

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos del “Roque” (*Colletia spinosissima*) y “Caléndula” (*Calendula officinalis*) frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y formulación de un jabón líquido antibacterial.

Tesis para optar al título profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

Presentada por:

Br.Fiordaliz Medina Cardoso.

Br.Nayshia Santillan Palomino.

Asesora:

Mgt. Anahí Karina Cardona Rivero

Co- Asesora:

Mgt. Zany Sigrid Frisancho Triveño

Cusco- Perú

2019

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida y por estar conmigo en cada paso que doy brindándome fortaleza frente a todas las adversidades que nos presenta la vida, por no abandonarme nunca, por escuchar cada una de mis oraciones, por iluminar mi camino todos los días de mi vida y seguir adelante.

A mi querido papito Oscar Q.P. con todo mi amor y cariño por su apoyo incondicional en todo momento, comprensión, por estar siempre allí para mí, estoy infinitamente agradecida por todo.

A mi linda mamita Beatriz P.Ch. por su amor, por su preocupación de que jamás me falte nada, por su confianza puesta en mí, por ser una bendición en mi vida, gracias a su esfuerzo he podido culminar mis estudios, es la mejor herencia que tengo.

A mis hermanos Jimmi y Edid por ser parte importante en mi vida y representar la unidad familiar, por brindarme su cariño, su paciencia, su amor y apoyo durante todo este tiempo.

A mis amigas Shauny, Gimena y Yeni las adoro, gracias por brindarme su compañía, amistad sincera, enseñanzas y vivencias que nos recordaban lo hermoso que es la vida, lo más importante es que siempre estuvimos juntos a lo largo de nuestra carrera profesional.

A ti Fiordaliz, mi compañera que te convertiste en una gran amiga, juntas recorrimos este camino y lo logramos, entre diferencias y aciertos, pero siempre juntas.

Nayshia S.P.

DEDICATORIA

El presente trabajo de tesis lo dedico principalmente a Dios por ser el inspirador y darme la fuerza para continuar en este proceso de anhelar lo más deseado, agradecerle por todo.

A mis padres, principalmente a mi mamá por su amor y sacrificio en todos los años; gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí. A mi familia y a mi abuelito por tenerme mucha fé y su apoyo incondicional.

A ti hermana por estar siempre presente, acompañándome y por el apoyo moral, que me brindó a lo largo de esta etapa de mi vida.

A todas las personas que me han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que me abrieron las puertas y brindaron su ayuda.

A ti Nayshia que te convertiste en una gran amiga y pudimos cumplir nuestra meta juntas y por tenerme paciencia.

Fiordaliz M.C.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por su protección, amparo y fortaleza en todo lugar y momento

A la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco por habernos aceptado ser parte de ella y acogido en sus aulas universitarias e inculcando conocimientos durante nuestro desarrollo profesional.

*A nuestra asesora **Mgt. Anahí Cardona Rivera**, docente de la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, por brindarnos sus conocimientos, apoyo, atención en todo momento en forma incondicional.*

*A nuestra co –asesora **Mgt. Zany Frisancho Triveño**, docente de la escuela profesioanl de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, por su apoyo en la ejecución de este trabajo de tesis.*

A mis docentes que a lo largo de la carrera profesional nos brindaron su conocimiento e inculcaron valores en nuestra formación profesional.

Las tésistas

ABREVIATURAS

ATCC	: American type culture collection / Colección de cultura tipo americana
ANOVA	: Análisis de varianza
cm	: Centímetro
mm	: Milímetro
mL	: Mililitros
g	: Gramos
mg	: Miligramo
µg	: Microgramo
µL	: Microlitro
L	: Litro
m.s.n.m.	: Metros sobre el nivel del mar
°C	: Grados centígrados
NCCLS	: National committee for clinical laboratory standars / Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico.
pH	: Potencial de hidrogeniones.
UFC	: Unidad formadora de colonias.
CMI	: Concentración mínima inhibitoria.
CMB	: Concentración mínima bactericida.
<i>E.coli</i>	: <i>Escherichia coli</i> .
<i>S.aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i> .

ÍNDICE

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	III
ABREVIATURAS	IV
RESUMEN	17
SUMMARY	19
INTRODUCCIÓN	21

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1 Generalidades	22
1.1 Planteamiento del problema	22
1.2 Formulación del problema	24
1.3 Objetivos del estudio	24
1.3.1 Objetivo general	24
1.3.2 Objetivos específicos	24
1.4 Justificación del estudio	25
1.4.1 Conocimiento	25
1.4.2 Económico	25
1.4.3 Social	26
1.4.4 Prioridad	26
1.4.5 Aplicabilidad	26
1.5 Hipótesis	26

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2 Marco teórico y conceptual	27
2.1 Antecedentes del estudio	27
2.1.1 Antecedentes internacionales:	27
2.1.2 Antecedentes nacionales.	31
2.1.3 Antecedentes locales.	32
2.2 Bases teórico-científicas	35
2.2.1 Aspectos botánicos de las especies	35
2.2.1.1 Clasificación taxonómica	35
2.2.2 Descripción de las cepas a utilizar	40
2.2.2.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	40
2.2.2.2 <i>Escherichia coli</i>	43

2.2.2.3 Mecanismo de resistencia a los antibióticos.....	46
2.2.2.4 Descripción de los fármacos usados como patrón comparativo.....	46
2.2.3 Curva del crecimiento bacteriano.....	54
2.2.4 Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad antimicrobiana	57
2.2.5 Generalidades de la piel	59
2.2.6 Producto de higiene.....	60
2.2.7 Producto natural de higiene.....	60
2.2.7.1 Jabones.....	61
2.2.7.1.1 Características del jabón.....	61
2.2.7.1.2 Propiedades y usos	61
2.2.7.1.3 Jabón líquido	62
2.2.7.1.3.1 Clasificación.....	62
2.2.7.1.3.2 Factores que determinan la calidad del jabón	62
2.2.7.1.3.3 Calidad del jabón.....	63
2.2.7.1.3.4 Propiedades físicas de los jabones.....	63
2.2.7.1.3.5 Elemento principal del jabón.....	64
2.2.7.1.3.6 Mecanismo de detergencia.....	66
2.2.7.1.4 La saponina, composición y empleo	67
2.2.7.1.4.1 Identificación de la presencia de saponina	69
2.2.7.1.4.2 Identificación cualitativa de la saponina	70
2.2.7.1.4.3 Actividad antibacteriana.....	70

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3 Materiales y métodos	71
3.1 Materiales biológicos	71
3.1.1 Muestra vegetal	71
3.1.2 Muestra microbiana.....	71
3.2 Materiales e instrumentos.....	71
3.2.1 Materiales de campo.....	71
3.2.2 Materiales de laboratorio.....	71
3.2.3 Equipos de laboratorio	72
3.2.4 Solventes y reactivos.....	73
3.2.5 Insumos para elaboración de jabón líquido de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque”	73
3.2.6 Insumos para elaboración de jabón líquido de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula”	73
3.2.7 Jabón líquido patrón.....	74
3.2.8 Medios de cultivo.....	74
3.2.9 Fármacos empleados como patrón (discos de sensibilidad).....	74

3.3 Metodología	75
3.3.1 Tipo de estudio.....	75
3.3.2 Diseño de la investigación.....	75
3.3.2.1 Diseño de prueba antibacteriana de extracto etanólico	75
3.3.2.2 Determinación de prueba antibacteriana de jabón líquido elaborados a partir de cada extracto etanólico al 70 %	77
3.3.2.3 Diseño de la formulación de jabón líquido elaborados a partir de cada extracto etanólico al 70 %.....	80
3.4 Identificación, definición y operacionalización de variables	82
3.4.1 Variables implicadas	82
3.4.1.1 Variables independientes.....	82
3.4.1.2 Variables dependientes.....	82
3.4.2 Variables no implicadas	83
3.4.2.1 Variables intervinientes.....	83
3.4.3 Operacionalización de variables.....	83
3.4.3.1 Variables independientes.....	83
3.4.3.2 Variables dependientes.....	85
3.4.3.3 Variables intervinientes.....	86
3.5 Criterios de inclusión y de exclusión	91
3.5.1 De las muestras vegetales.....	91
3.5.2 De las bacterias	91
3.5.3 De la formulación.....	91
3.6 Procedimiento de la investigación.....	92
3.6.1 Muestreo y preparación de las muestras.....	92
3.6.1.1 Recolección de las plantas en estudio	92
3.6.1.2 Selección y secado de las muestras	92
3.6.1.3 Molienda y tamizaje de las muestras.....	92
3.6.2 Determinación de porcentaje de humedad	92
3.6.3 Obtención del extracto	93
3.6.4 Porcentaje de extracción.....	94
3.6.5 Pruebas de solubilidad.....	94
3.6.6 Análisis fitoquímico cualitativo	94
3.6.7 ensayo del reconocimiento de saponinas.....	95
3.6.8 Procedimiento general del estudio	96
3.6.9 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos etanólicos al 70%.....	97
3.6.10 Determinación de la concentración mínima bactericida (CMB).....	97
3.6.11 Estandarización de la concentración antibacteriana	98

3.6.12 Control microbiológico de los extractos etanólicos de las especies vegetales <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” y <i>Calendula officinalis</i> “Caléndula”	99
3.6.13 Determinación de la actividad antimicrobiana.....	104
3.6.14 Formulación y elaboración de jabón líquido.....	108
3.6.14.1 Insumos.....	108
3.6.14.2 Método operativo:	108
3.6.15 Control de calidad del jabón líquido elaborado con extracto etanólico de <i>Colletia spinosissima</i> / <i>Caléndula officinalis</i> al 70%.....	109
3.6.16 Estabilidad del producto.....	117
3.6.17 Medición de la actividad antibacteriana.....	117
3.6.18 Preparación del inóculo.....	119
3.7 Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	119
3.8 Técnicas para el procesamiento y análisis de la información.....	120

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4 Análisis y discusión de resultados.....	121
4.1 Recolección de la muestra.....	121
4.2 Secado de la planta.....	121
4.3 Determinación del porcentaje de humedad	121
4.4 Determinación del porcentaje de extracción	123
4.5 Determinación de las pruebas de solubilidad.....	124
4.6 Análisis fitoquímico cualitativo	125
4.7 Ensayo de reconocimiento de saponinas	128
4.8 Resultados del control microbiológico de los extractos etanólicos al 70% de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” y <i>Caléndula officinalis</i> “Calendula”	129
4.9 Determinación de la actividad antibacteriana	131
4.9.1 Estandarización de la curva de crecimiento para <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	131
4.9.2 Ensayo de la actividad antibacteriana frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 .	133
4.9.2.1 De la concentración inhibitoria mínima (CMI) por dilución en caldo de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque”	133
4.9.2.2 De la concentración mínima bactericida (CMB) de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” ...	135
4.9.2.3 Del ensayo de la actividad antibacteriana con las concentraciones estandarizadas frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	138
4.9.2.3.1 Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70% de los tallos de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a cepas de <i>E. coli</i> .ATCC 35218.....	138
4.9.2.3.2 Análisis estadístico del ensayo de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70% de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a cepas de <i>E. coli</i> ATCC 35218.....	140

