Castro Posligua AA, Mazacon Mora M. Plantas medicinales, su uso en afecciones respiratorias en comunidades rurales, provincia Los Ríos –Ecuador. J Sci Res Rev Cienc E Investig. 2021;6(2):5.
7. Carrión XP, Calva KY, Serrano BE, Sánchez MA. Uso tradicional de plantas medicinales en gestantes y puérperas en comunidades nativas y mestizas del Cantón Yantzaza : Traditional use of medicinal plants in pregnant and postpartum women in native and mestizo

communities of the Yantzaza Canton. *LATAM Rev Latinoam Cienc Soc Humanidades*. 5 de agosto de 2023;4(2):4745-54.

8. Idris M, Usman SJ. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Commiphora africana*. *Bayero J Pure Appl Sci*. 7 de febrero de 2019;11:191.
9. Jaluchimike IE, Nkechinyere MOK, Jacinta AC. Antibacterial Activity of Ethanolic Leaves Extract of the Plant *Andographis Paniculata* on Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Glob Acad J Med Sci*. 9 de abril de 2023;5(02):108-13.
10. Zannat KE, Tanzim SM, Afrin A, Saha BC, Joynal JB, Khanam TA, et al. Antibacterial Effects of Methanolic Leaf Extracts of Henna (*Lawsonia inermis*) Against Two Most Common Pathogenic Organisms: Gram Positive *Staphylococcus aureus* and Gram-Negative *Escherichia coli*. *Mymensingh Med J MMJ*. abril de 2023;32(2):296-302.
11. Yusof MN, Buyong F, Azmi WNAW. Antimicrobial Activity of *Cosmos caudatus* Against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *J Adv Res Appl Sci Eng Technol*. 2 de mayo de 2023;30(2):272-81.
12. Salud OP de la. Situación de las plantas medicinales en Perú. Informe de reunión del grupo de expertos en plantas medicinales. (Lima, 19 de marzo del 2018). 2019 [citado 16 de febrero de 2024]; Disponible en: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/50479>
13. Coronado-Peña JJ, Suárez Román RS. Uso tradicional de plantas medicinales en adultos mayores del municipio de Arauca | *REVISTA DE LA ASOCIACION COLOMBIANA DE CIENCIAS BIOLOGICAS*. 13 de diciembre de 2022;1(34):18-28.
14. Choqueapaza-Calisaya MB. Factores sociodemográficos y uso de plantas medicinales frente a la COVID- 19 en padres de una institución educativa inicial. *Investig E Innov Rev Científica Enferm*. 25 de agosto de 2021;1(1):113-23.

15. Tello-Ceron G, Flores Pimentel M, Gómez Galarza V. Uso de las plantas medicinales del distrito de Quero, Jauja, Región Junín, Perú. *Ecol Apl.* enero de 2019;18(1):11-20.
16. Carbajal Huamán O. Efecto sobre la motilidad intestinal del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* R. & P. «pisca pisca». Ayacucho - 2015 [Internet]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2015 [citado 16 de febrero de 2024]. Disponible en: <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/4192>
17. Dueñas-Rodríguez Y, Rodríguez-Puga R, Pérez-Díaz Y, Pérez-Ramírez AA. Uso y efectividad de la fitoterapia en el tratamiento de pacientes con infecciones respiratorias. *Rev Electrónica Dr Zoilo E Mar Vidaurreta.* 10 de julio de 2023;48(0):3377.
18. Castañeda Sifuentes RY. Estudio Etnobotánico de las plantas silvestres del distrito andino de Lircay, Angaraes, Huancavelica, Perú. *Univ Nac Mayor San Marcos* [Internet]. 2019 [citado 16 de febrero de 2024]; Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/11365>
19. Carbajal Huamán O. Efecto sobre la motilidad intestinal del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* R. & P. «pisca pisca». Ayacucho - 2015 [Internet]. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2015 [citado 16 de febrero de 2024]. Disponible en: <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/4192>
20. Lock Sing de Ugaz O, Ciencias PUC del PD de. Investigación fitoquímica : métodos en el estudio de productos naturales [Internet]. Pontificia Universidad Católica del Perú. Departamento de Ciencias; 1994 [citado 16 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://repositorio.pucp.edu.pe/index/handle/123456789/181719>
21. Chafla-Moina AL, Silva-Déley LM. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa* y *Eryngium foetidum*. *Polibotánica.* 2023;(55):109-19.

22. Cantoni CNB. Actividad antimicrobiana in vitro de los extractos hidroalcohólicos y aceite esencial de *Campomanesia xanthocarpa* (guavirá). *Rev Impacto*. 14 de septiembre de 2021;1(1):35-46.
23. Chiavari-Frederico MO, Barbosa LN, Carvalho Dos Santos I, Ratti da Silva G, Fernandes de Castro A, de Campos Bortolucci W, et al. Antimicrobial activity of Asteraceae species against bacterial pathogens isolated from postmenopausal women. *PloS One*. 2020;15(1):e0227023.
24. Mohamed EAA, Muddathir AM, Osman MA. Antimicrobial activity, phytochemical screening of crude extracts, and essential oils constituents of two *Pulicaria* spp. growing in Sudan. *Sci Rep*. 13 de octubre de 2020;10:17148.
25. Ahmed A, Usama A. Antioxidant and antibacterial properties of anise (*Pimpinella anisum* L.). *Egypt Pharm J*. 2019;(1):68-73.
26. Juaréz R, Hanco M, Perca R. Fraccionamiento bioguiado antimicrobiano de metabolitos secundarios de *Jungia axillaris* (Lag. ex DC.) Spreng. Asterácea de las zonas altoandinas de Arequipa. *South Fla J Dev*. 2023;4(9):3594-611.
27. Huamani N. Actividad antimicrobiana frente microorganismos gram positivos y negativos del extracto etanólico de *Senecio nutans* “chachacoma” [Internet] [tesis de Licenciatura]. [Ica]: Universidad Nacional San Luis Gonzaga; 2022. Disponible en: <https://repositorio.unica.edu.pe/server/api/core/bitstreams/668a90ab-f9c8-4b7a-9673-0249b49984ae/content>
28. Coarita N, Mayta Y. EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Senecio candollei* Wedd. (Janqo janqo) SOBRE *Staphylococcus aureus* [Internet] [tesis de Licenciatura]. [Lima]: Universidad Inca Garcilazo de

la Vega; 2022. Disponible en: <http://168.121.45.179/bitstream/handle/20.500.11818/6499/4.-Tesis%20Coarita%20Mayta%208-8-2022.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

29. De la Cruz M. Efecto bactericida del extracto oleoso de *Artemisia absinthium* contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 confrontado con oxacilina, in vitro [Internet] [tesis de Licenciatura]. [Trujillo]: Universidad César Vallejo; 2020. Disponible en: https://repositorio.ucv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.12692/60260/De%20la%20Cruz_OMP-SD.pdf?sequence=1&isAllowed=y

30. Anco L, Gálvez F. “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA in vitro DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*” [Internet] [tesis de Licenciatura]. [Lima]: Universidad Inca Garcilazo de la Vega; 2019. Disponible en: <http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/6499/4.-Tesis%20Coarita%20Mayta%208-8-2022.pdf?sequence=2&isAllowed=y>

31. Byng JW. *The Flowering Plants Handbook: A practical guide to families and genera of the world*. Plant Gateway Ltd.; 2014. 627 p.

32. Herbario Azuay - Universidad del Azuay [Internet]. [citado 26 de febrero de 2024]. Herbario Azuay - Universidad del Azuay. Disponible en: <https://herbario.uazuay.edu.ec/muestras/1277>

33. Sernanp PSN de ÁNP por el E, Pdrs PDRS, Spda SP de DA. Compendio de legislación sobre áreas naturales protegidas. abril de 2012 [citado 25 de febrero de 2024]; Disponible en: <http://repositoriodigital.minam.gob.pe/xmlui/handle/123456789/164>

34. Carpio Luque J. *Flora arbórea y arbustiva del bosque de Ustuna, centro poblado Santa Isabel de Chumbes, distrito Ocos, provincia Huamanga. Ayacucho, 2016*. [Internet].

Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga; 2017 [citado 25 de febrero de 2024].

Disponible en: <http://repositorio.unsch.edu.pe/handle/UNSCH/1672>

35. Hurtado-Huarcaya J, Albán J. Conocimiento tradicional de la flora silvestre en las comunidades campesinas del Santuario Histórico de la Pampa de Ayacucho (Quinua, Ayacucho, Perú). *Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromáticas*. 30 de mayo de 2018;17(3):286-301.

36. Vásquez Villanueva LA. Etnobotánica del centro poblado El Romero, distrito de Bambamarca, Hualgayoc [Internet]. Universidad Nacional de Cajamarca; 2021 [citado 25 de febrero de 2024]. Disponible en: <http://repositorio.unc.edu.pe/handle/20.500.14074/4369>

37. Quispe Condori N. Evaluación temporal de los servicios ambientales en la cuenca del río Pumahuanca, Urubamba - Cusco [Internet]. Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco; 2017 [citado 25 de febrero de 2024]. Disponible en:

<https://repositorio.unsaac.edu.pe/handle/20.500.12918/2689>

38. Delgado Sumar HE. Inventario de recursos curativos en centros de expendio formales e informales: Junín. Instituto Nacional de Medicina Tradicional. 1999;

39. Angiosperm Phylogeny Website. COLUMELLIACEAE [Internet]. Disponible en: <https://www.mobot.org/mobot/research/apweb/orders/desfontainialesweb.htm#Desfontainiales>

40. Angiosperm Phylogeny Website. ASTERID II / CAMPANULIDAE. 8 orders, 25 families, genera, species. [Internet]. Disponible en:

<https://www.mobot.org/mobot/research/apweb/orders/metteniusalesweb.html#AstIIPhy>

41. Mostacero León J. Características edafoclimáticas y fitogeográficas de las plantas medicinales del dominio andino noroccidental del Perú, durante 1976 al 2004. 2005;[298]-[298].

42. Zapata CMP, Ravelo JMC, León JM. Valoración económica ambiental de las plantas medicinales de la zona de influencia de tres lagunas en Huancabamba – Piura. *INDES Rev Investig Para El Desarro Sustentable*. 2015;3(2):16-28.

43. Rivas-Morales C, Oranday-Cárdenas MA, Verde-Star MJ. Investigación en plantas de importancia médica. México: OmniaScience; 2016. 452 p.
44. García EC, Solís IM. Manual de fitoterapia. 3° ed. España: Elsevier Health Sciences; 2021. 598 p.
45. Limaymanta Gonzales J. Evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de un gel preparado con extracto etanólico de *Marrubium vulgare* L. [Internet]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2018 [citado 25 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/9727>
46. Taiz L, Zeiger E. Fisiología vegetal. Vol. I. Universitat Jaume I; 2007. 646 p.
47. Mateos RG, Leal RP. Fitoalexinas: mecanismo de defensa de las plantas. Rev Chapingo Ser Cienc For Ambiente. 2003;9(1):5-10.
48. Moncayo Rivera CM. Caracterización Fitoquímica y actividad Antimicrobiana del Aceite Esencial de Diente de León (*Taraxacum Officinale*) frente a Microorganismos Patógenos [Internet] [masterThesis]. Repositorio de la Universidad Estatal de Milagro. 2022 [citado 25 de febrero de 2024]. Disponible en: <http://repositorio.unemi.edu.ec/xmlui/handle/123456789/5998>
49. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* : una revisión. J Pharm Anal. 1 de abril de 2016;6(2):71-9.
50. Flores Sernaqué RDP. Inhibición in vitro del extracto etanólico del epicarpio de *Morinda citrifolia* sobre *Escherichia coli* O157:H7 [Internet]. Universidad Nacional de Frontera; 2022 [citado 25 de febrero de 2024]. Disponible en: <http://repositorio.unf.edu.pe/handle/UNF/194>
51. Negroni M. Microbiología Estomatológica; fundamentos y guía de trabajo. 2da ed. Argentina: Ed. Médica Panamericana; 2009. p. 570-572.