4.9.2.4 De la concentración inhibitoria mínima (CMI) por dilución en caldo de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula”.....	143
4.9.2.5 De la concentración mínima bactericida (CMB) de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula”.....	146
4.9.2.6 Del ensayo de la actividad antibacteriana con las concentraciones estandarizadas frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	149
4.9.2.6.1 Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70% de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a cepas de <i>E.coli</i> . ATCC 35218.....	149
4.9.2.6.2 Análisis estadístico del ensayo de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a cepas de <i>E. coli</i> ATCC 35218.....	152
4.9.3 Estandarización de la curva de crecimiento para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 2921.....	156
4.9.4 Ensayo de la actividad antibacteriana frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.....	158
4.9.4.1 De la concentración inhibitoria mínima (CMI) por dilución en caldo de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque”.....	158
4.9.4.2 De la concentración mínima bactericida (CMB) de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” ...	160
4.9.4.3 del ensayo de la actividad antibacteriana con las concentraciones estandarizadas frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.....	163
4.9.4.3.1 Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.....	163
4.9.4.3.2 Analisis estadístico del ensayo de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70% de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.....	165
4.9.4.4 de la concentración inhibitoria mínima (CMI) por dilución en caldo de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula”.....	169
4.9.4.5 De la concentración mínima bactericida (CMB) de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula”.....	172
4.9.4.6 del ensayo de la actividad antibacteriana con las concentraciones estandarizadas frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.....	175
4.9.4.6.1 Resultados de los diámetros de los halos de inhibición de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de las flores de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.....	175
4.9.4.6.2 Análisis estadístico del ensayo de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.....	178
4.9.5 Ensayo de la actividad antibacteriana del jabón líquido frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	182
4.9.5.1 del ensayo de la actividad antibacteriana con las concentraciones estandarizadas frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.....	182
4.9.5.1.1 Concentraciones estandarizadas del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque”	182

4.9.5.1.1.1 Análisis estadístico del ensayo de la actividad antibacteriana del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a cepas de <i>E. coli</i> ATCC 35218.....	184
4.9.5.1.2 Concentraciones estandarizadas del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula”	188
4.9.5.1.2.1 Análisis estadístico del ensayo de la actividad antibacteriana del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a cepas de <i>E. coli</i> ATCC 35218.....	191
4.9.6 Ensayo de la actividad antibacteriana del jabón líquido frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	194
4.9.6.1 Del ensayo de la actividad antibacteriana con las concentraciones estandarizadas frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	194
4.9.6.1.1 Concentraciones estandarizadas del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque”	194
4.9.6.1.1.1 Análisis estadístico del ensayo de la actividad antibacteriana del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	196
4.9.6.1.2 Concentraciones estandarizadas del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula”	200
4.9.6.1.2.1 Análisis estadístico del ensayo de la actividad antibacteriana del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	202
4.10 Formulación y elaboración de jabón líquido antibacterial con extracto etanólico al 70 %	206
4.10.1 Formulación y elaboración de jabón líquido antibacterial con extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” al 3 % de concentración.....	206
4.10.2 Formulación y elaboración de jabón líquido antibacterial con extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” al 5 % de concentración	207
4.10.3 Estudio de estabilidad preliminar de la formulación de jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” al 3% de concentración.....	208
4.10.4 Estudio de estabilidad preliminar de la formulación de jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” al 5% de concentración.....	210
4.10.5 Control de calidad microbiológico de los jabones líquidos elaborado con extracto etanólicos al 70 %	212
CONCLUSIONES	214
SUGERENCIAS	217
BIBLIOGRAFÍA	218
ANEXOS	224

ÍNDICE DE FLUJOGRAMAS

FLUJOGRAMA N° 1: Obtención de los extractos secos etanólicos al 70% y análisis fitoquímico.	93
FLUJOGRAMA N° 2 : Resumen general de la investigación.	96
FLUJOGRAMA N°3: Control de calidad de los extractos concentrados en base al criterio imperativo.	100
FLUJOGRAMA N°4: Control de calidad de los extractos concentrados en base al criterio indicativo de higiene.	101
FLUJOGRAMA N°5: Control de los extractos concentrados en base al criterio de alerta o límites de criterio.	102
FLUJOGRAMA N°6: Control de los extractos concentrados en base al criterio imperativo de alerta o límites críticos.	103
FLUJOGRAMA N°7 : De la estandarización de la curva de crecimiento para <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	105
FLUJOGRAMA N° 8: Determinación de la actividad antibacteriana por el método de pozos excavados de los extractos etanólicos al 70% de <i>Colletia spinosissima</i> y <i>Caléndula officinalis</i>	107

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA N°1 : Componentes químicos de la Caléndula.	39
TABLA N°2: Factor de virulencia <i>Staphylococcus aureus</i>	41
TABLA N°3: Toxinas presentes en <i>Staphylococcus aureus</i>	42
TABLA N°4: Enzimas presentes en <i>Staphylococcus aureus</i>	42
TABLA N°5: Suceptibilidad antimicrobiana para <i>Staphylococcus aureus</i>	47
TABLA N°6: Suceptibilidad antimicrobiana para <i>Escherichia coli</i>	48
TABLA N°7: Resumen de la operacionalización de variables.	88
TABLA N°8: Variables no implicadas.	90
TABLA N°9: Marcha fitoquímica.	94
TABLA N°10: Análisis microbiológico.	99
TABLA N°11: Resultados del porcentaje de humedad de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” y <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula”.	121
TABLA N° 12: Resultados del porcentaje de extracción de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” y <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula”.	123
TABLA N° 13: Resultados de la solubilidad de los extractos etanólicos al 70% de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” y <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula”.	124
TABLA N° 14: Resultados del análisis fitoquímico cualitativo de los extractos etanólicos al 70% de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” y <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula”.	126
TABLA N° 15: Resultados del ensayo de reconocimiento de saponinas.	128
TABLA N° 16: Resultados del control microbiológico de los extractos etanólicos al 70% de <i>Colletia spinosissima</i> "Roque" y <i>Caléndula officinalis</i> "Caléndula".	129
TABLA N° 17: Absorbancia para la estandarización de la curva de crecimiento para <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.	131
TABLA N°18: Concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” para el ensayo del CMI.	133
TABLA N°19: Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a <i>E. coli</i>	134

TABLA N°20: Concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70 % del <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” para el ensayo de la CMB.	135
TABLA N° 21: Número de colonias del ensayo estándar de la CMB del extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a <i>E.coli</i>	136
TABLAN°22: Resultados de los diámetros de los halos de inhibición del extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> frente a <i>E. coli</i>	138
TABLA N°23: Halos de inhibición de los fármacos patrón para <i>Escherichia coli</i>	139
TABLA N°24: Resultados descriptivos para el ensayo de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a cepas de <i>E. coli</i> ATCC 35218.....	140
TABLA N°25: Análisis de la varianza (anova) para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a cepas de <i>E. coli</i> ATCC 35218.....	141
TABLA N°26: Prueba post hoc de Tukey para el ensayo de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a cepas de <i>E. coli</i> ATCC 35218.....	142
TABLA N°27: Concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinales</i> “Caléndula” para el ensayo de la CMI.....	144
TABLA N°28: Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a <i>E. coli</i>	145
TABLA N°29: Concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70 % del <i>Caléndula officinalis</i> para el ensayo de la CMB.	146
TABLA N°30: Número de colonias del ensayo estándar de la CMB del extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a <i>E.coli</i>	147
TABLA N°31: Resultados de los diámetros de los halos de inhibición del extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> frente a <i>E. coli</i>	149
TABLA N°32: Halos de inhibición de los fármacos patrón para <i>Escherichia coli</i>	150
TABLA N°33: Resultados descriptivos para el ensayo de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> frente a cepas de <i>E. coli</i> ATCC 35218.	152
TABLA N°34: Análisis de la varianza (anova) para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a cepas de <i>E. coli</i> ATCC 35218.....	153
TABLA N° 35: Prueba post hoc de Tukey para el ensayo de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a cepas de <i>E. coli</i> ATCC 35218.....	154
TABLA N°36: Absorbancia para la estandarización de la curva de crecimiento para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.	156
TABLA N°37: Concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque”para el ensayo del CMI.	158
TABLA N°38: Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	159
TABLA N°39: Concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> "Roque" para el ensayo de la CMB.	160
TABLA N°40: Número de colonias del ensayo estándar de la CMB del extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	161
TABLA N°41: Resultados de los diámetros de los halos de inhibición del extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	163
TABLA N°42: Halos de inhibición de los fármacos patrón para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.....	164

TABLA N°43: Resultados descriptivos para el ensayo de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i>	166
TABLA N°44: Análisis de la varianza (anova) para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	167
TABLA N°45: Prueba post hoc de Tukey para el ensayo de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.	168
TABLA N°46: Concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” para el ensayo del CMI.	170
TABLA N°47: Resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	171
TABLA N°48: Concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70 % del <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” para el ensayo de la CMB.....	172
TABLA N°49: Numero de colonias del ensayo estándar de la CMB del extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	173
TABLA N°50: Resultados de los diámetros de los halos de inhibición del extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	175
TABLA N°51: Halos de inhibición de los fármacos patrón para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.	176
TABLA N°52: Resultados descriptivos para el ensayo de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.	178
TABLA N°53: Análisis de la varianza (anova) para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.	179
TABLA N°54: Prueba post hoc de Tukey para el ensayo de la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.	180
TABLA N°55: Concentraciones estandarizadas del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i>	182
TABLA N°56: Resultados de los diámetros de inhibición de la actividad antibacteriana del jabón líquido elaborado con el extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a cepas de <i>E. coli</i> ATCC 35218.	183
TABLA N°57: Resultados descriptivos para el ensayo de la actividad antibacteriana del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a cepas de <i>E. coli</i> ATCC 35218.	185
TABLA N°58: Análisis de la varianza (anova) para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a cepas de <i>E. coli</i> ATCC 35218.	186
TABLA N°59: Prueba post hoc de Tukey para el ensayo de la actividad antibacteriana del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a cepas de <i>E. coli</i> ATCC 35218.	187
TABLA N°60: Concentraciones estandarizadas del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i>	188
TABLA N°61: Resultados de los diámetros de inhibición de la actividad antibacteriana del jabón líquido elaborado con el extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a cepas de <i>E. coli</i> ATCC 35218.	189
TABLA N°62: Resultados descriptivos para el ensayo de la actividad antibacteriana del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a cepas <i>E. coli</i> ATCC 35218.	191

TABLA N°63: Análisis de la varianza (anova) para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a cepas de <i>E. coli</i> ATCC 35218.	192
TABLA N°64: Prueba post hoc de Tukey para el ensayo de la actividad antibacteriana del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a cepas de <i>E. coli</i> ATCC 35218.	193
TABLA N°65: Concentraciones estandarizadas del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i>	194
TABLA N°66: Resultados de los diámetros de inhibición de la actividad antibacteriana del jabón líquido elaborado con el extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.	195
TABLA N°67: Resultados descriptivos para el ensayo de la actividad antibacteriana del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	197
TABLA N°68: Análisis de la varianza (anova) para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.	198
TABLA N°69: Prueba post hoc de Tukey para el ensayo de la actividad antibacteriana del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.	199
TABLA N°70: Concentraciones estandarizadas del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i>	200
TABLA N°71: Resultados de los diámetros de inhibición de la actividad antibacteriana del jabón líquido elaborado con el extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.	201
TABLA N°72: Resultados descriptivos para el ensayo de la actividad antibacteriana del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a cepas <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.	203
TABLA N°73: Análisis de la varianza (anova) para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.	204
TABLA N°74: Prueba post hoc de Tukey para el ensayo de la actividad antibacteriana del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.	205
TABLA N°75: Reporte de la estabilidad preliminar fisicoquímica de la formulación de jabón líquido con extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i>	208
TABLA 76: Reporte de la estabilidad preliminar organoléptica de la formulación del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque”.	209
TABLA N°77: Reporte de la estabilidad preliminar fisicoquímica de la formulación de jabón líquido con extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i>	210
TABLA N°78: Reporte de la estabilidad preliminar organoléptica de la formulación de jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula”.	211