52. Bittner A, Hause B, Baier M. Cold-priming causes dampening of oxylipin biosynthesis and signalling during the early cold- and light-triggering response of *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*. 26 de octubre de 2021;72(20):7163-79.
53. Bhatia P, Sharma A, George AJ, Anvitha D, Kumar P, Dwivedi VP, et al. Antibacterial activity of medicinal plants against ESKAPE: An update. *Heliyon*. febrero de 2021;7(2):e06310.
54. Schmidt S, Heimesaat MM, Fischer A, Bereswill S, Melzig MF. Saponins increase susceptibility of vancomycin-resistant enterococci to antibiotic compounds. *Eur J Microbiol Immunol*. diciembre de 2014;4(4):204-12.
55. Turker AU, Usta C. Biological screening of some Turkish medicinal plant extracts for antimicrobial and toxicity activities. *Nat Prod Res*. 20 de enero de 2008;22(2):136-46.
56. Huayambaho Tuesta JD, Ponce Panez N iris. Tamizaje fitoquímico y actividad antibacteriana in vitro de planta entera de *Phyllanthus fluitans* Benth. Ex Müll. Arg. frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* [Internet]. Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; 2020 [citado 25 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://repositorio.unapiquitos.edu.pe/handle/20.500.12737/6793>
57. Hernández-Sampieri R, Mendoza Torres CP. Metodología de la investigación: las rutas: cuantitativa, cualitativa y mixta. 1^o ed. México: Mcgraw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C. V.; 2018.
58. Argimon Pallás JM a, Jiménez Villa J. Métodos de investigación clínica y epidemiológica. 3.^a edición. España: Elsevier España, S.L.; 2004. 382 p.
59. García Castellanos B, Garcia Castellanos B, 887602. Caracterización y modificación de ionómero de vidrio con nanoestructuras para mejorar las propiedades

antibacterianas. abril de 2020 [citado 25 de febrero de 2024]; Disponible en:

<https://hdl.handle.net/20.500.12371/9798>

60. Alvo V A, Téllez G V, Sedano M C, Fica C A. Conceptos básicos para el uso racional de antibióticos en otorrinolaringología. Rev Otorrinolaringol Cir Cabeza Cuello. abril de 2016;76(1):136-47.

61. Morais HLM do N, Feitosa TC, Rodrigues JGM, Lira MGS, Nogueira RA, Luz TRSA, et al. Hydroalcoholic extract of *Caryocar brasiliense* Cambess. leaves affect the development of *Aedes aegypti* mosquitoes. Rev Soc Bras Med Trop. 11 de septiembre de 2020;53:e20200176.

62. Arispe Alburquerque CM, Yangali Vicente JS, Guerrero Bejarano MA, Lozada de Bonilla OR, Acuña Gamboa LA, Arellano Sacramento C. La investigación científica [Internet]. GUAYAQUIL/UIDE/2020; 2020 [citado 25 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://repositorio.uide.edu.ec/handle/37000/4310>

63. Cruz-Carrillo A, Rodríguez N. N, Rodríguez CE. EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO DE LOS EXTRACTOS DE *Bidens pilosa*, *Lantana camara*, *Schinus molle* Y *Silybum marianum*. Rev UDCA Actual Amp Divulg Científica. diciembre de 2010;13(2):117-24.

Anexos

Anexo 1: Matriz de consistencia

TÍTULO: Efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” FRENTE A

CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. LIMA, 2023.

Formulación del Problema	Objetivos	Hipótesis	Variables	Diseño metodológico
<p>Problema General</p> <p>“Cuál es efecto antimicrobiano in vitro del extracto Hidroalcohólico de las hojas de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “Pisca pisca” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 Lima, 2023”</p> <p>Problema Específicos</p> <p>1. ¿Cuál son los metabolitos secundarios, con posible efecto antimicrobiano, del EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca”?</p> <p>2. ¿Cuál es efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> del EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923?</p> <p>3. ¿Cuál es efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> del EHH de <i>Columellia</i></p>	<p>Objetivo General</p> <p>-Determinar el efecto antibacteriano in vitro el extracto Hidroalcohólico de las hojas, <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav “pisca pisca” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. Lima, 2023</p> <p>Objetivos Específicos</p> <p>1. Identificar los metabolitos secundarios, con posible efecto antimicrobiano, del EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca”.</p> <p>2. Determinar el efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> del EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p>	<p>Hipótesis General</p> <p>Ho: El EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca” no presenta efecto antimicrobiano in vitro frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.</p> <p>El EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca” presenta efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.</p> <p>Hipótesis específicas</p>	<p>Variable</p> <p>-Extracto Hidroalcohólico de las hojas, <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “Pisca pisca”</p> <p>Dimensiones</p> <p>D1: Concentraciones del extracto Hidroalcohólico de las hojas, <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “Pisca pisca”</p> <p>D2: Metabolitos secundarios.</p> <p>Variable 2</p> <p>Efecto antimicrobiano <i>in vitro</i></p> <p>Dimensiones</p> <p>D1: Grado de sensibilidad antimicrobiana</p> <p>D2: Concentración mínima inhibitoria (CMI) en mg/mL</p> <p>D3: Concentración mínima bactericida (CMB) en mg/mL</p>	<p>Tipo de investigación</p> <p>Aplicada</p> <p>Método y diseño de la investigación</p> <p>Método</p> <p>Hipotético-Deductivo</p> <p>Cuantitativo</p> <p>Diseño</p> <p>Experimental</p> <p>Corte</p> <p>✓ Transversal</p> <p>Nivel</p> <p>✓ Explicativo</p> <p>✓ Comparativo</p> <p>Población, muestra y muestreo</p> <p>Población</p> <p>La población de estudio se encuentra constituida por 2 kg de las hojas de la especie <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “Pisca pisca” y 24 placas de agar Mueller H1nton con cepas de</p>

<p><i>obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922?</p> <p>4. ¿Cuál será la concentración del EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca” que presente mayor efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922?</p> <p>5. ¿Cuál será la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración mínima bactericida (CMB) del EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922?</p>	<p>3. Determinar el efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> del EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p> <p>4. Determinar la concentración del EHH <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca” que presenta mayor efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.</p> <p>5. Determinar la CMI y CMB del EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.</p>	<p>1. Ho: No existen algunos metabolitos secundarios con posible efecto antimicrobiano, del EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca”</p> <p>H₁: Existen algunos metabolitos secundarios, con posible efecto antimicrobiano, del EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca”</p> <p>2. Ho: El EHH <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca” no presenta efecto antimicrobiano frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.</p> <p>H₁: El EHH <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca” presenta efecto antimicrobiano frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.</p> <p>3. Ho: El EHH <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca” no presenta efecto</p>		<p><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.</p> <p>La muestra fue igual a la población.</p>
--	---	--	--	--

		<p>antimicrobiano frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.</p> <p>H₁: El EHH <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca” presenta efecto antimicrobiano frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.</p> <p>4. Ho: No presenta una concentración específica del EHH <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca” con mayor efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p> <p>H_i: Presenta una concentración específica del EHH <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca” con mayor efecto antimicrobiano <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922</p> <p>5. Ho: No presenta la CMI y CMB el EHH de <i>Columellia</i></p>		
--	--	---	--	--

		<p><i>obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.</p> <p>H₁: Presenta la CMI y CMB el EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.</p>		
--	--	---	--	--

Anexo 2: Instrumentos

Instrumento de recolección de datos

FICHA DE OBSERVACIÓN DE ENSAYO FITOQUÍMICO

PARA LA EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Columellia obovata* Ruiz & Pav.
“pisca pisca” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. LIMA, 2023”

ENSAYO FITOQUÍMICO			
MARCHA FITOQUÍMICA			
REACTIVOS	METABOLITOS SECUNDARIOS	ESPECIFICACIÓN	RESULTADO
Molish	CarboH1dratos		
FelH1ng A y B	Azúcares reductores		
Benedict	Azúcares reductores		
Tollens	Azúcares reductores		
NinH1drina	Grupos Aminos libres		
FeCl3	Compuestos fenólicos		
SH1noda	Flavonoides		
Gelatina/NaOH 1%	Taninos		
Borotrager	Antraquinonas		
Drangendorff	Alcaloides		
Mayer	Alcaloides		
Agua destilada	Saponinas		

Leyenda: (-) Ausente (+) Presencia

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

EFFECTO ANTIMICROBIANO FRENTE A *Staphylococcus aureus* y *Echeriachia coli* POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR EN POZO

		Concentración (%) del extracto Hidroalcohólico de las hojas de <i>Columellia Obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca”				Suero fisiológico al 0.9%	Gentamicina 160 mg
Halo de Inhibición en (mm) <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	N° de placa	25 %	50%	75%	100%	Control negativo	Control Positivo
	Placa N°1						
	Placa N°2						
	Placa N°3						
	Placa N°4						
	Placa N°5						
	Placa N°6						
	Placa N°7						
	Placa N°8						
	Placa N°9						
	Placa N°10						

EFFECTO ANTIMICROBIANO FRENTE A *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR EN POZO

		Concentración (%) del extracto Hidroalcohólico de las hojas de <i>Columellia Obovata</i> Ruiz & Pav. “pisca pisca”				Suero Fisiológico al 0.9%	Gentamicina 160 mg
Halo de Inhibición en (mm) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	N° de placa	25 %	50%	75%	100%	Control negativo	Control Positivo
	Placa N°1						
	Placa N°2						
	Placa N°3						
	Placa N°4						
	Placa N°5						
	Placa N°6						
	Placa N°7						
	Placa N°8						
	Placa N°9						
	Placa N°10						

Leyenda: Escala de Duraffourd

Nula (-): diámetro inferior a 8 mm.

Sensibilidad límite (sensible +): diámetro comprendido entre 8 a 14 mm.

Medio (muy sensible ++): diámetro entre 14 y 20 mm.

Sumamente sensible (+++): diámetro superior a 20 mm.

Instrumento de recolección de datos

FICHA DE OBSERVACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA
INHIBITORIA (CMI) Y CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD BACTERIOSTÁTICA Y BACTERICIDA POR EL MÉTODO DE MACRODILUCIÓN EN TUBO Y PLACA		
CONCENTRACIÓN (%) DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. "pisca pisca"	mg/dL	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
Concentración mínima bactericida (CMI)		
PLACA 1		
PLACA 2		
PLACA 3		
Concentración Mínima Inhibitoria (CMB)		
TUBO 1		
TUBO 2		
TUBO 3		

Anexo 3: Validez del instrumento

CERTIFICADO DE VALIDEZ DE CONTENIDO DE LOS INSTRUMENTOS

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN: “Efecto antimicrobiano in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de

Columellia obovata Ruiz & Pav “pisca pisca” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Lima, 2023”

Nº	DIMENSIONES / ítems	Pertinencia ¹		Relevancia ²		Claridad ³		Sugerencias
	VARIABLE 1: Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav “pisca pisca”							
	DIMENSIÓN 1: Concentraciones de extracto hidroalcohólico	Si	No	Si	No	Si	No	
1	- Concentración al 25%	X		X		X		
2	- Concentración al 50%	X		X		X		
3	- Concentración al 75%	X		X		X		
4	- Concentración al 100%	X		X		X		
	DIMENSIÓN 2: Metabolitos secundarios	Si	No	Si	No	Si	No	
5	- Alcaloides	X		X		X		
6	- Flavonoides	X		X		X		
7	- Saponinas	X		X		X		
8	- Fenoles y Taninos	X		X		X		
9	- Catequinas	X		X		X		
10	- Cumarinas	X		X		X		
11	- Quinonas	X		X		X		
12	- Glicósidos cardiotónicos	X		X		X		
13	- Iridoides	X		X		X		
14	- Triterpenos y Esteroides	X		X		X		
	VARIABLE 2: Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav “pisca pisca”							
	DIMENSIÓN 1: Grado de sensibilidad antimicrobiana	Si	No	Si	No	Si	No	
15	- Diámetro del halo de inhibición (mm).	X		X		X		
	DIMENSIÓN 2: Concentración mínima inhibitoria (CMI) en mg/dL	Si	No	Si	No	Si	No	
16	- Grado de turbidez	X		X		X		
	DIMENSIÓN 3: Concentración mínima bactericida (CMB) en mg/dL	Si	No	Si	No	Si	No	
17	- Unidades Formadoras de colonias (UFC)	X		X		X		
	DIMENSIÓN 4: Controles (Gentamicina 160 mg y Suero fisiológico al 0.9%)	Si	No	Si	No	Si	No	
18	- Diámetro del halo de inhibición (mm).	X		X		X		

Observaciones (precisar si hay suficiencia): Si existe suficiencia para la recolección de datos

Opinión de aplicabilidad: Aplicable [x] Aplicable después de corregir [_]

No aplicable []

Apellidos y nombres del juez validador. Mg: **Carmela Gelida Barboza Justiniano**

DNI: **44582921**

Especialidad del validador: **Químico Farmacéutico, Magister**

¹**Pertinencia:** El ítem corresponde al concepto teórico formulado.

²**Relevancia:** El ítem es apropiado para representar al componente o dimensión específica del constructo

³**Claridad:** Se entiende sin dificultad alguna el enunciado del ítem, es conciso, exacto y directo

Nota: Suficiencia, se dice suficiencia cuando los ítems planteados son suficientes para medir la dimensión

de octubre del 2023



Firma del Experto Informante

CERTIFICADO DE VALIDEZ DE CONTENIDO DE LOS INSTRUMENTOS

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN: "Efecto antimicrobiano in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de

Columellia obovata Ruiz & Pav "pisca pisca" frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Lima, 2023"

Nº	DIMENSIONES / ítems	Pertinencia ¹		Relevancia ²		Claridad ³		Sugerencias
		Si	No	Si	No	Si	No	
	VARIABLE 1: Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav "pisca pisca"							
	DIMENSIÓN 1: Concentraciones de extracto hidroalcohólico	Si	No	Si	No	Si	No	
1	- Concentración al 25%	X		X		X		
2	- Concentración al 50%	X		X		X		
3	- Concentración al 75%	X		X		X		
4	- Concentración al 100%	X		X		X		
	DIMENSIÓN 2: Metabolitos secundarios	Si	No	Si	No	Si	No	
5	- Alcaloides	X		X		X		
6	- Flavonoides	X		X		X		
7	- Saponinas	X		X		X		
8	- Fenoles y Taninos	X		X		X		
9	- Catequinas	X		X		X		
10	- Cumarinas	X		X		X		
11	- Quinonas	X		X		X		
12	- Glicósidos cardiotónicos	X		X		X		
13	- Iridoides	X		X		X		
14	- Triterpenos y Esteroides	X		X		X		
	VARIABLE 2: Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav "pisca pisca"							
	DIMENSIÓN 1: Grado de sensibilidad antimicrobiana	Si	No	Si	No	Si	No	
15	- Diámetro del halo de inhibición (mm).	X		X		X		
	DIMENSIÓN 2: Concentración mínima inhibitoria (CMI) en mg/dL	Si	No	Si	No	Si	No	
16	- Grado de turbidez	X		X		X		
	DIMENSIÓN 3: Concentración mínima bactericida (CMB) en mg/dL	Si	No	Si	No	Si	No	
17	- Unidades Formadoras de colonias (UFC)	X		X		X		
	DIMENSIÓN 4: Controles (Gentamicina 160 mg y Suero fisiológico al 0,9%)	Si	No	Si	No	Si	No	
18	- Diámetro del halo de inhibición (mm).	X		X		X		

Observaciones (precisar si hay suficiencia): Si existe suficiencia para la recolección de datos

Opinión de aplicabilidad: Aplicable [x] Aplicable después de corregir [_] No aplicable []

Apellidos y nombres del juez validador. Dr: TASAYCO YATACO NESQUEN JOSÉ

DNI: 21873096

Especialidad del validador: **DOCTOR EN SALUD**

¹Pertinencia: El ítem corresponde al concepto teórico formulado.

²Relevancia: El ítem es apropiado para representar al componente o dimensión específica del constructo

³Claridad: Se entiende sin dificultad alguna el enunciado del ítem, es conciso, exacto y directo

Nota: Suficiencia, se dice suficiencia cuando los ítems planteados son suficientes para medir la dimensión

13 de octubre del 2023



 Firma del Experto Informante

CERTIFICADO DE VALIDEZ DE CONTENIDO DE LOS INSTRUMENTOS

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN: “Efecto antimicrobiano in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de

***Columellia obovata* Ruiz & Pav “pisca pisca” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Lima, 2023”**

Nº	DIMENSIONES / ítems	Pertinencia ¹		Relevancia ²		Claridad ³		Sugerencias
		Si	No	Si	No	Si	No	
	VARIABLE 1: Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav “pisca pisca”							
	DIMENSIÓN 1: Concentraciones de extracto hidroalcohólico	Si	No	Si	No	Si	No	
1	- Concentración al 25%	X		X		X		
2	- Concentración al 50%	X		X		X		
3	- Concentración al 75%	X		X		X		
4	- Concentración al 100%	X		X		X		
	DIMENSIÓN 2: Metabolitos secundarios	Si	No	Si	No	Si	No	
5	- Alcaloides	X		X		X		
6	- Flavonoides	X		X		X		
7	- Saponinas	X		X		X		
8	- Fenoles y Taninos	X		X		X		
9	- Catequinas	X		X		X		
10	- Cumarinas	X		X		X		
11	- Quinonas	X		X		X		
12	- Glicósidos cardiotónicos	X		X		X		
13	- Iridoides	X		X		X		
14	- Triterpenos y Esteroides	X		X		X		
	VARIABLE 2: Efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav “pisca pisca”							
	DIMENSIÓN 1: Grado de sensibilidad antimicrobiana	Si	No	Si	No	Si	No	
15	- Diámetro del halo de inhibición (mm).	X		X		X		
	DIMENSIÓN 2: Concentración mínima inhibitoria (CMD) en mg/dL	Si	No	Si	No	Si	No	
16	- Grado de turbidez	X		X		X		
	DIMENSIÓN 3: Concentración mínima bactericida (CMB) en mg/dL	Si	No	Si	No	Si	No	
17	- Unidades Formadoras de colonias (UFC)	X		X		X		
	DIMENSIÓN 4: Controles (Gentamicina 160 mg y Suero fisiológico al 0.9%)	Si	No	Si	No	Si	No	
18	- Diámetro del halo de inhibición (mm).	X		X		X		

Observaciones (precisar si hay suficiencia): Si existe suficiencia para la recolección de datos

Opinión de aplicabilidad: Aplicable [x] Aplicable después de corregir [] No aplicable []

Apellidos y nombres del juez validador. Dr: **Marquez Caro Orlando Juan**

DNI: **09075930**

Especialidad del validador: **Metodólogo.**

¹**Pertinencia:** El ítem corresponde al concepto teórico formulado.

²**Relevancia:** El ítem es apropiado para representar al componente o dimensión específica del constructo

³**Claridad:** Se entiende sin dificultad alguna el enunciado del ítem, es conciso, exacto y directo

Nota: Suficiencia, se dice suficiencia cuando los ítems planteados son suficientes para medir la dimensión

15 de octubre del 2023



Firma del Experto Informante

Anexo 4: Aprobación del comité de Ética



**Universidad
Norbert Wiener**

RESOLUCIÓN N° 172-2024-DFFB/UPNW

Lima, 10 de enero de 2024

VISTO:

El Acta N° 181 donde la Unidad Revisora de Asuntos Éticos de la FFYB aprueba la no necesidad de ser evaluado el proyecto por el Comité de Ética de la Universidad que presenta el/la tesista: CERDAN DÍAZ, PERCY y MORETO ARRAIZA, BRIAN DENZEL, egresado (a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

CONSIDERANDO:

Que es necesario proseguir con la ejecución del proyecto de tesis, presentado a la facultad de farmacia y bioquímica.

En uso de sus atribuciones, el decano de la facultad de farmacia y bioquímica;

RESUELVE:

ARTÍCULO ÚNICO: Aprobar el proyecto de tesis titulado: “EFECTO ANTIMICROBIANO IN VITRO DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Y *Escherichia coli* ATCC 25922. LIMA, 2023” presentado por el/la tesista: CERDAN DÍAZ, PERCY y MORETO ARRAIZA, BRIAN DENZEL, autorizándose su ejecución.

Regístrese, comuníquese y archívese.

Dr. Manuel Jesús Mayorga Espichan

Decano de la Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad Privada Norbert Wiener

Anexo 5: Programa de intervención (para estudios experimentales)

PROTOCOLO DE INVESTIGACION:

TÍTULO: Efecto antimicrobiano in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “pisca pisca” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Lima, 2023.

AUTORES:

- ✓ CERDAN DÍAZ, PERCY
- ✓ MORETO ARRAIZA, BRIAN DENZEL

ASESOR: Mg. ÑAÑEZ DEL PINO, DANIEL

1. INTRODUCCIÓN

En los sistemas sanitarios de las naciones subdesarrolladas, las plantas son un recurso vital. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) ¹, más del 80% de la población mundial recurre regularmente a la medicina tradicional para atender sus necesidades médicas fundamentales. Una parte significativa de estas terapias incluye el uso de extractos de plantas o de sus sustancias activas².

A lo largo de los siglos, las sociedades humanas han transmitido a las generaciones sucesivas conocimientos sobre los beneficios terapéuticos de muchas plantas. Los conocimientos sobre la utilización de las plantas como tratamientos naturales y la variedad de especies vegetales son componentes importantes de la medicina tradicional ³. En un esfuerzo por descubrir posibles nuevos medicamentos antimicrobianos, los científicos han estado evaluando extractos de plantas medicinales elaborados a partir de semillas, cortezas, flores y hojas. La creciente preocupación por la resistencia de las bacterias a los antibióticos convencionales ha despertado el interés en este

campo y ha llamado la atención sobre la necesidad crítica de nuevas opciones terapéuticas eficaces⁴.