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°1: Descripción de <i>Colletia spinosissima</i>	36
FIGURA N°2: <i>Caléndula officinalis</i>	38
FIGURA N°3: Curva de crecimiento bacteriano.	55
FIGURA N°4: Capas de la piel.....	60
FIGURA N°5: Esquema del mecanismo de detergencia.	67
FIGURA N°6: Estructura general de una saponina.	68
FIGURA N°7: Antibiograma.	119

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO N° 1: Determinación de la concentración mínima bactericida	97
CUADRO N° 2: Evaluación de las 4 formulaciones realizadas para obtener el jabón líquido con extracto etanólico al 70 % de <i>Colletia spinosissima</i> al 3 % de concentración final.....	206
CUADRO N° 3: Evaluación de las 3 formulaciones realizadas para obtener el jabón líquido con extracto etanólico al 70 % de <i>Caléndula officinalis</i> al 5 % de concentración final.	207
CUADRO N° 4: Especificaciones fisicoquímicas de estudio de estabilidad preliminar de productos cosméticos.	209
CUADRO N° 5: Especificaciones fisicoquímicas de estudio de estabilidad preliminar de productos cosméticos.	210
CUADRO N° 6: Exámen microbiológico realizado al jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” y <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula” antes y después de la prueba de estabilidad preliminar.....	212
CUADRO N° 7: Especificaciones de control microbiológico.	213

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO N° 1: Curva de crecimiento para <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218.	132
GRÁFICO N° 2 : Regresión lineal de las concentraciones de extracto etanólico al 70 % de Roque vs los promedios del número de colonias en cultivos de <i>E. coli</i>	137
GRÁFICO N°3 : Regresión lineal de las concentraciones de extracto etanólico al 70 % de Roque vs los diámetros promedios de sus halos de inhibición en cultivos de <i>E. coli</i>	143
GRÁFICO N°4: Regresión lineal de las concentraciones de extracto etanólico al 70 % de Caléndula vs los promedios del número de colonias en cultivos de <i>E. coli</i>	148
GRÁFICO N°5: Regresión lineal de las concentraciones de extracto etanólico al 70 % de Caléndula vs los diámetros promedios de sus halos de inhibición en cultivos de <i>E. coli</i>	155
GRÁFICO N°6: Curva de crecimiento para <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.....	157
GRÁFICO N° 7: Regresión lineal de las concentraciones de extracto etanólico al 70 % de Roque vs los promedios del número de colonias en cultivos de <i>S. aureus</i>	162
GRÁFICO N°8: Regresión lineal de las concentraciones de extracto etanólico al 70 % de Roque vs los diámetros promedios de sus halos de inhibición en cultivos de <i>S. aureus</i>	169
GRÁFICO N° 9: Regresión lineal de las concentraciones de extracto etanólico al 70 % de Caléndula vs los promedios del número de colonias en cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i>	174
GRÁFICO N° 10: Regresión lineal de las concentraciones de extracto etanólico al 70 % de Caléndula vs los diámetros promedios de sus halos de inhibición en cultivos de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923.	181

GRÁFICO N°11: Regresión lineal de las concentraciones de extracto etanólico al 70 % de Roque en jabón líquido antibacterial vs los diámetros promedios de sus halos de inhibición en cultivos de <i>E. coli</i>	183
GRÁFICO N°12: Regresión lineal de las concentraciones de extracto etanólico al 70 % de Caléndula en jabón líquido antibacterial vs los diámetros promedios de sus halos de inhibición en cultivos de <i>E. coli</i>	190
GRÁFICO N° 13: Regresión lineal de las concentraciones de extracto etanólico al 70 % de Roque en jabón líquido antibacterial vs los diámetros promedios de sus halos de inhibición en cultivos de <i>S. aureus</i>	196
GRÁFICO N°14: Regresión lineal de las concentraciones de extracto etanólico al 70 % de Caléndula en jabón líquido antibacterial vs los diámetros promedios de sus halos de inhibición en cultivos de <i>S. aureus</i>	202

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ESQUEMA N°1: Preparación de la muestra para el análisis microbiológico.	111
ESQUEMA N°2: Recuento de microorganismos aerobios mesófilos.	112
ESQUEMA N°3: Recuento de hongos y levaduras.	113
ESQUEMA N°4: Recuento de <i>Escherichia coli</i>	114
ESQUEMA N°5: Recuento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	115
ESQUEMA N°6: Recuento e identificación de <i>Staphylococcus aureus</i>	117

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO N° 1: Determinación del porcentaje de humedad.	224
ANEXO N° 2: Porcentaje de extracción.	224
ANEXO N° 3: Pruebas de solubilidad.	225
ANEXO N° 4: Pruebas de análisis fitoquímico cualitativo del extracto etanólico de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” y <i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula”.	225
ANEXO N° 5: Criterios de actividad antimicrobiana atendiendo al halo de inhibición.	228
ANEXO N° 6: Ficha de medición de los halos de inhibición de las cepas bacterianas.	229
ANEXO N° 7: Ficha de recolección y secado de las especies vegetales.	230
ANEXO N° 8: Análisis organoléptico.....	231
ANEXO N° 9: Instrucciones para la activación de las cepas ATCC ± KWIK_STIK.....	232
ANEXO N° 10: Identificación botánica de las especies vegetales en estudio	233
ÍNDICE FOTOGRÁFICO	234

RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y formulación de jabón líquido antibacterial a partir de cada extracto etanólico.

Para lo cual se realizaron los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” a travez de maceración, filtración y evaporación. Posteriormente se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* por el método de pozos excavados y se elaboró dos tipos de jabones líquidos con propiedades antibacteriales con cada uno de los extractos mencionados.

Los extractos etanólicos al 70 % fueron sometidos a un control microbiológico, para los microorganismos de salmonella, coliformes fecales, mesófilos viables, hongos y levaduras, el cual no presentaron contaminación microbiana. El análisis fitoquímico evidencia compuestos fenólicos, flavonoides y quinonas en ambos extractos y de saponinas y esteroides en el extracto etanólico de *Colletia spinosissima* “Roque”. La concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218 fueron: 6.25 y 25.00 mg/mL, respectivamente y frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fueron: 12.50 y 25.00 mg/mL, respectivamente. La concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218 fueron: 50.00 y 100.00 mg/50uL, respectivamente y frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fueron: 50.00 y 100.00 mg/50uL, respectivamente. La determinación de la actividad antibacteriana *in vitro* por el método de pozos excavados, donde, el promedio de los halos máximos obtenidos de los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” frente a *Escherichia coli* ATCC 35218 fueron: 25.24 y 16.24 mm/50uL, respectivamente y frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fueron: 18.61 y 23.15 mm/50uL, respectivamente. La determinación de la actividad antibacteriana de los jabones líquidos elaborados a partir de los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” a una concentración de 3 y 7 %, respectivamente, presentan un halo máximo promedio frente a *Escherichia coli* ATCC 35218 de 31.89 y 31.58 mm, respectivamente; y frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de 23.65 y 22.52 mm, respectivamente y a una concnecracion de 5 % para ambos extractos.

Teniendo en cuenta los halos de inhibición a estas concentraciones se elaboró diferentes formulaciones de jabon líquido antibacteriales de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula”, eligiéndose la que presentó mejores características; a una concentración de 3 y 5 %, respectivamente.

En conclusión, los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” presentan actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Escherichia coli* ATCC 35218 en comparación a los fármacos patrón amikacina 30 mg y ciprofloxacino 5 ug; *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en comparación a los fármacos patrón clindamicina 2 ug y ciprofloxacino 5 ug, mientras para el efecto antibacteriano de jabón líquido elaborado a partir de cada extracto etanólico al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” presentan actividad antibacteriana *in vitro* frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

PALABRAS CLAVE: CMI, CMB, jabón, antibacterial, *Colletia spinosissima*, *Caléndula officinalis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

SUMMARY

The objective of this study was to determine the in vitro antibacterial activity of 70% ethanol extracts of *Colletia spinosissima* "Roque" and *Calendula officinalis* "Calendula" against *Escherichia coli* strains ATCC 35218, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and formulation of a liquid soap antibacterial

The 70% ethanol extracts of *Colletia spinosissima* "Roque" and *Calendula officinalis* "Calendula" were obtained by maceration, filtration and evaporation, and subsequently their in vitro antibacterial activity was determined by the method of excavated wells and two types of liquid soaps were prepared with antibacterial properties with each of the mentioned extracts.

The 70% ethanol extracts were subjected to a microbiological control, for the microorganisms of salmonella, fecal coliforms, viable mesophiles, fungi and yeasts, verifying that these did not present any contamination. Phytochemical analysis revealed the presence of large quantities; of phenolic compounds, flavonoids and quinones in both extracts and of saponins and steroids in the ethanol extract of *Colletia spinosissima* "Roque". The minimum inhibitory concentration (MIC) of 70% ethanol extracts of *Colletia spinosissima* "Roque" and *Calendula officinalis* "Calendula" versus; *Escherichia coli* ATCC 35218 strains were: 6.25 and 25.00 mg / mL, respectively and *Staphylococcus aureus* strains ATCC 25923 were: 12.50 and 25.00 mg / mL, respectively. The minimum bactericidal concentration (CMB) of 70% ethanol extracts of *Colletia spinosissima* "Roque" and *Calendula officinalis* "Calendula" versus; *Escherichia coli* ATCC 35218 strains were: 50.00 and 100.00 mg / 50uL, respectively and strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were: 50.00 and 100.00 mg / 50uL, respectively. The minimum bactericidal concentration (CMB) of 70% ethanol extracts of *Colletia spinosissima* "Roque" and *Calendula officinalis* "Calendula" versus; *Escherichia coli* ATCC 35218 strains were: 50.00 and 100.00 mg / 50uL, respectively and strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were: 50.00 and 100.00 mg / 50uL, respectively. The determination of in vitro antibacterial activity by the method of dug wells, where, the average of the maximum halos obtained from 70% ethanol extracts of *Colletia spinosissima* "Roque" and *Calendula officinalis* "Calendula" versus; *Escherichia coli* ATCC 35218 strains were: 25.24 and 16.24 mm / 50uL, respectively and strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 were: 18.61 and 23.15 mm / 50uL, respectively.

The determination of the antibacterial activity of liquid soap made from 70% ethanol extracts of *Colletia spinosissima* "Roque" and *Calendula officinalis* "Calendula" at a concentration of 3 and 7%, respectively, have a maximum average halo against ; *Escherichia coli* ATCC 35218 strains of 31.89 and 31.58 mm, respectively; and strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 of 23.65 and 22.52 mm, respectively and at a concentration of 5% for both extracts.