Por tal razón, el objetivo del presente estudio es determinar el efecto antimicrobiano in vitro del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922

2. MATERIALES

Equipos

- Incubadora microbiológica (Marca: IBC)
- Autoclave (Marca: Kyntel - Modelo: K/YX-280A+).
- Vórtex (Kyntel)
- Contador de colonias (Hinotek - Modelo: J-3)
- Balanza electrónica analítica serie FA: (Huazheng -Modelo: JA503)
- Estufa esterilizadora (ZenithLab - Modelo: DNP-9072A)
- Baño termostático (Marca: Kyntel)
- Refrigeradora (Marca: Pol Eko - Modelo: CHL 5 C SMART)

Materiales

- Frasco ámbar macerado con de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav
- Viales de vidrio ámbar de 20mL
- Pinza de acero inoxidable
- Embudo de vidrio de 8mm de diámetro.
- Papel de filtración Whatman N° 1, N°2 y N° 41
- Extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav al 100%.
- Extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav al 75%
- Extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav al 50%
- Extracto hidroalcohólico de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav al 25%
- Gentamicina (160mg/2mL)
- Suero fisiológico al 0.9%
- Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- Cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922
- Estándar de sulfato de Bario al 0.5 de McFarland. Marca “LIOFILCHEM”
- Caldo cerebro corazón (BHI)
- Agar Mueller Hinton (Marca: Himedia)
- Placas Petri

- Hisopo estéril
- Regla Vernier digital (Marca: MAGTOTO)
- Micropipeta D-LAB de 10µL a 100 µL
- Puntas de Micropipetas
- Sacabocado estéril
- Estilete de acero inoxidable estéril
- Mechero de bunsen
- Tubos de ensayo Pyrex de 12 x 100 mm.

Reactivos

- Felhing A y B
- Molish
- Benedict
- Tollens
- Ninhidrina
- Shinoda
- Cloruro Férrico
- Gelatina/NaOH 1%
- Borntrager
- Dragendorff
- Mayer
- Agua destilada
- Alcohol de 70%
-

3. Métodos

3.1 Ensayo histológico:

a). Recolección de la planta

Las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. se recolectaron en el centro poblado de Masingana, distrito de Santillana, provincia de Huanta Ayacucho, a una altitud de 3295 msnm. El vegetal fue identificado en el herbario del Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con el ejemplar número 174.

3.2 Ensayo fitoquímicos

a). Preparación del extracto hidroalcohólico

El extracto se preparó según Morais *et al.*⁵ (2020) con algunas modificaciones. Brevemente, para la preparación de los extractos hidroalcohólicos, las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. Se secaron y luego fue pulverizado y se realizó la extracción mediante el método de maceración con etanol al 70%, pasando por el rotavapor, dando como resultado el extracto crudo de *Columellia obovata* Ruiz & Pav.

b) Preparación de las concentraciones del extracto hidroalcohólico de hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav

A partir del extracto seco de *Columellia obovata* Ruiz & Pav se realizarán diluciones en una mezcla hidroalcohólica de etanol al 70% obteniéndose concentraciones 100% (1000mg/ml), 75% (750mg/ml), 50% (500mg/ml) y 25% (250mg/mL). Cada concentración será colocada en un vial estéril de color ámbar y tapado herméticamente y se mantendrá en refrigeración (5°C) hasta el momento de su utilización.

Tamizaje Fitoquímico:

Para el desarrollo del estudio fitoquímico preliminar se seguirá el procedimiento de Olga Lock, el cual se realizará para identificar los metabolitos presentes en el extracto hidroalcohólico de *Columellia obovata* Ruiz & Pav, de forma cualitativa, los cuales se evidenciarán de acuerdo con las reacciones químicas tanto por coloración o precipitación.

3.3 Actividad antibacteriana:

3.3.1 Método de ensayo y sustancias de prueba

El método que se aplicará para el análisis de la actividad antibacteriana será difusión en agar en pozos, los cuales se inocularán con las concentraciones de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav a 25%, 50%, 75%, 100%, Gentamicina (160mg) y suero fisiológico al 0,9%.

3.3.2 Cepas bacterianas para el estudio:

Se trabajará con las cepas estándares ATCC (American Type Culture Collection): *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.3.3. Preparación del agar Mueller Hinton

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se prepara un litro de agar Mueller Hinton, se pesa con una balanza digital y se combina con agua destilada. Después, se somete a una esterilización en autoclave de 15 minutos a 121°C y 15 PSI. A continuación, se temple a 45°C en un baño termostático. A continuación, se añade el agar Mueller Hinton a las placas Petri de forma estéril para su uso en la prueba. Para garantizar una formación adecuada, las placas deben dejarse reposar durante quince minutos antes de utilizarlas en el experimento del antibiograma. En la etiqueta de cada placa deben figurar los compuestos que se van a ensayar y debe aplicarse un número identificativo. Las placas de agar Mueller Hinton se incubaron durante 24 horas a 37°C para confirmar su esterilidad.

3.3.4 Reconstitución de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

Se realizará la activación de la cepa liofilizada de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 en caldo cerebro corazón (BHI). Las cepas serán incubadas por 24 horas a 37°C en aerobiosis. Después de este proceso, se estriará por agotamiento en placas con Agar Mueller Hinton para obtener colonias aisladas y realizará tinción Gram de las cepas.

3.3.5 Preparación del inóculo bacteriano al 0.5 de McFarland

Bajo condiciones estériles, se tomará, con asa de siembra, unas 2 a 5 colonias de aisladas de cada una de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, respectivamente en agar Mueller Hinton y se inocularán a tubos de caldo BHI (5mL) para cada cepa bacteriana. En ambos casos, se homogenizará el inóculo bacteriano en suspensión en caldo BHI, en tubo de ensayo, en

vórtex durante 10 segundos. Luego, se realizará la comparación de las suspensiones de *Staphylococcus aureus* y otro tubo de caldo BHI con *Escherichia coli* cuyo nivel de turbidez deberá estar conforme al estándar de sulfato de Bario al 0.5 McFarland (1,5 x 10⁸ufc/mL), para lo cual, se empleará una Tarjeta de comparación visual del estándar de turbidez de McFarland (Visual Comparison Card).

3.3.6 Realización de los pocillos para antibiograma

Se procederá a la realización de los pocillos para antibiograma por cada placa de agar Mueller Hinton dispuestos para el ensayo. Cada pocillo se realizará con un sacabocado estéril de 5,5mm de diámetro. El número de pocillos, por cada placa de agar en estudio, se elegirá según el tamaño en milímetros de las zonas de inhibición de cada sustancia de prueba observados en los ensayos previos.

3.3.7 Inoculación de las placas Petri con *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tras el ajuste de la solución de inóculo para cada cepa, se tomarán muestras de la suspensión de caldo BHI que contiene *Staphylococcus aureus* utilizando un hisopo estéril. A continuación, se inocularon las bacterias en los pocillos de antibiograma de las placas Petri que contienen el medio de agar Mueller Hinton. Para ello, se dispersarán las bacterias con el hisopo en dos direcciones y, a continuación, se realizará un esparcimiento circular periférico para cubrir toda la superficie de la placa. La cepa de *Escherichia coli* para la inoculación en agar Mueller Hinton se manipulará del mismo modo.

A continuación, se escribirán en cada placa los nombres del medio de cultivo, las concentraciones de los extractos hidroalcohólicos de hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav al 25%, 50%, 75% y 100%, así como el control positivo de gentamicina (160 mg) y el control negativo de suero fisiológico al 0,9%.

3.3.8 Inoculación de las sustancias de prueba

Se inoculará cada sustancia de prueba, se depositará con micropipeta, en cada pocillo antibiograma, 20uL de cada sustancia de prueba, incluido el control positivo y negativo según el rotulo de cada pocillo en la placa Petri con agar Mueller Hinton según la bacteria de prueba. Luego, se difundirá unos 10 minutos las sustancias de prueba en las placas con agar y se procederá a incubar las placas con *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* a 37°C por 24 horas en aerobiosis. No se voltearán las placas, con el objetivo de favorecer la difusión total en el medio de cultivo de las concentraciones de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav al 25%, 50%, 75%, 100%, Gentamicina (160mg) y suero fisiológico al 0,9%. Luego, de las 24 horas de incubación, se procederá con las mediciones de los halos de inhibición en milímetros, para lo cual se empleará una regla vernier digital calibrada.

El desarrollo de todo el procedimiento microbiológico se realizará dentro de un área de 15 centímetros de radio alrededor de la llama del mechero de Bunsen, lo cual generará condiciones de esterilidad en el presente ensayo.

3.3.9 de resultados

Se registrarán los resultados en la ficha de recolección de datos y, luego, se trasladarán al informe de ensayo.

3.4 Concentración mínima bactericida (CMB): Determinación de sensibilidad a los antimicrobianos por el método de macrodilución en caldo. Técnica cualitativa

3.4.1 Se utilizarán dos mililitros de caldo BHI para preparar tubos de ensayo que contengan concentraciones variables de extractos hidroalcohólicos de hojas de *Columellia obovata* Ruiz &

Pav, 12,5%, 25%, 50%, 50%, 75% y 100%. Habrá dos tipos de controles: positivo (caldo BHI más *Staphylococcus aureus*) y negativo (caldo BHI más *Columellia obovata* Ruiz & Pav). A continuación, se sembrarán 100 µL de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, $1,5 \times 10^8$ UFC/mL a una concentración de 0,5 en la escala de turbidez de McFarland, en cada tubo que contenga las distintas cantidades, así como el control positivo. Durante todo un día, el microorganismo objeto de la investigación se cultivará a 37°C en estas diluciones y controles. La *Escherichia coli* ATCC 25922 se someterá al mismo proceso.

3.4.2 Tras la incubación, se transferirán por triplicado 10 µL del cultivo de cada tubo -tanto de *Escherichia coli* como de *Staphylococcus aureus* a tubos etiquetados de caldo BHI de 2 mL. Por cada cepa, se sembrará un tubo como control positivo y otro como control negativo. Estos tubos se colocarán en un medio aeróbico y se incubarán durante 24 horas a 37°C.

3.4.3 El control positivo de cada cepa deberá mostrar signos de turbidez tras la incubación, mientras que el control negativo deberá ser transparente. La dilución en la que no se observe turbidez en el caldo BHI, o la dilución más alta sin turbidez, se considerará la concentración bactericida mínima. En cambio, se observará lo siguiente en las diluciones con extracto hidroalcohólico de *Columellia obovata* Ruiz & Pav y cada cepa en estudio.

3.5 Concentración mínima inhibitoria (CMI). Determinación de sensibilidad a los antimicrobianos por el método de dilución en agar. Técnica cuantitativa.

3.5.1 Se tomará los tubos con cultivo de 24 horas con concentraciones de los extractos hidroalcohólicos de las hojas de *Columellia obovata* Ruiz & Pav y cepa en estudio realizadas en el paso 3.4.1 y se sembrará en placas con agar BHI estériles la cantidad de 10uL de cultivo para las concentraciones de 100%, 75% 50%, 25% Y 12,5% , controles y se disemina este inóculo con

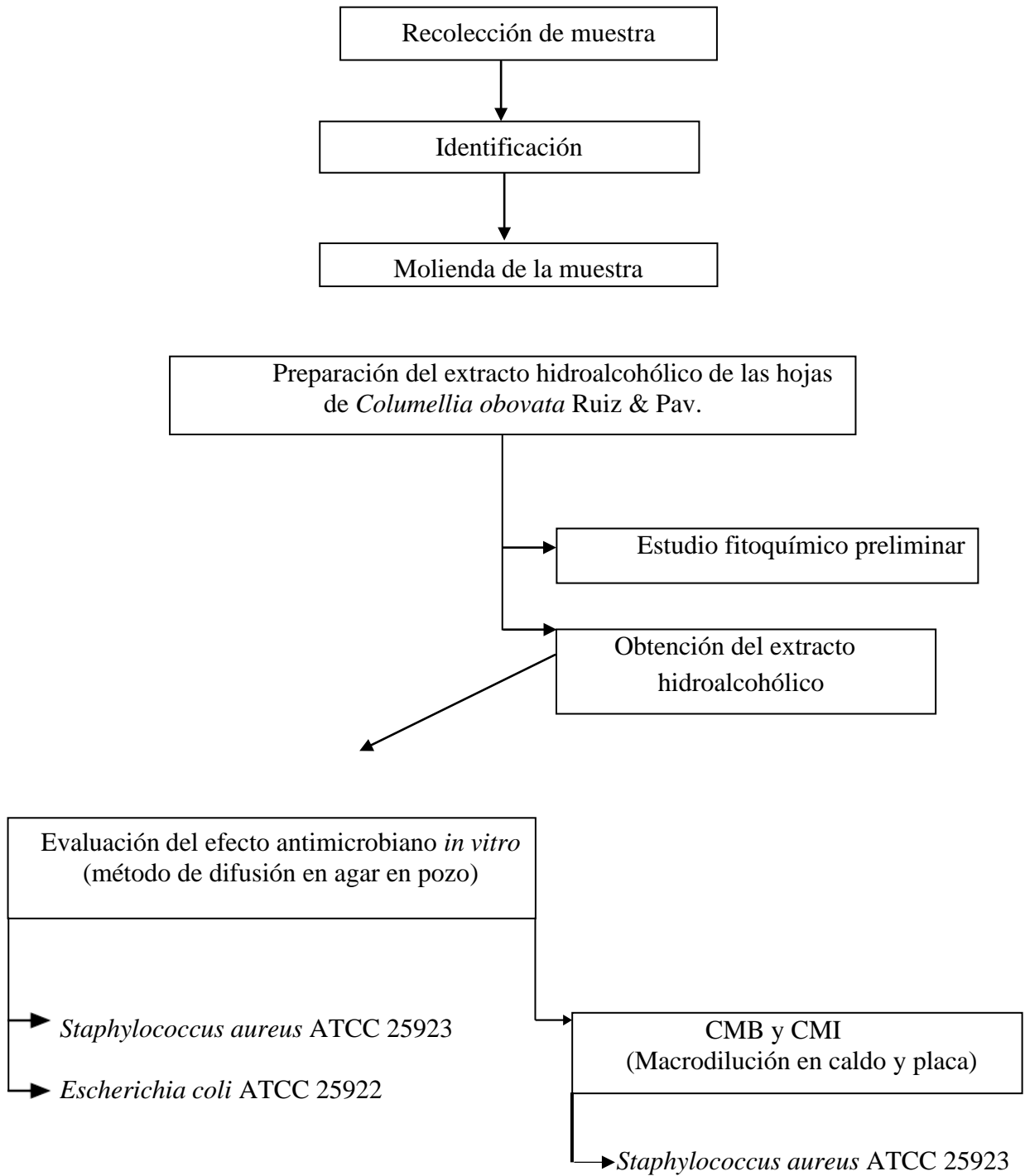
asa de Drigalsky, se esperará que seque el inóculo unos 15 minutos y se colocarán en la incubadora las placas invertidas en aerobiosis por 24 horas a 37°C.

3.5.2 Después de la incubación, se revisará el control positivo y negativo, lo cuales deben presentar colonias y sin colonias en la placa respectivamente. Por otro lado, en las diluciones, aquella o la mayor dilución en placa en la que no hayan crecido colonias, esta dilución se considerará como la concentración mínima inhibitoria o bacteriostática.

Los procesos del 3.5.1 a 3.5.2 se aplicarán para las bacterias en estudio como *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

FLUJOGRAMA DEL ESTUDIO.

ESQUEMA N° 1: Extracto hidroalcohólico de la muestra vegetal



Referencias

1. Maldonado C, Paniagua-Zambrana N, Bussmann RW, Zenteno-Ruiz FS, Fuentes AF. La importancia de las plantas medicinales, su taxonomía y la búsqueda de la cura a la enfermedad que causa el coronavirus (COVID-19). *Ecol En Boliv.* abril de 2020;55(1):1-5.
2. Salazar Carranza L, Zambrano Bacusoy M, Gallegos Zurita M, Castro Posligua AA, Mazacon Mora M. Plantas medicinales, su uso en afecciones respiratorias en comunidades rurales, provincia Los Ríos –Ecuador. *J Sci Res Rev Cienc E Investig.* 2021;6(2):5.
3. Carrión XP, Calva KY, Serrano BE, Sánchez MA. Uso tradicional de plantas medicinales en gestantes y puérperas en comunidades nativas y mestizas del Cantón Yantzaza : Traditional use of medicinal plants in pregnant and postpartum women in native and mestizo communities of the Yantzaza Canton. *LATAM Rev Latinoam Cienc Soc Humanidades.* 5 de agosto de 2023;4(2):4745-54.
4. Idris M, Usman SJ. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Commiphora africana*. *Bayero J Pure Appl Sci.* 7 de febrero de 2019; 11:191.
5. Morais HLMDN, Feitosa TC, Rodrigues JGM, Lira MGS, Nogueira RA, Luz TRSA, et al, editores. Hydroalcoholic extract of *Caryocar brasiliense* Cambess. leaves affect the development of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020 Sep 11;53: e20200176. doi: 10.1590/0037-8682-0176-2020. PMID: 32935784; PMCID: PMC7491563.

Anexo 6: Informe de Análisis de laboratorio



INFORME DE ENSAYO N° SQ231218.01

SOLICITUD DE ENSAYO	: SQE 231201.01
SOLICITANTE	: PERCY CERDAN DIAZ / BRIAN MORETO ARRAIZA
DIRECCIÓN DEL SOLICITANTE	: No indica
PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	: Proporcionado por el laboratorio Scientific Quality S.A.C.
PROCEDIMIENTO DE MUESTREO	: No aplica
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA	: M1: Extracto hidroalcohólico de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav al 25% ⁽¹⁾
	: M2: Extracto hidroalcohólico de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav al 50% ⁽¹⁾
	: M3: Extracto hidroalcohólico de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav al 75% ⁽¹⁾
	: M4: Extracto hidroalcohólico de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav al 100% ⁽¹⁾
	: M5: Gentamicina ⁽²⁾
	: M6: Suero fisiológico al 0,9% ⁽¹⁾
CANTIDAD Y DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	: M1: Un (01) frasco de 10mL
	: M2: Un (01) frasco de 10mL
	: M3: Un (01) frasco de 10mL
	: M4: Un (01) frasco de 10mL
	: M5: Un tubo de ensayo con 2mL
	: M6: Un (01) frasco de 100mL
LUGAR, FECHA Y HORA DE MUESTREO	: No aplica
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN	: 01 de diciembre del 2023/ 12:30h
CONDICIONES A LA RECEPCIÓN	: Temperatura ambiente
FECHAS DE INICIO DEL ANÁLISIS	: 01 de diciembre del 2023
FECHAS DE TÉRMINO DEL ANÁLISIS	: 15 de diciembre del 2023
FECHAS DE EMISIÓN	: 18 de diciembre del 2023

RESULTADOS DE ENSAYO MICROBIOLÓGICO: ANTIBIOGRAMA

N° Replica en placa Petri	Halo de inhibición de las sustancias de prueba frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 en milímetros (mm) a las 24 horas en agar Mueller Hinton					
	M1: Extracto hidroalcohólico de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav al 25%	M2: Extracto hidroalcohólico de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav al 50%	M3: Extracto hidroalcohólico de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav al 75%	M4: Extracto hidroalcohólico de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav al 100%	M6: Gentamicina	M6: Suero fisiológico al 0,9%
1	11,67	16,90	14,51	16,27	34,54	0,00
2	12,37	15,60	15,20	19,46	34,87	0,00
3	12,51	14,26	16,08	15,61	33,44	0,00
4	10,73	16,04	13,74	14,29	33,55	0,00
5	11,33	15,54	16,43	15,21	34,68	0,00
6	10,76	15,66	13,83	14,92	34,07	0,00
7	18,13	12,76	20,47	22,48	33,29	0,00
8	12,40	12,79	19,74	24,5	33,50	0,00
9	9,06	13,97	16,95	19,00	35,60	0,00
10	9,42	13,00	20,59	19,97	33,45	0,00



Los resultados de los ensayos corresponden solo a la(s) muestra(s) ensayada(s). Los resultados no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Queda prohibida la reproducción parcial o total del presente informe, sin la autorización escrita por SCIENTIFIC QUALITY S.A.C., la adulteración o uso indebido del presente informe constituye un delito contra la fe pública y se regirá por las disposiciones penales y civiles en la materia.

INFORME DE ENSAYO N° SQ231218.01

N° Replica en placa Petri	Halo de inhibición de las sustancias de prueba frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 en milímetros (mm) a las 24 horas en agar Mueller Hinton					
	M1: Extracto hidroalcohólico de <i>Columelia obovata</i> Ruiz & Pav al 25%	M2: Extracto hidroalcohólico de <i>Columelia obovata</i> Ruiz & Pav al 50%	M3: Extracto hidroalcohólico de <i>Columelia obovata</i> Ruiz & Pav al 75%	M4: Extracto hidroalcohólico de <i>Columelia obovata</i> Ruiz & Pav al 100%	M5: Gentamicina	M6: Suero fisiológico al 0,9%
1	0,00	0,00	0,00	0,00	28,41	0,00
2	0,00	0,00	0,00	0,00	28,43	0,00
3	0,00	0,00	0,00	0,00	28,45	0,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00	25,96	0,00
5	0,00	0,00	0,00	0,00	27,13	0,00
6	0,00	0,00	0,00	0,00	28,00	0,00
7	0,00	0,00	0,00	0,00	28,03	0,00
8	0,00	0,00	0,00	0,00	28,24	0,00
9	0,00	0,00	0,00	0,00	25,05	0,00
10	0,00	0,00	0,00	0,00	24,89	0,00

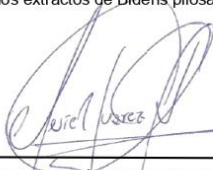


MÉTODOS DE ENSAYO	
ENSAYOS	REFERENCIA
ANTIBIOGRAMA	SQ-100. TÉCNICA DE DIFUSION EN AGAR EN PLACAS. ⁽³⁾

OBSERVACIONES:

- (1): Proporcionado por el laboratorio Scientific Quality S.A.C. según Procedimiento de ensayo N° PE 231218.01.
 (2): Gentamicina. Concentración: 160mg/2mL. Marca: Farmaindustria. Lote_1399500. F.V: 04/2025.
 (3) Basado en artículo de Chaffa-Moina y Silva-Déley (2023) Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa* y *Eryngium foetidum*. Polibotánica. 2023;(55):109-19. Mayo 2023.