Antibacterial liquid soaps were made from 70% ethanol extracts of *Colletia spinosissima* "Roque" and *Calendula officinalis* "Calendula", in which, different formulations were tested, choosing the one with the best characteristics; at a concentration of 3 and 5%, respectively.

In conclusion, 70% ethanol extracts of *Colletia spinosissima* “Roque” and *Calendula officinalis* “Calendula” have in vitro antibacterial activity against *Escherichia coli* ATCC 35218 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 compared to the standard Amikacina 30 mg Ciprofloxacin 5 ug drugs , and clindamycin 2 ug ciprofloxacin 5 ug respectively, while for the antibacterial effect of liquid soap made from 70% ethanol extract of *Colletia spinosissima* “Roque” and *Calendula officinalis* “Calendula” present in vitro antibacterial activity against strains of *Escherichia coli* ATCC 35218 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

KEY WORDS: CMI, CMB, soap, antibacterial, *Colletia spinosissima*, *Calendula officinalis*, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.

INTRODUCCIÓN

Nuestro país presenta una riqueza y mega diversidad de plantas medicinales nativas, y es uno de los pilares de la etnofarmacología y la medicina tradicional, desde la época del incanato hasta la actualidad. Siendo éstas utilizadas en forma empírica por sus efectos terapéuticos en el cuidado de la salud. (1) A nivel internacional existen tendencias y hechos globales que muestran como el mundo esta en búsqueda de un equilibrio, orientándose por una preferencia cada vez por lo natural u orgánico, reflejada en el crecimiento sostenido de la demanda mundial y local por productos agrícolas de este tipo. (2)

La OMS estima que alrededor del 80 % de la población mundial depende de la medicina tradicional por sus necesidades básicas de salud, y que casi el 85 % de la medicina tradicional involucra el uso de plantas medicinales, sus principios activos y extractos vegetales. Por ello, en 1978 se produjo el empleo y estudio de la herbolaria en gran parte del mundo. (3)

Es urgente el descubrimiento y desarrollo de una nueva generación de agentes antibacterianos que combaten de una forma más efectiva a estos microorganismos. Para lo cual las plantas han demostrado una gran diversidad de sustancias antibacterianas que son útiles en el desarrollo de nuevos medicamentos. (4)

Son pocas las plantas peruanas que han valido su uso tradicional, entre ellas tenemos a *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” los cuales son útiles por poseer propiedades antibacteriales y presentar saponinas. Crecen en los diferentes pisos ecológicos de nuestra serranía entre 3500 a 4700 msnm, donde existe en abundancia. (5)

Por lo tanto los extractos etanólicos se utilizarán en la formulación de jabón líquido a partir de cada extracto etanólico, siendo el objetivo principal de la presente tesis la evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* del jabón líquido elaborado a partir de cada extracto etanólico de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” en comparación de un jabón líquido patrón.

CAPÍTULO I

GENERALIDADES

1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A lo largo del día y con la realización de las actividades cotidianas adquirimos una importante carga microbiana en nuestras manos. Las manos son un importante vehículo de transmisión de microorganismos y gérmenes siendo dichos microorganismos los responsables de enfermedades infecciosas como IRAS Y EDAS. (6)

El lavado de manos es una estrategia internacional de importancia para la Salud Pública, ya que ha demostrado ser una técnica efectiva, de bajo costo, y de fácil aplicación. La promoción de esta actividad tiene como finalidad la disminución de transmisión de enfermedades respiratorias y gastrointestinales, incluso ha sido considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la vacuna más eficiente para evitar enfermedades de transmisión por contacto ya que ha demostrado ser eficaz en los esfuerzos por combatir agentes como helmintos e infecciones en los ojos o en la piel. (6)
(7)

No obstante si bien es cierto que una adecuada higiene de manos requiere la utilización de un producto con acción antibacterial, en setiembre del 2017 la Comunidad Andina con base en las disposiciones de la agencia de Administración de Medicamentos y Alimentos de los Estados Unidos (FDA), envió un comunicado sobre la restricción y prohibición de ingredientes en productos cosméticos de esta manera se prohibió el uso de 17 ingredientes entre los cuales figuran el Triclocarban y Triclosán que venían siendo utilizados como agentes bactericidas y los cuales solo podrán ser utilizados según condiciones y concentraciones recomendadas en la elaboración de formulaciones como son los jabones líquidos, en barra, en espuma, en gel, geles de ducha y cualquier otro tipo de jabón que sea de uso en manos y cuerpo diseñados para utilizar con agua y posterior enjuague que son fabricados importados y comercializados como productos cosméticos en la Comunidad Andina. (8)(9)

Actualmente en el mercado cosmético se viene observando una creciente tendencia por el diseño y elaboración de productos cosméticos menos agresivos y naturales. (10)

Es en este contexto se vio conveniente la elaboración de un jabón antibacterial hecho con extractos etanólicos de “Roque” (*Colletia spinosissima*) y “Caléndula” (*Calendula*

officinalis) que son especies vegetales que crecen en la Localidad de Ocongate, provincia de Quispicanchis a 3400 msnm. (5)

Las plantas que contienen saponinas han sido utilizados hace cientos de años en el lavado de ropa y fabricación de jabón por este rico contenido en saponinas. *Colletia spinosissima*, Roque, palo de jabón, espino negro, barba de tigre, de la familia Rhamnaceae es un género botánico de fanerógamas; todas son nativas del Perú, Bolivia, Brasil, Chile, Uruguay. (11)

Las saponinas son glucósidos en los cuales varias unidades de monosacáridos se entrelazan mediante un enlace glicosídico a un resto denominado aglicón. En la naturaleza, las saponinas triterpénicas están ampliamente distribuidas, las pentacíclicas se encuentran con frecuencia en las monocotiledóneas especialmente en las familias de la Dioscóreas, Amarilidáceas e Iliáceas. (12) La corteza y brotes tiernos son ricas en saponinas, por ello es utilizado en el lavado de ropa e higiene sustituyendo al jabón; también es usado por las mujeres en menstruaciones dolorosas. (5) (11)

En el Perú el Roque se usa en forma de jabón, leña y carbón de alto poder calorífico, fertilizante naturales del suelo especie nitrificante. El Dr Justo Mantilla indicó que la *Caléndula* se utiliza por su efecto cicatrizante y antiinflamatorio actualmente. (5) (11)

La búsqueda de nuevos antibióticos a base de plantas medicinales es una alternativa nueva y promisorio, es así, que las especies vegetales de *Colletia spinosissima* y *Caléndula officinalis* han sido seleccionadas a los cuales se les atribuye diferentes propiedades farmacológicas entre ellas ser antibacterianas, teniendo en cuenta que estudios de especies de su misma familia y género presentan actividad bactericida, frente a *E coli* y *S.aureus* que causan infecciones dérmicas, por lo que es necesario investigar las propiedades medicinales de estas especies vegetales de manera científica, brindando nuevas alternativas de tratamiento antibacteriano a través de una forma farmacéutica o cosmética que sea eficaz.

Con el siguiente trabajo de investigación se busca evaluar el efecto antibacteriano de las especies vegetales frente a diferentes cepas bacterianas.

Además de elaborar un jabón líquido antibacterial hecho con ingredientes naturales y sea una alternativa ecológica y sustentable. Al ser biodegradables producen menos daño ambiental y cuida nuestra piel de manera natural y así siendo sustentable al usar

ingredientes naturales resulta ser más económico, debido a la abundancia y facilidad de recolección de materia prima de las especies vegetales estudiadas.

1.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Presentarán actividad antibacteriana *in vitro* los extractos etanólicos al 70 % de “Roque” (*Colletia spinosissima*) y “Caléndula” (*Caléndula officinalis*) frente a *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 y *Escherichia coli* cepa ATCC 35218?

¿Presentarán actividad antibacteriana *in vitro* la formulación de jabón líquido antibacterial a partir de cada extracto etanólico al 70 % de “Roque” (*Colletia spinosissima*) y “Caléndula” (*Caléndula officinalis*) frente a *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 y *Escherichia coli* cepa ATCC 35218?

1.3 OBJETIVOS DEL ESTUDIO

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antibacterina *in vitro* de los extractos etanólicos del “Roque” (*Colletia spinosissima*) y “Caléndula” (*Caléndula officinalis*) frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y formulación de un jabón líquido antibacterial

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener los extractos etanólicos al 70 % del “Roque” (*Colletia spinosissima*) y “Caléndula” (*Caléndula officinalis*); determinar el porcentaje humedad, rendimiento, realizar pruebas de solubilidad y evaluar el perfil fitoquímico cualitativo de los extractos etanólicos al 70 %.
2. Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* de los extractos etanólicos al 70 % de “Roque” (*Colletia spinosissima*) y “Caléndula” (*Caléndula officinalis*) frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218, en comparación a los fármacos patrón ciprofloxacino y amikacina.
3. Evaluar el efecto antibacteriano *in vitro* de los extractos etanólicos al 70 % de “Roque” (*Colletia spinosissima*) y “Caléndula” (*Caléndula officinalis*) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, en comparación a los fármacos patrón ciprofloxacino y clindamicina.
4. Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos etanólicos al 70 % de “Roque” (*Colletia spinosissima*) y “Caléndula” (*Caléndula officinalis*) frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

5. Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos etanólicos al 70 % de “Roque” (*Colletia spinosissima*) y “Caléndula” (*Caléndula officinalis*) frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
6. Formular jabón líquido a partir de cada extracto etanólico al 70 % de “Roque” (*Colletia spinosissima*) y “Caléndula” (*Caléndula officinalis*).
7. Evaluar el efecto antibacterial de jabon líquido elaborados a partir de cada extracto etanólico al 70 % de “Roque” (*Colletia spinosissima*) y “Caléndula” (*Caléndula officinalis*) frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, en comparación al jabón líquido patrón.
8. Determinar el control de calidad organoléptico, fisicoquímico y microbiológico de jabon líquido elaborados a partir de cada extracto etanólico al 70 % de “Roque” (*Colletia spinosissima*) y “Caléndula” (*Caléndula officinalis*).
9. Determinar la estabilidad preliminar de jabón líquido elaborados a partir de cada extracto etanólico al 70 % del “Roque” (*Colletia spinosissima*) y “Caléndula” (*Caléndula officinalis*).

1.4 JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

1.4.1 Conocimiento

Nuestras comunidades poseen una riqueza en flora invaluable, muchas de ellas poco estudiadas por la ciencia moderna pero que desde tiempos antiguos viene siendo utilizada por los pobladores tanto como un recurso cultural así como medicinal, es importante entonces tomar en cuenta estos conocimientos ancestrales con el fin de aprovecharlas, explotarlas en favor de la investigación y así poder realizar formulaciones y elaborar productos de higiene que ayuden en el control y prevención de enfermedades transmisibles.

1.4.2 Económico

Actualmente en el mercado se viene observando una creciente tendencia por el diseño y elaboración de productos para la higiene menos agresivos y naturales, se vienen incorporando a las formulaciones de los jabones extractos de origen vegetal que a su vez aporten propiedades antisépticas. Siendo así ésta una ventaja en comparación con otros productos para generar un crecimiento económico a través de la producción de este tipo de formulaciones.