Mblgo, Oniel Elías Juárez Vilcapuma
 Jefe de Laboratorio
 C.B.P.14090

Los resultados de los ensayos corresponden solo a la(s) muestra(s) ensayada(s). Los resultados no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Queda prohibida la reproducción parcial o total del presente informe, sin la autorización escrita por SCIENTIFIC QUALITY S.A.C, la aduiteración o uso indebido del presente informe constituye un delito contra la fe pública y se regula por las disposiciones penales y civiles en la materia.

INFORME DE ENSAYO Nº SQ231218.02

SOLICITUD DE ENSAYO	: SQE 231201.02
SOLICITANTE	: PERCY CERDAN DIAZ / BRIAN MORETO ARRAIZA
DIRECCIÓN DEL SOLICITANTE	: No indica
PROCEDENCIA DE LA MUESTRA	: Proporcionado por el laboratorio Scientific Quality S.A.C.
PROCEDIMIENTO DE MUESTREO	: No aplica
IDENTIFICACIÓN DE LA MUESTRA	: M1: EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav al 100% ⁽¹⁾
	: M2: EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav al 50% ⁽¹⁾
	: M3: EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav al 25% ⁽¹⁾
	: M4: EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav al 12,5% ⁽¹⁾
	: M5: EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav al 6,25% ⁽¹⁾
	: M6: EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav al 3,13% ⁽¹⁾
CANTIDAD Y DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA	: M1: Un (01) frasco de 10mL
	: M2: Un (01) frasco de 10mL
	: M3: Un (01) frasco de 10mL
	: M4: Un (01) frasco de 10mL
	: M5: Un (01) frasco de 10mL
	: M6: Un (01) frasco de 10mL
LUGAR, FECHA Y HORA DE MUESTREO	: No aplica
FECHA Y HORA DE RECEPCIÓN	: 01 de diciembre del 2023/ 12:30h
CONDICIONES A LA RECEPCIÓN	: Temperatura ambiente
FECHAS DE INICIO DEL ANÁLISIS	: 13 de diciembre del 2023
FECHAS DE TÉRMINO DEL ANÁLISIS	: 15 de diciembre del 2023
FECHAS DE EMISIÓN	: 18 de diciembre del 2023



RESULTADOS DE ENSAYO MICROBIOLÓGICO

CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Determinación de la sensibilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 (*) frente a concentraciones de EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. en placas Petri con agar BHI								
Nº Réplica	M1: EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. al 100%	M2: EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. al 50%	M3: EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. al 25%	M4: EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. al 12,5%	M5: EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. al 6,25%	M6: EHH de <i>Columellia obovata</i> Ruiz & Pav. al 3,13%	Control positivo	Control negativo
1	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)	(+++)	(-)
2	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)		
3	(-)	(-)	(-)	(+++)	(+++)	(+++)		

(-): <1 UFC/mL; (+): < 50 000UFC/mL; (++) : 50 000UFC/mL a 100 000 UFC/mL; (+++) : >100 000 UFC/mL

Control positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sembrado en placa con agar BHI.

Control negativo: Caldo BHI estéril y EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. al 100% sembrado en placa con agar BHI.

Los resultados de los ensayos corresponden solo a la(s) muestra(s) ensayada(s). Los resultados no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Queda prohibida la reproducción parcial o total del presente informe, sin la autorización escrita por SCIENTIFIC QUALITY S.A.C, la adulteración o uso indebido del presente informe constituye un delito contra la fe pública y se regula por las disposiciones penales y civiles en la materia.

INFORME DE ENSAYO N° SQ231218.02



CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

Determinación de la sensibilidad de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*) frente a concentraciones de EHH de *Columelia obovata* Ruiz & Pav. en tubos de ensayo con caldo BHI

N° Réplica	M1: EHH de <i>Columelia obovata</i> Ruiz & Pav. al 100%	M2: EHH de <i>Columelia obovata</i> Ruiz & Pav. al 50%	M3: EHH de <i>Columelia obovata</i> Ruiz & Pav. al 25%	M4: EHH de <i>Columelia obovata</i> Ruiz & Pav. al 12,5%	M5: EHH de <i>Columelia obovata</i> Ruiz & Pav. al 6,25%	M6: EHH de <i>Columelia obovata</i> Ruiz & Pav. al 3,13%	Control positivo	Control negativo
1	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
2	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)		
3	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)		

(-): No hay turbidez en caldo BHI; (+): Si hay turbidez en caldo BHI.
Control positivo: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en caldo BHI.
Control negativo: Caldo BHI estéril y EHH de *Columelia obovata* Ruiz & Pav. al 100%.

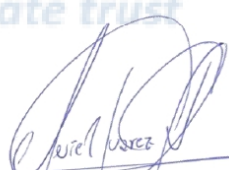
MÉTODOS DE ENSAYO

ENSAYOS	REFERENCIA
Concentración mínima inhibitoria	SQ-LE-026. Determinación de sensibilidad a los antimicrobianos por el método de macrodilución en agar.
Concentración mínima bactericida	SQ-LE-025. Determinación de sensibilidad a los antimicrobianos por el método de macrodilución en caldo.

OBSERVACIONES:

(1): Proporcionado por el por el laboratorio Scientific Quality S.A.C. según de Procedimiento de ensayo N° PE 231218.02.
(*) Concentración de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL (0,5 de estándar de turbidez de McFarland).
BHI: Infusión cerebro corazón.
EHH: Extracto hidroalcohólico de hojas.




Mbigo, Oniel Eljas Juarez Vilcapuma
Jefe de Laboratorio
C.B.P.14090

Los resultados de los ensayos corresponden solo a la(s) muestra(s) ensayada(s). Los resultados no deben ser utilizados como una certificación de conformidad con normas de producto o como certificado del sistema de calidad de la entidad que lo produce. Queda prohibida la reproducción parcial o total del presente informe, sin la autorización escrita por SCIENTIFIC QUALITY S.A.C., la adulteración o uso indebido del presente informe constituye un delito contra la fe pública y se regula por las disposiciones penales y civiles en la materia.

Anexo 7: Constancia de identificación botánica de *Columellia obovata* Ruiz & P. "pisca
pisca"



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

MUSEO DE HISTORIA NATURAL



“Año de la unidad, la paz y el desarrollo”

CONSTANCIA N° 174-USM-MHN-2023

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

La muestra vegetal (fértil) recibida de **Percy Cerdán Díaz** y **Brian Denzel Moreto Arraiza**, Estudiantes de pregrado de Universidad Norbert Wiener ha sido estudiada y clasificada como: *Columellia obovata* Ruiz & Pav. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación APG IV (2016).

ORDEN : Bruniales

FAMILIA : COLUMELLIACEAE

GÉNERO : *Columellia*

ESPECIE : *Columellia obovata* Ruiz & Pav.

Nombre vulgar: “Pisca-Pisca”

Procedencia: Huanta, Ayacucho

Determinado por: MSc. Hamilton Beltrán Santiago.

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

Lima, 7 de agosto de 2023

Dra. Joaquina Alban Castillo

JEFA DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

Anexo 8: Certificado de agar Agar Müller-Hinton



Certified : ISO 9001:2015, ISO 13485:2016 , WHO GMP

HiMedia Laboratories Private Limited

C-40, Road No.21Y, MIDC, Wagle Industrial Area,
Thane(W) - 400604 , Website : www.himedialabs.com,
Email : info@himedialabs.com

Certificate of Analysis, Quality and Conformity

Material Code : M173	Material Name : Mueller Hinton Agar	Lot No : 0000548719
Report No.: 40001267392	Date of Release & Report : 2022-08-18	Expiry Date : 2027-07

Appearance

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

Gelling

Firm, comparable with 1.7% agar gel.

Colour and Clarity of prepared medium

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

Reaction

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

pH

pH Range :7.20-7.40 Observed : 7.39

Cultural Response

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

Antibiotic Sensitivity test

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

Thymine/Thymidine Content

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

Divalent Cation Content

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

Organism	Inoculum (CFU)	Growth	Observed Lot value (CFU)	Recovery	Standard Zone	Zone of inhibition Observed
Escherichia coli ATCC 25922(WDCM 00013)						
<i>Growth promoting</i>	89	luxuriant	80	89%	-	-
<i>Amoxyclav AMC 30 mcg</i>	-	-	-	-	18-24 mm	24mm
<i>Ampicillin AMP 10 mcg</i>	-	-	-	-	16-22 mm	22mm
<i>Cefotaxime CTX 30 mcg</i>	-	-	-	-	29-35 mm	35mm
<i>Cefoxitin CX 30 mcg</i>	-	-	-	-	23-29 mm	29mm
<i>Cephalothin CEP 30mcg</i>	-	-	-	-	15-21 mm	21mm



Certified : ISO 9001:2015, ISO 13485:2016 , WHO GMP

HiMedia Laboratories Private Limited
 C-40, Road No.21Y, MIDC, Wagle Industrial Area,
 Thane(W) - 400604 , Website : www.himedialabs.com,
 Email : info@himedialabs.com

Certificate of Analysis, Quality and Conformity

Material Code : M173	Material Name : Mueller Hinton Agar	Lot No : 0000548719
Report No.: 40001267392	Date of Release & Report : 2022-08-18	Expiry Date : 2027-07

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

Staphylococcus aureus ATCC 25923 (WDCM 00034)

<i>Growth promoting</i>	86	luxuriant	79	91%	-	-
<i>Amoxyclav AMC 30 mcg</i>	-	-	-	-	28-36 mm	35mm
<i>Ampicillin/Sulbactam A/S 10/10 mcg</i>	-	-	-	-	29-37 mm	36mm
<i>Cephalothin CEP 30mcg</i>	-	-	-	-	29-37 mm	37mm
<i>Ciprofloxacin CIP 5mcg</i>	-	-	-	-	22-30 mm	30mm
<i>Erythromycin E 15 mcg</i>	-	-	-	-	22-30 mm	30mm
<i>Linezolid LZ 30 mcg</i>	-	-	-	-	25-32 mm	32mm
<i>Oxacillin OX 1mcg</i>	-	-	-	-	18-24 mm	24mm
<i>Pristinomyacin RP 15 mcg</i>	-	-	-	-	21-28 mm	28mm
<i>Tetracycline TE 30 mcg *</i>	-	-	-	-	24-30 mm	29mm
<i>Vancomycin VA 30 mcg</i>	-	-	-	-	17-21 mm	21mm
<i>Co-Trimoxazole COT 25 mcg #</i>	-	-	-	-	24-32 mm	32mm
<i>Cefoxitin CX 30 mcg</i>	-	-	-	-	23-29 mm	28mm

Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 (WDCM 00025)

<i>Growth promoting</i>	86	luxuriant	79	91%	-	-
<i>Amikacin AK 30 mcg *</i>	-	-	-	-	18-26 mm	25mm
<i>Aztreonam AT 3mcg</i>	-	-	-	-	23-29 mm	28mm
<i>Cephotaxime CTX 30 mcg</i>	-	-	-	-	18-22 mm	22mm
<i>Ceftazidime CAZ 30 mcg</i>	-	-	-	-	22-29 mm	28mm
<i>Ciprofloxacin CIP 5mcg</i>	-	-	-	-	25-33 mm	32mm
<i>Gentamicin GEN 10 mcg *</i>	-	-	-	-	16-21 mm	21mm
<i>Imipenem IPM 10 mcg</i>	-	-	-	-	20-28 mm	28mm
<i>Piperacillin PI 100 mcg</i>	-	-	-	-	25-33 mm	32mm
<i>Ticarcillin/Clavulanic acid TCC 75/10mcg</i>	-	-	-	-	20-28 mm	28mm
<i>Tobramycin TOB 10 mcg *</i>	-	-	-	-	19-25 mm	25mm