En el proceso de fabricación de los jabones ecológicos se utilizan ingredientes naturales siendo beneficioso el uso de materias primas (*Colletia spinosissima* y *Calendula officinalis*) donde crecen de manera natural y abundante; así puedan elaborar sus propios jabones los cuales previenen enfermedades gastrointestinales y respiratorias, esto resulta ser más económico para la población.

1.4.3 Social

El jabón es un producto esencial en el proceso de higienización de las manos, es por esto que es imperativo su acceso a éste tanto por su fácil uso como su costo asequible.

La transmisión de enfermedades infectocontagiosas debido a una inadecuada higiene de las manos o falta de esta en niños menores a 10 años viene siendo un problema tanto sanitario como social.

1.4.4 Prioridad

Esta investigación sobre la actividad antibacteriana de las especies vegetales en estudio busca una revaloración de nuestros recursos naturales que se encuentran en nuestro medio, aportando bases científicas de la actividad antibacteriana y antiséptica que puedan ser incorporados a formulaciones de higiene. Es importante estudiar dichas plantas andinas, ya que realizando el presente trabajo de investigación pueda demostrar el probable efecto antibacteriano frente a *S. aureus* y *E. coli*.

1.4.5 Aplicabilidad

Una vez finalizado el trabajo de investigación esta formulación puede ser aplicada al campo farmacéutico como una alternativa de uso común, con menor impacto ambiental contribuyendo así a crear una conciencia ambiental en la población.

1.5 HIPÓTESIS

Los extractos etanólicos al 70 % de “Roque” *Colletia spinosissima* y “Caléndula” *Caléndula officinalis* y la formulación de jabón líquido de cada uno de estos extractos etanólicos presentan actividad antibacteriana *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO Y CONCEPTUAL

2.1 ANTECEDENTES DEL ESTUDIO

2.1.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES:

Leal Marco “EFICACIA ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS DE *Thymus vulgaris*, *Caléndula officinalis* Y *Salvia officinalis*: APLICACIÓN CLÍNICA EN MASTITIS BOVINA”. Facultad de Ciencias Pecuarias. Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Bogotá, Colombia 2014.

El objetivo de esta investigación fue valorar la actividad antibacteriana de los extracto de *Thymus vulgaris*, *Caléndula officinalis* y *Salvia officinalis* frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *S. agalactiae*. El método fue experimental, transversal y prospectivo, la técnica fue Ecométrico cada una de las bacterias fue desafiada con diferentes proporciones de los extractos de la siguiente manera 1:2 1:4 y 1:8. Se obtuvieron los siguientes resultados frente a *S. aureus* el extracto de *C. officinalis* posee efecto bactericida total en todas las diluciones. El extracto de *T. vulgaris* produjo resultados bactericidas, principalmente, en las diluciones 1:2 y 1:4. El extracto de *S. officinalis* produjo resultados bactericidas, principalmente, en las diluciones 1:2 y 1:4. En cuanto a los efectos de los extractos sobre *E. coli*, se observó que el extracto de *C. officinalis* posee efecto bactericida en las diluciones 1:2 y 1:4. El extracto de *T. vulgaris* produjo resultados bactericidas, principalmente, en la proporción 1:2. El extracto de *S. officinalis* produjo resultados bactericidas, principalmente, en la proporción 1:2. Por su parte, los efectos de los extractos sobre *S. agalactiae* fueron los siguientes: El extracto de *C. officinalis* posee efecto bactericida en las diluciones 1:2 y 1:4. El extracto de *T. vulgaris* produjo resultados bactericidas, principalmente, en las diluciones 1:2 y 1:4. El extracto de *S. officinalis* produjo resultados bactericidas totales en todas las diluciones.

(13)

Ayala Almeida D. C. **“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL ACEITE ESENCIAL DE MARGARITA (*Calendula officinalis*) Y JENGIBRE (*Zingiber officinale*) VS. CLORHEXIDINA AL 2% SOBRE CEPAS DE PORPHYROMONA GINGIVALIS: ESTUDIO IN VITRO”**. Facultad de odontología. Universidad central del Ecuador, Quito, octubre 2016.

El propósito del presente trabajo de investigación fue determinar la actividad antibacteriana de los aceites esenciales de Margarita (*Calendula officinalis*) y Jengibre (*Zingiber officinale*) sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis*, una de las bacterias que con mayor frecuencia se presentan en la enfermedad periodontal. Los aceites se obtuvieron mediante el método de arrastre de vapor, fueron colocados en los medios de cultivo por medio de sensidiscos observándose lo siguiente: la eficacia antibacteriana del aceite de esencial de Margarita obtuvo un promedio de 5mm de halo inhibitorio, Jengibre obtuvo 11.5mm de halo inhibitorio, siendo mayor el efecto antibacteriano del aceite esencial de Jengibre, pero menor al halo inhibitorio de la sustancia de control Clorhexidina al 2%, de 22mm. (14)

Delgadillo Sánchez J, García Jiménez A. **ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS EXTRACTOS DE LA *Caléndula officinalis* y el *Cymbopogon citratus* EN LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DEL *Staphylococcus aureus*.2001**

El propósito de la investigación es comprobar que el aceite esencial de la *Caléndula officinalis* y el *Cymbopogon citratus* tienen actividad antibacteriana sobre el crecimiento del *Staphylococcus aureus*, para lo cual se sembraron masivamente 12 cepas diferentes obtenidas de pacientes en un medio de Muller Hinton, realizándose dos diluciones, una al 100% y la otra al 50 % de cada una de las plantas, se incubaron 24 horas a 37 grados, midiéndose el halo de inhibición en milímetros. Los resultados indicaron que los aceites fueron más eficaces al 50%, estos resultados se deben a que una solución acuosa tiene más dispersión que una solución aceitosa. Estadísticamente no hay diferencia significativa en la efectividad antibiótica de ambos aceites en una concentración al 50%. La actividad antibiótica se debe a los triterpenos y a los diferentes compuestos químicos de cada planta, se cree que los triterpenos actúan a nivel de la membrana celular causando la destrucción de la bacteria. (15)

Velazco, G., W., J. **EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE EXTRACTOS DE PLANTAS FRENTE A MICROORGANISMOS ASOCIADOS A CONJUNTIVITIS BACTERIANAS.** Universidad De La Salle. Departamento de Ciencias Básicas Bogota, 2018.

En este estudio se evaluó el potencial antimicrobiano de cinco extractos de plantas (Belladona, Caléndula, Albahaca, Achiote y fruto del achiote) frente a *S. aureus* y *S. epidermidis*. Para lo cual se seleccionaron las cinco plantas más empleadas en la medicina tradicional para el tratamiento de conjuntivitis y con pocos estudios previos de actividad antimicrobiana. Posteriormente, fueron obtenidos los respectivos extractos etanólicos mediante maceración en frío y se evaluó el potencial antimicrobiano frente a *S. aureus* (ATCC 6538) y *S. epidermidis* (ATCC 14990), por la técnica de difusión en disco y dilución en tubo; así como, la susceptibilidad frente a antibióticos comerciales. Finalmente teniendo en cuenta las CMIs se establecieron las mezclas para la evaluación sinérgica por medio de la metodología del tablero de damas. De esta manera, se encontró que oxitetraciclina y ciprofloxacina son los antibióticos que presentan mayor halo de inhibición con un valor promedio de 29 mm y 27mm respectivamente y CMIs de 0,5 mg/mL (Oxitetraciclina) y 0,12 mg/mL (Ciprofloxacina) para *S. aureus*; ciprofloxacina y cefoxitin con halos de 35,6 mm y 32,6 mm respectivamente y CMIs de 2mg/mL para ambos antibióticos frente a *S. epidermidis*. En la evaluación de los extractos se determinó que el de achiote (hojas) y caléndula fueron los presentaron mayor efecto inhibitorio frente a la cepa de *S. aureus* al presentar halos de inhibición de 13 mm y 8,6 mm respectivamente y CMIs de 15 y 30mg/mL. Para *S. epidermidis* los mejores halos de inhibición fueron para los extractos de achiote hojas y fruto, con halos de 16,6 mm y 9,6mm y cuyas CMIs fueron e 15 mg/mL y 30 mg/mL respectivamente. Finalmente, la mezcla del extracto de achiote y ciprofloxacina mostró para *S. aureus* un efecto de sinergia parcial y para *S. epidermidis* un efecto aditivo. (16)

Granados, D. **EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO ANTIMICROBIANO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE CALÉNDULA (*Caléndula officinalis*) SOBRE LAS PRINCIPALES CEPAS DE BACTERIAS CAUSANTES DE OTITIS CANINA**, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, marzo de 2015.

Se comprobó de forma in vitro, el efecto antimicrobiano en diferentes concentraciones de Caléndula, sobre las principales cepas de bacterias, utilizando aislamientos de *Staphylococcus intermedius*, *Streptococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Proteus mirabilis*, provenientes de muestras clínicas de perros con patología de oído. Se determinó la actividad antibacteriana por el método de dilución, sembrando las cepas en agares preparados con el extracto etanólico de la planta y en agares con etanol como control negativo. Se determinó el tipo de actividad, negativo o positivo, por un diseño no probabilístico convencional. Se realizó la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) sólo sobre *Staphylococcus intermedius* ya que fue la única cepa sensible al extracto estudiado. Se visualizó una efectividad en concentraciones de 1:10, 1:20 y 1:40, mientras que hubo crecimiento en 1:80, por lo que se determinó como CIM 1:40. Las demás cepas estudiadas fueron resistentes a caléndula. Comparando los tratamientos convencionales con la CIM encontrada, que corresponde a 2.5%, se puede concluir que la concentración mínima necesaria del extracto es una concentración más alta a las de tratamientos convencionales. (17)

Madrid, Ahumado, M.A, **EFECTO DE LA *Caléndula officinalis* EN LA PROLIFERACIÓN DEL FIBROBLASTO GINGIVAL HUMANO**. Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana. Jul-Dic; 29(63): 107-112. Bogota, 2015.

Objetivo: observar los efectos que producen tres presentaciones de *C. officinalis* en diferentes concentraciones en la proliferación de los fibroblastos gingivales humanos. Método: a fibroblastos gingivales humanos (FGH) en quinto pase, obtenidos de explantes de donantes sanos, se les realizaron estímulos con extracto etanólico de *C. officinalis* (EEC), tintura de *C. officinalis* (TC) y enjuague K-Trix® en concentraciones de 750, 500, 150, 100 µg/ml y se observó la proliferación de los FGH a las 12, 24 y 48 horas en relación con un grupo de células sin estimular, utilizando la prueba MTA con Cell Titer 96®. Resultados: el mayor efecto proliferativo se logró con el EEC en concentraciones de 750 y 500 µg/ml a las 12 horas. La TC a 100 y 150 µg/ml a las 48 horas inhibió el crecimiento,

mientras que el enjuague K-Trix® no tuvo efecto en la proliferación de los FGH en ninguna concentración en ningún tiempo. Conclusión: la proliferación de los FGH depende de la presentación de la *C. officinalis*, del tiempo y de la concentración. (18)

2.1.2 ANTECEDENTES NACIONALES.

Herrera Matos. Salonida. B. **EFFECTO PROTECTOR DEL CHAMPÚ CONTENIENDO EXTRACTO ETANÓLICO DE CORTEZA Y BROTES TIERNOS DE *Colletia spinosissima* J. GMELIN (TACSANA) SOBRE LA IRRITACIÓN INDUCIDA EN PIEL DE RATAS.** Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Tesis Lima-Peru 2007

Se evaluó el efecto protector del champú conteniendo extracto etanólico de corteza y brotes tiernos de *Colletia spinosissima* J. Gmelin (tacsana), en la irritación inducida en la piel de ratas. Es un estudio experimental, desarrollado en el laboratorio de Farmacología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Mayor de San Marcos, Lima-Perú. se utilizaron 30 ratas Holtzman (15 hembras y 15 machos), en un peso promedio de 142 - 100 g; asignados en forma aleatoria en cinco grupos de estudio: champú I 50 mg/kg, champú II 250 mg/kg, champú III 500 mg de *Colletia spinosissima*, champú comercial y champú base (control). En el extracto se determinó la presencia de metabolitos secundario: saponinas, taninos, flavonoides, alcaloides, carbohidratos. Resultados: in vivo se demostró la actividad protectora antiinflamatoria de la planta (50%), $p < 0,05$ y cicatrizante (50%) $p < 0,05$ en la piel de ratas, comprobado mediante estudios histológicos de la piel, y sin dermosensibilización, con la formación de fibras de colágeno; reparación de tejidos epiteliales y desaparición de los signos inflamatorios. In vitro se ha observado que la planta en 1 ug/mL induce una reducción del radical DPPH de 71,02%, comparativamente a vitamina C (27,53%) y al trolox (66,93%). (11)

Figuroa M. D., Díaz G. L. **OBTENCIÓN DE SAPONINA DEL CORMO DE GLADIOLO (*Gladiolus communis Linnaeus*) MEDIANTE SOLVENTES ORGÁNICOS.** Universidad Nacional del Callao, Facultad de Ingeniería Química. Tesis. Lima Perú 2016.

La siguiente investigación consistió en obtener saponina del cormo de *Gladiolus communis* Linnaeus por medio de solventes orgánicos como el acetato de etilo, etanol y butanol en las diferentes etapas. Las variables que se controlaron fueron la velocidad de agitación magnética y la concentración del solvente etanol; estas se desarrollaron en un

diseño factorial de 16 tratamientos en total, siendo los resultados evaluados en forma cualitativa, usando el reactivo de Libermann-Burchard cuantitativo mediante cromatografía en capa fina y uso del espectrofotómetro IR. El procedimiento implicó un previo acondicionamiento de los cormos, para proceder al desengrase de la muestra asignada (10 g) por agitación magnética con el solvente acetato de etilo (1:10 p/v), luego se maceró con etanol a diferentes concentraciones, se combinaron los extractos y se evaporó el solvente por completo en baño maría y finalmente se trató con el solvente etanol-butanol (3:1 v/v) para ser llevado al rotavapor a fin de concentrar la saponina. Se sembraron la muestra patrón y las muestras en estudio a diferentes concentraciones en las placas HPLC SILICA GEL para la comprobación de la presencia de saponina, el mejor resultado se evidenció en la muestra sometida a 400 rpm de agitación magnética y 70% de concentración en etanol, obteniéndose 0.8515 g de producto final con concentración de saponina al 40%. (19)

2.1.3 ANTECEDENTES LOCALES.

Achahuanco, M., & Aragón, P. **ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y GLICÓLICOS DE LAS HOJAS DE LA ESPECIE VEGETAL *Flourenzia polycephala* M.O. Dillon (PAUCA) SOBRE CEPAS ATCC DE *Staphylococcus aureus* Y *PROPIONIBACTERIUM* ACNÉS, Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.** (Tesis de Pre-grado). Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. 2015

El objetivo fue determinar la actividad antibacteriana in vivo de los extractos Etanólicos y glicólicos de las hojas de la especie vegetal *Flourenzia polycephala* M.O. Dillon (Pauca) sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Propionibacterium* acnés, y su relación con la actividad antioxidante. el método empleado fue experimental utilizándose la técnica del método de pozos excavados, procediendo primero con la prueba piloto y luego con la estandarización de las concentraciones para determinar la concentración mínima inhibitoria de cada extracto sobre cada bacteria, donde se obtuvieron los siguientes resultados para todos los casos con valores de $p=0.000$ que indica que existe diferencia significativa entre las concentraciones de los extractos y los halos formados. La Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico sobre cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* y *Propionibacterium* acnés, fue de 0.368 mg/25uL y 0.34 mg/25uL respectivamente. Y el CMI del extracto glicólico sobre *Staphylococcus aureus* y *Propionibacterium* acnés, fue de 0.13 mg/25uL y 0.84 mg/25uL respectivamente. Se

determinó también la capacidad antioxidante por el método de la decoloración del radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) con el patrón ácido ascórbico. Luego se relacionó la actividad antibacteriana con la actividad antioxidante, mediante la correlación lineal de Pearson, llegando a la conclusión de que el extracto etanólico y glicólico de *Flouencia polycephala* M.O. Dillon presenta actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Propionibacterium acnés* y posee actividad antioxidante. (20)

Rosell, G. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE POLIFENOLES-FLAVONOIDES Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Thymus vulgaris* L. “TOMILLO” FRENTE A *Staphylococcus aureus* CEPA ATCC 25923. (Tesis de Pregrado). Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. 2014

El objetivo fue determinar el contenido total de polifenoles-flavonoides y actividad antioxidante y antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico al 70 % de *Thymus vulgaris* L. “tomillo” frente a *Staphylococcus aureus* Cepa ATCC 25923, método fue cuasiexperimental, la determinación cuantitativa de polifenoles se realizó por el Método Folin-Ciocalteu, para flavonoides por el Método woisky y Salatino y la determinación de sus actividades antioxidantes fue por el método Brand Williams y la actividad antibacteriana por la técnica de prueba de diluciones en caldo y difusión en agar. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: la marcha fitoquímica reveló la presencia de alcaloides, fenoles, flavonoides, quinonas, saponinas y cumarinas. El contenido de polifenoles fue de 24,70 ug de ácido láctico 100ug de extracto, el contenido de flavonoides fue de 50.82 ug de quercetina dihidratada/500ug, el valor de la CMI frente *S. aureus* fue de 11,78 mg/ug y el mayor halo de inhibición fue de 39.42 mm a 44.96 mm/25uL. En conclusión los coeficientes de correlación de Pearson muestran la directa proporcionalidad entre la cantidad de polifenoles y flavonoides con la actividad antioxidante y antibacteriana *in vitro* del extracto. (21)

Huaman, Y. & Oroche, Y. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS Y CLOROFÓRMICOS DE *Oenothera rosea* “YAWAR CHONQ’A” Y *Geranium sessiliflorum* “OJOTILLO” FRENTE A *Staphylococcus aureus* CEPA ATCC Y *Escherichia coli* CEPA ATCC Y DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA

POR VÍA ORAL” (Tesis de Pre-grado). Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, 2016.

El objetivo del presente estudio fue determinar la actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos al 70 % y clorofórmicos de *Oenothera rosea aiton* “Yawar chonca” y *Geranium sessiliflorum cavanilles* “Ojotilo” frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* y determinar la toxicidad aguda por vía oral. Para lo cual los extractos etanólicos al 70 % y clorofórmicos de *Oenothera rosea Aiton* y *Geranium sessiliflorum* se obtuvieron por maceración, filtración y evaporación. Se determinó la actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos al 70 % y clorofórmicos de las especies vegetales en estudio por el método de pozos excavados. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: La marcha fitoquímica reveló la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides en abundante cantidad para ambos extractos etanólicos al 70 %. La presencia de taninos y lactonas en abundante cantidad en el extracto clorofórmico de *Geranium sessiliflorum Cavanilles* y en poca cantidad para el extracto clorofórmico de *Oenothera rosea Aiton*. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea Aiton* y *Geranium sessiliflorum* frente a *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 fueron de 0.050 mg/50uL y 0.150 mg/50uL, respectivamente. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto etanólico al 70 % de *Geranium sessiliflorum* frente a *Escherichia coli* cepa ATCC 35218 fue 11 mg/50uL. Y el CMI de los extractos clorofórmicos de *Oenothera rosea Aiton* y *Geranium sessiliflorum Cavanilles* para ambas cepas fueon de 0,00 y 0,00 mg/50uL. El promedio de los halos máximos obtenidos fueron de 21,17 y 28,66 mm/50uL para *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 con los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea* y *Geranium sessiliflorum*, respectivamente; para *Escherichia coli* cepa ATCC 35218 fue de 17,11 mm/50uL con el extracto etanólico al 70 % de *Geranium sessiliflorum* Cavanilles, y ninguno de los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea Aiton* y *Geranium sessiliflorum* presentaron toxicidad aguda por vía oral. En conclusión, los extractos etanólicos al 70 % de *Oenothera rosea* y *Geranium sessiliflorum* presentan actividad antibacteriana in vitro frente a *Staphylococcus aureus* cepas ATCC 25923 en comparación a los fármacos patrón y frente a *Escherichia coli* cepas ATCC 35218 solo el extracto etanólico al 70 % de *Geranium sessiliflorum* presenta actividad antibacteriana in vitro en comparación a los fármacos patrón.(22)

2.2 BASES TEÓRICO-CIENTÍFICAS

2.2.1 ASPECTOS BOTÁNICOS DE LAS ESPECIES

2.2.1.1 CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

“Roque” *Colletia Spinosissima* y “Caléndula” *Caléndula officinalis*

➤ **“Roque”** *Colletia Spinosissima*

A. Localización

Colletia es un género botánico de fanerógamas (plantas con flor), con 17 especies de arbustos espinosos siendo usadas la mayor parte como antipiréticas y purgativas. Todas las especies son nativas de Bolivia, Brasil, Perú, Chile, Uruguay. Argentina posee 3 especies en el Norte, Centro y Sur.

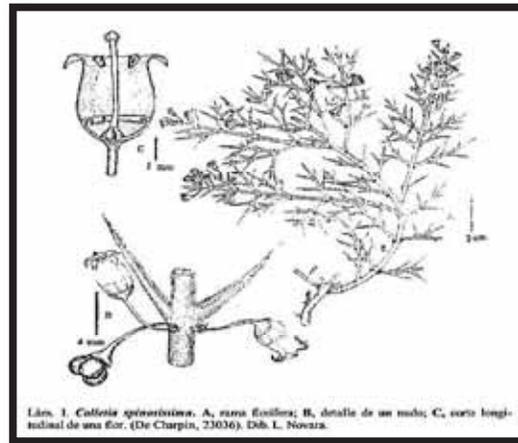
Desde Ecuador hasta el centro de la Argentina. "En los países altoandinos y en el Norte de la Argentina habita entre los 4.000 y 2.000 m s.m., mientras que en el límite Sur-este de su área de distribución vive prácticamente al nivel del mar". Muy frecuente en las alturas de Guachipas, Ctas. Del Lajar y del Cebilar. (23)

B. Descripción

Arbusto 1,5-2,5 m alt., muy ramificado, ramas erectas o arqueadas rígidas, todas rematando en espina punzante, color verde oliva. Hojas efímeras, estipuladas, opuestas o subopuestas, lámina simple, orbicular, dentada, glabra, pecíolo breve, de 6-10 mm long. x 4-8 mm lat. Sépalos blancos a blanco amarillentos, formando un tubo de 3,5-4,0 mm long., lóbulos 5, triangulares, reflexos, de 1 mm long. Anteras dorsifijas de 0,5 mm long., filamentos 0,5 mm.