Escherichia coli ATCC 35218



Certified : ISO 9001:2015, ISO 13485:2016 , WHO GMP

HiMedia Laboratories Private Limited
 C-40, Road No.21Y, MIDC, Wagle Industrial Area,
 Thane(W) - 400604 , Website : www.himedialabs.com,
 Email : info@himedialabs.com

Certificate of Analysis, Quality and Conformity

Material Code : M173	Material Name : Mueller Hinton Agar	Lot No : 0000548719
Report No.: 40001267392	Date of Release & Report : 2022-08-18	Expiry Date : 2027-07

<i>Growth promoting</i>	88	luxuriant	79	89%	-	-
<i>Amoxyclav AMC 30 mcg</i>	-	-	-	-	17-22 mm	22mm
<i>Ampicillin AMP 10 mcg</i>	-	-	-	-	6 mm	6mm
<i>Ampicillin/Sulbactam A/S 10/10 mcg</i>	-	-	-	-	13-19 mm	18mm
<i>Piperacillin PI 100 mcg</i>	-	-	-	-	12-18 mm	18mm
<i>Piperacillin/Tazobactam PIT 100/10 mcg</i>	-	-	-	-	24-30 mm	29mm
<i>Ticarcillin TI 75 mcg</i>	-	-	-	-	6 mm	6mm
<i>Ticarcillin/Clavulanic acid TCC 75/10mcg</i>	-	-	-	-	21-25 mm	25mm
Enterococcus faecalis ATCC 29212(WDCM 00087)						
<i>Growth promoting</i>	87	luxuriant	78	89%	-	-
<i>Co-Trimoxazole COT 25 mcg #</i>	-	-	-	-	≥ 20 mm (Clear zone)	32mm
<i>Trimethoprim TR 5 mcg #</i>	-	-	-	-	≥ 20 mm	27mm
<i>Vancomycin VA 30 mcg</i>	-	-	-	-	≥ 17 mm	22mm
Staphylococcus aureus ATCC 43300 (MRSA)(WDCM 00211)						
<i>Growth promoting</i>	85	luxuriant	78	92%	-	-
<i>Oxacillin OX 1 mcg</i>	-	-	-	-	Very Hazy to No Zone	No zone
Sterptococcus pneumoniae ATCC 49619 (On Medium with 5% Sheep Blood)						
<i>Growth promoting</i>	87	luxuriant	76	87%	-	-
Neisseria gonorrhoeae ATCC 49226 (Incubated w/5% CO2)						
<i>Growth promoting</i>	86	luxuriant	80	93%	-	-
Haemophilus influenzae ATCC 49247 (On medium w/ Y.E.,NAD & Hematin)						
<i>Growth promoting</i>	88	luxuriant	79	89%	-	-

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

Control Media :

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

- . All ISO 11133 : 2014/Amd.1:2018(E) control strains are included in the Quality parameter
- . HiMedia Laboratories Pvt Ltd is Certified for ISO 9001:2015, ISO 13485:2016 , WHO GMP

. Information for BSE/TSE Risk: The material was subjected to pH <= 7.0 and/or a temperature in excess of 75°C for no less than 2 hours during the manufacturing process. The bovine raw material for this product was collected entirely from Indian Origin animals in a licensed based establishment. The animals are inspected under a Govt. approved veterinarian's supervision and were apparently free from infectious and contagious diseases. BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy)/ TSE (Transmissible



Certified : ISO 9001:2015, ISO 13485:2016 , WHO GMP

HiMedia Laboratories Private Limited
C-40, Road No.21Y, MIDC, Wagle Industrial Area,
Thane(W) - 400604 , Website : www.himedialabs.com,
Email : info@himedialabs.com

Certificate of Analysis, Quality and Conformity

Material Code : M173	Material Name : Mueller Hinton Agar	Lot No : 0000548719
Report No.: 40001267392	Date of Release & Report : 2022-08-18	Expiry Date : 2027-07

Spongiform Encephalopathy) and dioxine are not known to exist in India. This material does not contain, nor is derived from the specific risks material as defined in The Maharashtra Animal Preservation Act Govt. of Maharashtra, India.

STATUS OF THE MATERIAL : APPROVED

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

This document has been produced electronically and is valid

**Microbiologist/Sr.Executive
Microbiologist**

Asst.Dy/QC Manager

Dy/QA Manager





2022-08-18

Anexo 9: Certificado de análisis de cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p>SPECIFICATIONS: Product Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0360 Lot Number: 360-556** Reference Number: ATCC® 25923™* Passage from Reference: 3 Expiration Date: 2024/02/29</p>	<p>RELEASE INFORMATION: Quality Control Technologist: Cassandra L Hall Release Date: 2022/03/22</p>
--	--

Performance	
<p>Macroscopic Features: Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic</p> <p>Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters</p>	<p>Medium: SBAP</p> <p>Method: Gram Stain (1)</p>
<p>ID System: MALDI-TOF (1)</p>	
<p>See attached ID System results document.</p>	
<p>Other Features/ Challenges: Results</p> <p>(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</p> <div style="text-align: right;">  Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE </div>	
<p>**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.</p>	
<p>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p>	
<p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p>	
<p>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.</p>	
 TESTING CERT #2655.01	<p>(*) 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.</p>
  REFERENCE MATERIAL PRODUCER CERT #2655.02	

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	Green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	Yellow
0.00 – 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	Red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

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

Run Creation Date/Time: 2022-03-15T10:50:05.397 KLH

Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
D5 (+++) (A)	360-556	Staphylococcus aureus	2.43

Comments:





N/A

Anexo 10: Certificado de análisis de cepa Escherichia coli ATCC 25922



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<p>SPECIFICATIONS: Product Name: Escherichia coli Catalog Number: 0335 (CRM) (6) Lot Number: 335-549** Reference Number: ATCC® 25922™* Passage from Reference: 1 Expiration Date: 2024/08/31</p>	<p>RELEASE INFORMATION: Quality Control Technologist: Jacob A Lohman Release Date: 2022/09/30</p>
---	--

Performance	
<p>Macroscopic Features: 2 colony types, both are gray & beta hemolytic: one is circular to irregular, convex, slightly erose edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, erose edge & rough</p> <p>Microscopic Features: Gram negative straight rod</p>	<p>Medium: SBAP</p> <p>Method: Gram Stain (1)</p>
<p>ID System: MALDI-TOF (1)</p>	
<p>See attached ID System results document.</p>	
<p>Other Features/ Challenges: Results</p> <p>(1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 15 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - 26 mm (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm</p> <div style="text-align: right;">  Amanda Kuperus Director of Quality Control AUTHORIZED SIGNATURE </div>	
<p>**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.</p>	
<p>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</p>	
<p>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</p>	
<p>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025.</p>	
 TESTING CERT #2655.01	<p>(*) 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.</p>
	
 REFERENCE MATERIAL PRODUCER CERT #2655.02	<p>(5) Microbiologics has determined each pellet of this reference material to be sufficiently homogeneous for its intended use.</p>
	<p>(6) This product has high confidence of identification.</p>

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 – 3.00	High-confidence identification	(+++)	Green
1.70 – 1.99	Low-confidence identification	(+)	Yellow
0.00 – 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	Red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

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

Run Creation Date/Time: 2022-09-19T09:16:39.647 JAL

Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
A2 (+++) (A)	335-549	Escherichia coli	2.49

Comments:

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

Anexo 11: Constancia de eliminación de residuos biológicos



CONSTANCIA

La empresa SCIENTIFIC QUALITY S.A.C. hace constar que se ha eliminado adecuadamente los residuos biológicos del trabajo de Tesis “EFECTO ANTIMICROBIANO *IN VITRO* DEL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LAS HOJAS DE *Columellia obovata* Ruiz & Pav. “Pisca pisca” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922. LIMA, 2023” como indica nuestro Instructivo de Tratamiento de material contaminado del Laboratorio de microbiología I03-P02-JL, el cual indica que los materiales de ensayo biocontaminados se dividirán en materiales de vidrio y descartables. Ambos serán colocados, por separado, en bolsas de riesgo biológico y se colocarán en la autoclave para su proceso a 121°C por 30 minutos.

Luego del proceso de autoclavado, los materiales de vidrio se lavarán y pasarán controles de calidad para ser reutilizados. Con respecto al material descartable, al haber sido **minimizado, tratado, eliminando el riesgo significativo**; se realiza su **disposición final** como residuo sólido municipal según Ley N° 27314., Ley General de Residuos Sólidos. Título IV. Artículo 27, inciso 2, el cual dice:



“27.2 La prestación de servicios de residuos sólidos por pequeñas y microempresas estará restringida a los residuos del ámbito de la gestión municipal, conforme a las disposiciones reglamentarias que al efecto se dicten para promover su participación”.

Lima, 20 de diciembre del 2023



Mblgo. **Ornel Elias Juarez Vilcapuma**
Jefe de Laboratorio
C.B.P. 14090

Anexo 12: Evidencias fotográficas

**1. PREPARACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES de EHH *Columellia obovata*
Ruiz & Pav.**



Filtración del macerado de
Columellia obovata Ruiz & Pav.



Secado del precipitado del macerado de
Columellia obovata Ruiz & Pav.

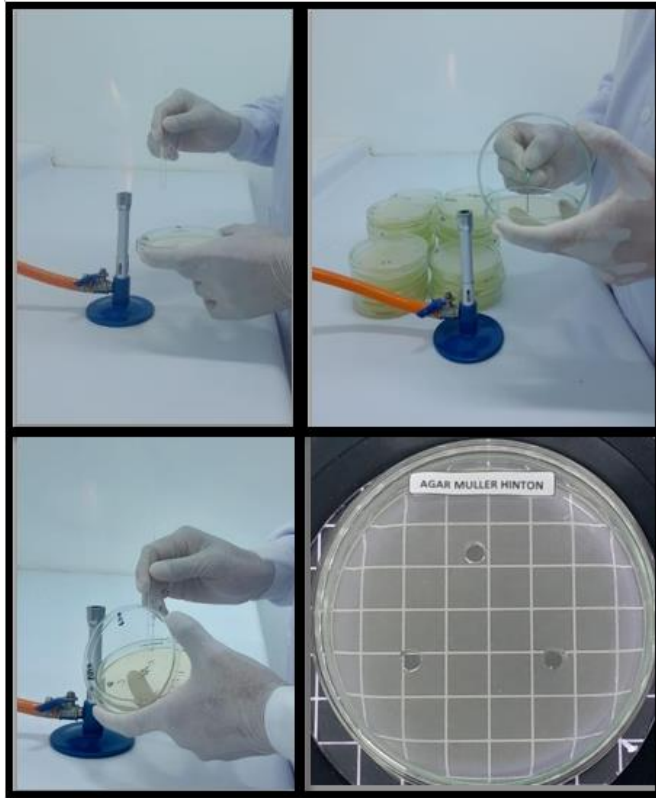


Hojas molidas y secas (HMS) de
Columellia obovata Ruiz & Pav.