Insertos en la axila de los lóbulos. Ovario trilobado, glabro, de 1 mm long. x 2 mm lat.; estilo 4 mm long., exserto de la fauce del cáliz; estigma 0,3-0,5 mm diám. Cápsula tricoca 5-6 mm diám, como se aprecia en la figura N°1. (23)

FIGURA N°1: DESCRIPCIÓN DE *Colletia spinosissima*.



Fuente: Tortosa, R.D.; Novara, L. J. Flora del valle de Ierma. Herbario MCNS. Noviembre 1992. Edición 2012. (27)

FOTO N° 1: *Colletia spinosissima*.



Fuente: Tortosa, R.D.; Novara, L. J. Flora del valle de Ierma. Herbario MCNS. Noviembre 1992. Edición 2012. (27)

Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Rosales

Familia: Rhamnaceae

Tribu: Colletieae

Género: *Colletia*

Especie: *Colletia spinosissima* (5)

C. Sinonimias

Palo jabón (*Colletia spinosissima Gmelin*) “Quina”, “Crucero”, “Quina- Quina”, “Crucero”, “Quina del Campo”, “Espino Negro”, “Espina cruz”, “Barba de Tigre”, “Roque”, “Coronilla”, “Coronillo. (23)

D. Usos

En la actualidad ésta tiene modestos usos rurales, como cabos de herramientas y como combustible. También contiene saponinas que antiguamente se utilizaban para lavar ropa, y según Ragonese y Milano 1984 2 alcaloides: D- (-) magnocurarina y D- (-) colletina. Informan además que en la Argentina no se reportaron intoxicaciones debido a ellos. (23)

Es usado como combustible localmente. Contiene dos alcaloides cuaternarios benzyltetrahydroisoquinoline: D-magnocurarina (C₁₀H₂₅NO₄) y D-colletina C₂₀H₂₆NO₄: D-(-)-1-(4-metoxibencil)-2,2-dimetil-6-metoxi-7-hidroxi-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline ambas son principios amargos.

Es usado por sus propiedades tónico-amargas y febrífugas Es usado por las mujeres como anti periódico. Además es muy rica en saponinas y por ello es localmente utilizado por las mujeres para lavar la ropa, de donde procede su nombre vulgar. Ornamental, para hacer cercos vivos. La corteza y raíces son ricas en saponina por lo que se usa como jabón. Medicinal como purgante En infusiones se emplea como astringente (antidiarreica) y febrífuga. (23)

➤ “Caléndula” *Caléndula officinalis*

A. Localización

Aparentemente su nombre proviene del latín calends, por la fluoración que presenta al inicio de cada mes. Según los autores alemanes, la primera referencia que no deja lugar a dudas sobre la identidad de la planta parece ser de Santa Hildegarda. (24)

La Caléndula, también comúnmente llamada Maravilla, Boton de oro, entre otros, es una planta que crece espontáneamente en el campo y en diferentes lugares del planeta. Proveniente de la zona mediterránea pero que se extendió muy rápido por el mundo. Pertenece a la familia de las Asteraceae, compuestas. (24)

B. Descripción

Es una planta herbácea, anual, con flores amarillas. Su floración dura casi todo el año, cerrándose de noche y abriéndose al amanecer. Tiene una altura promedio

que oscila entre los 30-50 cm, su tallo es semi-erecto, angular y ramificado y sus hojas son alternas, lanceoladas y sésiles; sus capítulos o inflorescencias van desde los 3cm hasta los 5 cm de ancho, amarillos o anaranjados, con una corona de 15-20 lígulas. Sus frutos son encorvados, provistos casi todos de alas membranosas o púas dorsales. Desprende un olor generalmente desagradable y tiene un gusto amargo. (25)

FIGURA N° 2: *Caléndula officinales*.



Fuente: Ramirez V, Ávila J, Vanegas H, Higuera D, Duarte. K, Toro. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.2014 (26)

Clasificación taxonómica

Reino: plantae

Filo : Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Subfamilia: Asteroideae

Genero: Caléndula

Especie: *Caléndula officinalis*. (19)

C. Sinonimias

Caltha officinalis, *Souci officinal*, *Calendula santamariae*, *Caléndula eriocarpa*, Flamenquilla, Flor de muerto, Maravilla, Copetuda, Virreina, Botón de oro, Corona del rey. (19)

D. Usos

En la medicina popular se usa como como diaforetica, diurética, antiespasmódica, antihelmíntica, emenagoga; además se considera que la flor de caléndula tiene una acción cicatrizante. (15)

➤ PRINCIPALES COMPONENTES QUÍMICOS DE LA CALÉNDULA

Compuestos identificados en plantas de caléndula Porcentajes en base seca

TABLA N°1 : COMPONENTES QUÍMICOS DE LA CALÉNDULA

Componente	Nombre del componente	% De compuesto en la planta Caléndula
1	Saponinas triterpénicas	2-10
2	Terpenos	4,8
3	Flavonoides	0,3-0,8
4	Aceite esencial	0,2
5	Mucilagos	15
6	Carotenoides	0,017-0,078
7	Taninos	10,4
8	Polisacáridos solubles en agua	14,75
9	Péptidos	9,6
10	Hemicelulosa	5,92

Fuente: Pasmiño P. J. Analisis de los métodos de extracción de la flor de caléndula (*Caléndula officinalis*) para productos agroindustriales. 2018. (27)

La estructura, biosíntesis y actividad biológica de las saponinas de la caléndula fueron investigadas por Szakiel y sus colaboradores (2005). La Caléndula contiene en las flores y en los demás órganos de la planta, dos series de compuestos estructuralmente relacionados denominados como saponinas, derivados del 3-O-monoglucósido del ácido oleanólico (glucósidos) y derivados del 3-O-monoglucorónico (glucorónidos) que se diferencian por su biosíntesis, metabolismo y actividad biológica. (28)

Los innumerables estudios constatan que las flores y hojas de la Caléndula presentan un amplio espectro de tipos de compuestos químicos, lo cual está en concordancia con la diversidad de acciones farmacológicas que presenta la planta. Entre los compuestos más investigados dado su interés farmacológico están los carotenoides y los flavonoides. (24)

Otros compuestos de altísima importancia son los triterpenos, compuestos que han sido identificados por diversos investigadores. Dentro de estos se encuentra principalmente

calendulosido. Otros como 3,16,21 trihidroxiursaeno, el ursadiol, los heliantriol A0 B1, B2 y C, el loliolido, el 3,16,28 trihidroxi olean- 12-eno, el 3,16,22 trihidroxi tarax-20-eno, el 3,16,30 trihidroxi tarax-20-eno, también participan en la composición. También se destaca en las flores de Caléndula un aceite esencial, del cual se plantea un rendimiento de 0,2 %. En relación con su composición se determinó la presencia de pedunculatina, a y b ionona, oxido-transcariofileno, carvona, cariofileno, cardinolos, geranil acetona, b-ionona-5,6-epóxido, dihidroactinidiolido, oplopanona, g-mouroleno, a-cardineno, guaiol y torryol. (24)

Por las saponinas, quedaron reportadas con una identificación significativa como aglicón el ácido oleanólico, y que este tiene unido una cadena de azúcar que contiene hexosa y ácido urónico. (24)

Finalmente, se encontraron taninos tipo catecol y pirogallol con un porcentaje alto según Ocio-szynska. Estos se encuentran con un 10,4 % en las flores liguladas. Además de otros compuestos como las coumarinas, los esteroides, los azúcares y las parafinas. Por su parte Chushenhko detectó la presencia de polisacáridos solubles en agua, sustancias pectínicas y hemicelulosas en 14,75; 9,67 y 5,92 % en base seca. (24)

2.2.2 DESCRIPCIÓN DE LAS CEPAS A UTILIZAR

2.2.2.1 *Staphylococcus Aureus*

- **Clasificación científica** *Staphylococcus aureus*

Dominio	: Bacteria
Filo	: Firmicutes
Clase	: Cocci
Orden	: Bacillales
Familia	: Staphylococcaceae
Género	: Staphylococcus
Nombre específico	: <i>Staphylococcus aureus</i> . (29)

- **Descripción**

Staphylococcus aureus es una bacteria anaerobia facultativa, Gram positivo que mide cerca de 1 µg de diámetro, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada. El nombre binominal de esta bacteria proviene de la raíz griega, que se compone de staphylé, que significa racimo y coccus, que significa grano, baya o uva; y del latín aureus que significa dorado. (29)

- **Patogenia**

Staphylococcus aureus tiene a su disposición un amplio arsenal contra las defensas del hospedero. Los mecanismos patógenos de este microorganismo dependen de sus factores adhesivos, las toxinas y enzimas estafilocócicas y sus defensas contra la inmunidad. (29)

- **Virulencia**

Este microorganismo se encuentra como el principal causante de las infecciones nosocomiales. Esta situación se ve favorecida por el hecho de que esta especie habita tanto en las mucosas como en la piel de los seres humanos. (25)

TABLA N° 2: FACTOR DE VIRULENCIA *Staphylococcus aureus*

COMPONENTES ESTRUCTURALES	
FACTOR DE VIRULENCIA	FUNCIÓN
Cápsula	Inhibe quimiotaxis y dificulta la fagocitosis.
Capa de polisacáridos extracelulares	Facilita la adherencia a los cuerpos extraños (como cables de marcapasos, catéteres, etc.
Peptidoglicanos	Evita la lisis celular (estabilizador osmótico). Estimula la producción de pirógeno endógenos. Quimiotaxis leucocitaria provocando abscesos
Ácido teicoico	Media la adherencia del estafilococo a fibronectina, un componente mayoritario del tejido conectivo.
Proteína A	Protección contra la inmunidad humoral. Fija anticuerpos.

Fuente: Hurtado M.P. Revisión de los mecanismos de patogenidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica "*Staphylococcus aureus*" revista soc ven microbiology (venezuela: scielo): Julio 2002. (30)

TABLA N°3: TOXINAS PRESENTES EN *Staphylococcus aureus*

TOXINAS	
Toxinas exfoliativas (ETA, ETB)	Serina proteasas que atacan a la Desmogleína-1. Síndrome de piel escaldada por estafilococo
Enterotoxinas	Produce diarrea por apertura de canales o muerte de enterocitos. Algunas son superantígenos.

Fuente: Hurtado M.P. Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica "*Staphylococcus aureus*" revista soc ven microbiology (venezuela: scielo): Julio 2002. (30)

TABLA N°4: ENZIMAS PRESENTES EN *Staphylococcus aureus*

ENZIMAS	
Coagulasa	Cataliza la conversión de fibrinógeno en fibrina provocando el depósito de <i>Staphylococcus aureus</i> , al estar cubierto por fibrina se vuelve menos inmunógeno
Hialuronidasa	Cataliza la destrucción del ácido hialurónico en el tejido conjuntivo para ayudar a la diseminación del estafilococo.
Fibrinolisisina	Disuelve coágulos de fibrina.
Lipasas	Promueven la hidrólisis de lípidos lo que hace que <i>Staphylococcus aureus</i> se disemine en el tejido cutáneo y subcutáneo
Endonucleasas /DNasas	Hidrólisis de ADN.
β-lactamasa	<i>Staphylococcus aureus</i> posee 3 tipos. Por lo general residen en plásmidos

Fuente: Hurtado M.P. Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica "*Staphylococcus aureus*" revista soc ven microbiology (venezuela: scielo): Julio 2002. (30)

- **Mecanismo de resistencia a los antibióticos**

La producción constitutiva de una gran cantidad de B-lactamasas, por parte de algunas cepas de *Staphylococcus aureus*, le da la capacidad de hidrolizar lentamente a las penicilinas-resistentes. Naturalmente *Staphylococcus aureus* produce una penicilasa estafilocócica, pero ciertos plásmidos ocasionan que exista una hiper-producción de esta enzima que degrada penicilinas naturales y en forma limitada, pero notable, penicilinas semisintéticas (principalmente Oxacilina y Meticilina).