Pesaje de HMS de *C. obovata*
Ruiz & Pav. para concentraciones

2. Realización de los pocillos antibiograma (5,5 mm de diámetro) con sacabocado estéril en blanco



Placas de agar Mueller Hinton

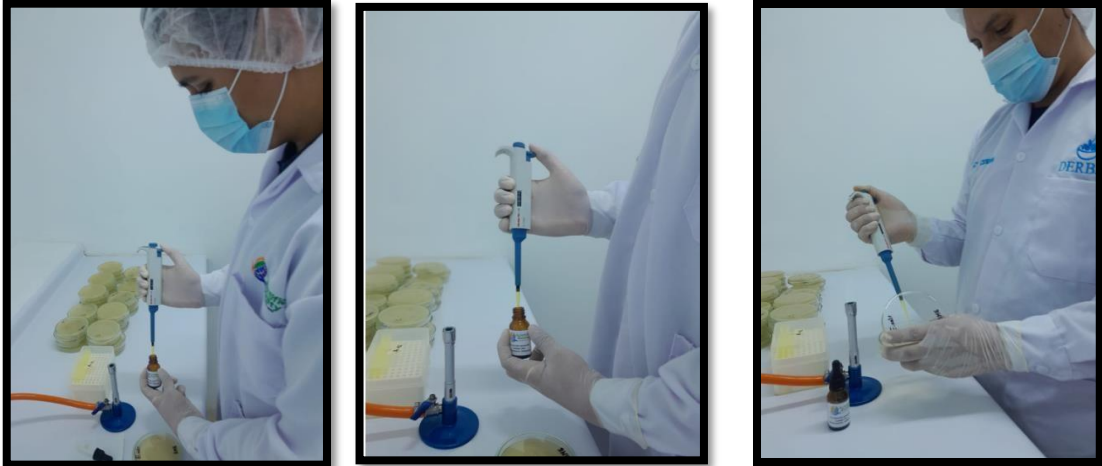
3. Preparación suspensión al 0,5 McFarland, a partir de cultivo en agar de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Comparación con el estándar comercial Sulfato de Bario 0,5 de McFarland.



4. Procedimiento de inoculación de 20uL de las sustancias de prueba, en esterilidad, frente almechero de Bunsen con micropipeta

Inoculación a los pocillos antibiograma en agar Mueller Hinton con EHH de *Columellia obovata*

Ruiz & Pav al 100%



5. Colocación en la incubadora microbiológica de las placas Petri con agar Mueller Hinton inoculadas con *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* conteniendo las sustancias de prueba en la incubadora a 37°C por los periodos de tiempo de 24 horas

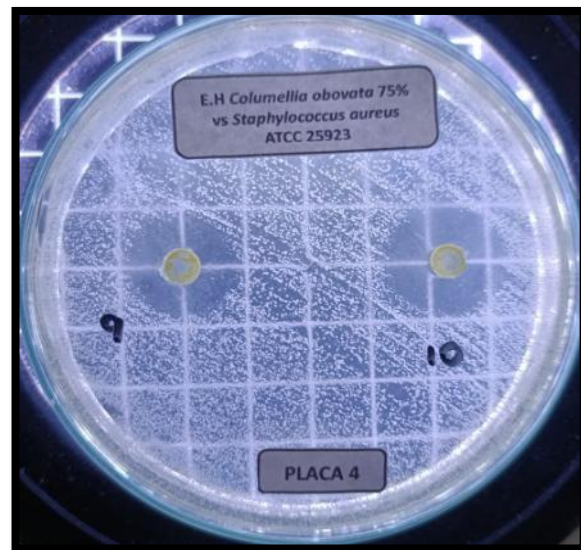
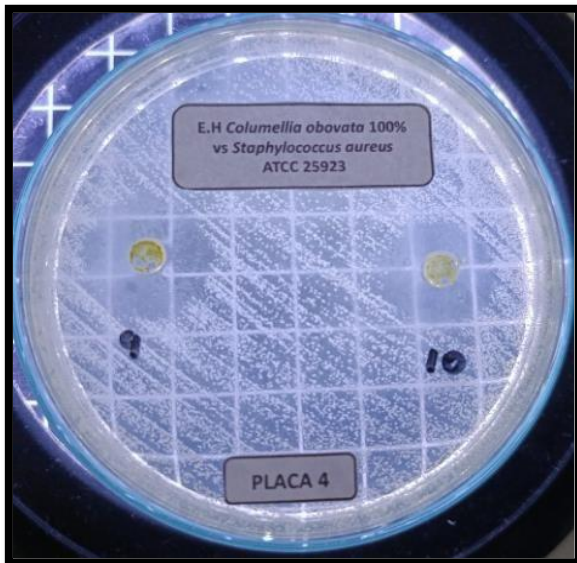


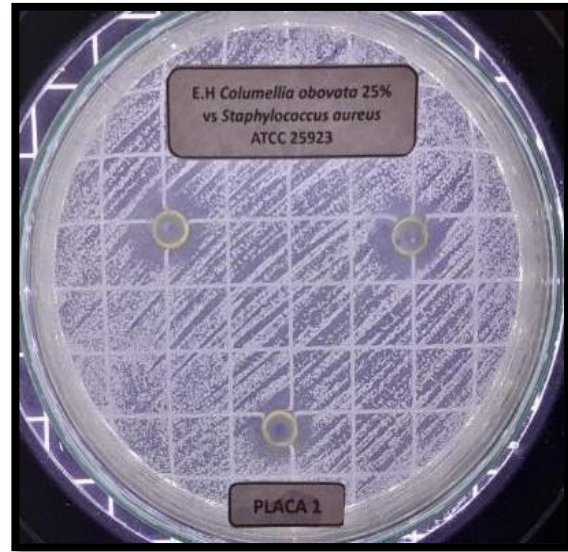
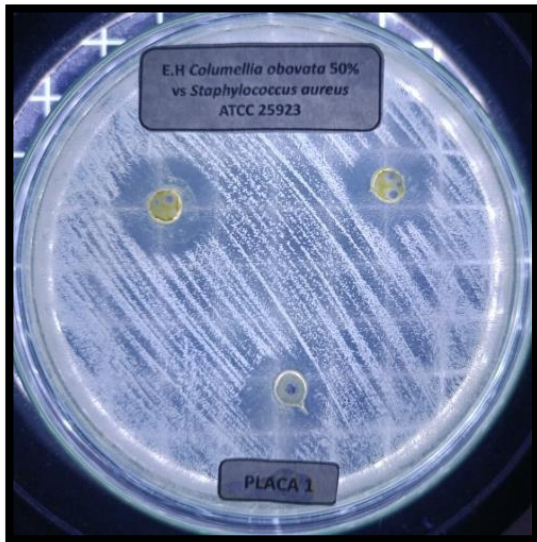
6. RESULTADOS

Después del tiempo de incubación, las placas Petri se sacan del equipo y se miden con una regla Vernier digital y una lupa de 4 aumentos de un contador de colonias microbiológico de fondo oscuro que dará contraste para observar detalladamente los halos de inhibición de concentraciones de EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

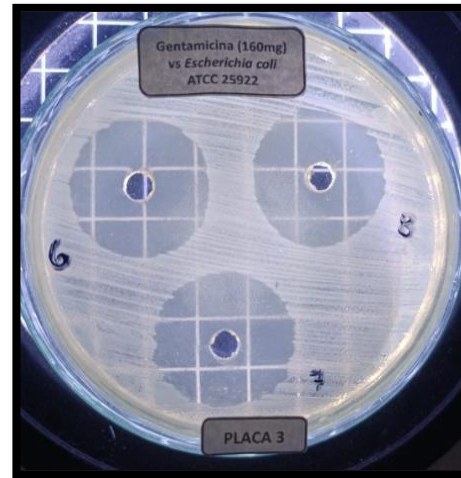
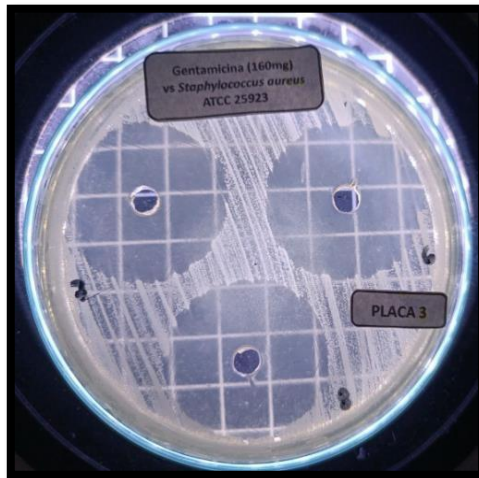


Fotos de placa Petri con pocillos antibiograma con EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. en agar Mueller Hinton frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a las 24 horas de estudio.

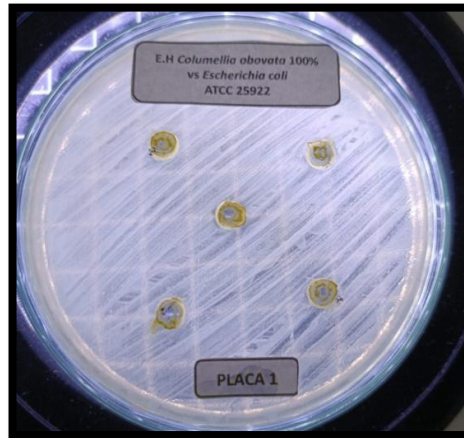




Fotos de placa Petri con pocillos antibiograma con Gentamicina (160mg) en agar Mueller Hinton frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 25922 a las 24 horas de estudio

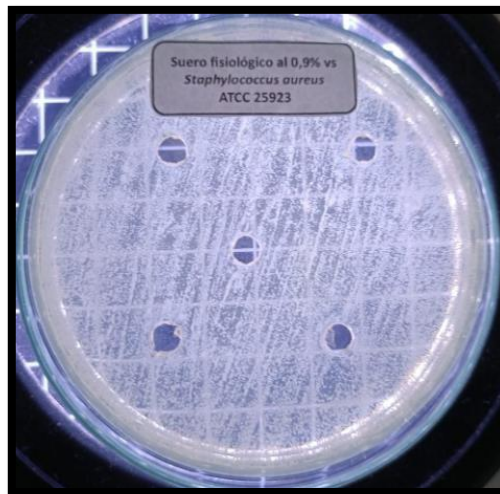


Fotos de placa Petri con pocillos antibiograma con EHH de *Columellia obovata* Ruiz & Pav. al 100% en agar Mueller Hinton frente a *Escherichia coli* ATCC 25923 a las 24 horas de estudio



Fotos de placa Petri con pocillos antibiograma con Suero fisiológico al 0,9% en agar Mueller

Hinton frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a las 24 horas de estudio



7 ELIMINACIÓN DE LOS RESIDUOS BIOLÓGICOS DEL ENSAYO.

Las placas Petri y otros residuos biológicos se colocaron en bolsas rojas y se esterizaron por autoclave según procedimiento.



AUTOCLAVE



● 19% Overall Similarity

Top sources found in the following databases:

- 18% Internet database
- 5% Publications database
- Crossref database
- Crossref Posted Content database
- 14% Submitted Works database

TOP SOURCES

The sources with the highest number of matches within the submission. Overlapping sources will not be displayed.

1	repositorio.uma.edu.pe Internet	2%
2	repositorio.uwiener.edu.pe Internet	2%
3	hdl.handle.net Internet	2%
4	repositorio.uigv.edu.pe Internet	2%
5	repositorio.uap.edu.pe Internet	<1%
6	repositorio.upads.edu.pe Internet	<1%
7	1library.co Internet	<1%
8	intra.uigv.edu.pe Internet	<1%