La concentración mínima inhibitoria (CMI) para oxacilina y meticilina en estos estafilococos es 1-2 ug-ml y 2-4 ug-mL, respectivamente. En estas cepas se denominan borderline resistant *Staphylococcus aureus* (BORSA) y la mayoría de estas pertenece al fagogrupo 94/96 y poseen un plásmido de 17,2 Kb común que produce a la β -lactamasa estafilocócica del tipo A. (25)

2.2.2.2 *Escherichia Coli*

- **Clasificación científica** *Escherichia coli*

Dominio	: Bacteria
Filo	: Proteobacterias
Clase	: Gammaproteobacteria
Orden	: Enterobacteriales
Familia	: Enterobacteriaceae
Género	: <i>Escherichia</i>
Nombre específico	: <i>Escherichia coli</i> (25)

- **Descripción**

Escherichia coli es un bacilo anaerobio facultativo que reacciona negativamente a la tinción de Gram, mide de 1-3 μ m que se presenta solo, en pares, cortas cadenas o formando grupos. En general es móvil por flagelos peritricos, aunque existen variantes inmóviles no flagelados, no forma esporas y por lo general es no capsulado y es capaz de fermentar la glucosa y la lactosa. En cultivos jóvenes la forma coco bacilar es bastante frecuente, en los viejos se presentan formas de una dimensión mayor. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se lo considera un microorganismo de flora normal. (29)

- **Patogenia**

Es capaz de ocasionar infecciones intestinales y extraintestinales generalmente severas, debido a que posee componentes de patogenicidad tales como las adhesinas, en especial en los pilis que aglutinan glóbulos rojos y hemolisinas, frecuente en la pielonefritis, por una endotoxina ligada al lípido A, de naturaleza pirógena, y también por citotoxinas que actúan sobre la adenilciclasa, similar al *Vibrio cholerae*. Los componentes de

patogenicidad son proteínas de membrana termoresistentes y no antigénicas, que le confieren a *Escherichia coli* la capacidad de invadir células epiteliales. (29)

- **Virulencia**

Escherichia coli está dividida por sus propiedades virulentas, pudiendo causar diarrea en humanos y otros animales. Otras cepas causan diarreas hemorrágicas por virtud de su agresividad, patogenicidad y toxicidad. En muchos países ya hubo casos de muerte con esta bacteria. Generalmente les pasa a niños entre 1 año y 8 años. Causado generalmente por la contaminación de alimentos, y posterior mala cocción de los mismos, es decir, a temperaturas internas y externas menores de 70°C. (31)

- **Clasificación**

Se distinguen seis cepas según su capacidad patógena (serotipos): *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC2).

I) *Escherichia coli* Enteropatogénica (EPEC)

La EPEC fue la primera cepa identificada serológicamente y es, frecuentemente, la cepa causante de cuadros diarreicos en conejos, perros, caballos y, por supuesto, en humanos, en general en ancianos y en niños menores de 2 años en países en vías de desarrollo. El principal factor de patogenicidad es la adherencia entre la bacteria y membrana de las células del epitelio intestinal. La adherencia está mediada por pilis o fimbrias rizadas que se llaman pilis en forma de bulto. (32)

II) *Escherichia coli* Enterotoxigénica (ETEC)

La ETEC es causante de la diarrea del viajero, ya que se adquiere habitualmente por la ingesta de alimentos o agua contaminados.

Se presenta con cólicos abdominales o deposiciones acuosas en personas de todas las edades pero es una causante importante en diarreas en los lactantes de los países en vías de desarrollo. La ETEC posee pilis o fimbrias que poseen varias formas de antígenos del factor de colonización (CFA) que le permite colonizar la mucosa del intestino delgado sintetizando enterotoxinas llamadas: toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Las toxinas LT y ST aumentan los niveles intracelulares de AMPc y GMPc encontrados

en la membrana de las células intestinales, lo que provoca la salida de iones y de agua. (32)

III) *Escherichia coli* Enteroinvasiva (EIEC)

Es inmóvil, es lactosa y descarboxilasa negativas. Es una de las que causa más daño debido a que invade el epitelio intestinal. La bacteria requiere de mucinas y adhesinas para adherirse a las microvellosidades de la mucosa para poder entrar a la célula por endocitosis, luego se multiplica dentro de la célula y se disemina a las células sanas adyacentes. Causa diarrea sanguinolenta en niños y adultos. Libera el calcio en grandes cantidades impidiendo la solidificación ósea, produciendo artritis y en algunos casos arterioesclerosis. (32)

IV) *Escherichia coli* Enterohemorrágica o Verotoxigénica (EHEC)

La convención internacional de nomenclatura de patógenos ha recomendado el uso de Shiga Toxin *Escherichia coli* (STEC) para este grupo, debido a que estas bacterias producen una toxina citotóxica para células Vero de cultivo de similaridad estructural a la toxina producida por *Shigella dysenteriae*. Las STEC producen verotoxinas que actúan en el colon. Sus síntomas son: primero colitis hemorrágica, luego síndrome urémico hemolítico (lo anterior más infección del riñón, posible entrada en coma y muerte), y por último, púrpura trombocito pénica trombótica (lo de antes más infección del sistema nervioso central). Esta cepa no fermenta el sorbitol y posee un fago, donde se encuentran codificadas las verotoxinas, también llamadas "Toxinas Shiga", no posee una fimbria formadora de mechones, en vez de esto posee una fimbria polar larga que usa para adherencia. (32)

V) *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)

Sólo encontrada en humanos. Son llamadas enteroagregativas porque tienen fimbrias con las que aglutinan células en los cultivos de tejidos. Se unen a la mucosa intestinal causando diarrea acuosa sin fiebre. No son invasivas. Producen hemolisina y una enterotoxina ST similar a la de las enterotoxigénicas. (32)

VI) *Escherichia coli* de Adherencia Difusa (DAEC2)

Se adhiere a la totalidad de la superficie de las células epiteliales y habitualmente causa enfermedad en niños inmunológicamente no desarrollados o malnutridos. No se ha

demostrado que pueda causar diarrea en niños mayores de un año de edad, ni en adultos y ancianos. (32)

2.2.2.3 Mecanismo de resistencia a los antibióticos

La *Escherichia coli* usa mecanismos como producción de enzimas inactivadoras de antibiótico, por ejemplo, las β -lactamasas. Estas se han caracterizado en detalle, sobre todo las β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), las cuales pueden hidrolizar las cefalosporinas de amplio espectro como las de tercera y cuarta generación. Otro mecanismo es la alteración de los sitios de acción del antibiótico, por ejemplo, proteínas de unión a la penicilina (PBP) alteradas y disminución de la concentración antibiótica, ya sea, por impermeabilidad o mecanismos de bombeo hacia el exterior. Algunas veces, modifica con sus girasas de forma que la hacen resistente a la fluoroquinolonas. (25)

2.2.2.4 DESCRIPCIÓN DE LOS FÁRMACOS USADOS COMO PATRÓN COMPARATIVO

De acuerdo a la tabla N°5 se determinó trabajar con los siguientes antimicrobianos clindamicina y ciprofloxacino debido a que presenta susceptibilidad antimicrobiana para *Staphylococcus aureus*. Se escogieron dos antimicrobianos para *Staphylococcus aureus* debido a que clindamicina y el ciprofloxacino son los fármacos de mejor elección y muestra ser efectiva contra la cepa de *Staphylococcus aureus*. (25)

TABLA N°5: SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA PARA *Staphylococcus aureus*

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO EN mm		
		R	I	S
PENICILINAS				
Penicilina	10 unidades	± 28	-	*29
Oxacilina (S. Aureus)	1 µg	± 10	11-12	*13
(Estafilococos coagulasa negativos)	1 µg	± 17	-	*18
GLICOPEPTIDOS				
Vancomicina	30 µg	-	-	*15
Teicoplanina	30 µg	± 10	11-13	*14
AMINOGLUCOSIDOS				
Gentamicina	10 µg	± 12	13-14	*15
FLUOROQUINOLONAS				
Norfloxacin	10 µg	± 12	13-16	*17
Ciprofloxacina	5 µg	± 15	16-20	*21
TETRACICLINA				
Tetraciclina	30 µg	± 14	15-18	*19
MACROLIDOS				
Eritromicina	15 µg	±13	14-22	*23
LINCOSAMIDAS				
Clindamicina	2 µg	± 14	15-20	*21
OTROS				
Cloramfenicol	30 µg	± 12	13-17	*18
Rifampicina	5 µg	± 16	17-19	*20
Nitrofurantoina	300 µg	± 14	15-16	*17
Trimetoprim/sulfametoxazol	1.25/23.75µg	± 10	11-15	*16

Fuente: Ministerio de Salud del Perú. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana. ins.2017. (25)

De acuerdo a la tabla N°6 se determinó trabajar con los siguientes antimicrobianos Amikacina y Ciprofloxacino debido a que presenta susceptibilidad antimicrobiana para *Escherichia coli*.

Se escogieron dos antimicrobianos para *Escherichia coli* debido a que se Amikacina y Ciprofloxacino son fármacos de primera alternativa efectiva contra la cepa de *Escherichia coli*. (25)

TABLA N°6: SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA PARA *Escherichia coli*

ANTIMICROBIANO	CONTENIDO DEL DISCO	DIAMETRO EN mm		
		R	I	S
PENICILINAS				
Ampicilina	10 µg	£ 13	14-16	≥17
CEFALOSPORINAS				
Cefalotina	30 µg	£ 14	15-17	≥18
Cefuroxima axetil (oral)	30 µg	£ 14	15-22	≥23
Cefuroxima sodium (parenteral)	30 µg	£ 14	15-17	≥18
Cefoxitina	30 µg	£ 14	15-17	≥18
Cefotaxima	30 µg	£ 14	15-22	≥23
Ceftriaxona	30 µg	£ 13	14-20	≥21
Ceftazidima	30 µg	£14	15-17	≥18
Cefixima	5 µg	£ 15	16-18	≥19
Cefpirome *	30 µg	£ 14	15-17	≥18
Cefepime	30 µg	£ 14	15-17	≥18
β LACTAMICO/ INHIBIDOR DE BETALACTAMASA				
Ampicilina/Sulbactam	10/10 µg	£ 11	12-14	≥15
Amoxicilina/Acido Clavulánico	20/10 µg	£ 13	14-17	≥18
Cefoperazona/sulbactam +	75 µg/30 µg	£ 15	16-20	≥21
MONOBACTAMS				
Aztreonam	30 µg	£ 15	16-21	≥22
CARBAPENEMS				
Imipenem	10 µg	£ 13	14-15	≥16
Meropenem	10 µg	£ 13	14-15	≥16
AMINOGLUCOSIDOS				
Gentamicina	10 µg	£ 12	13-14	≥15
Amikacina	30 µg	£ 14	15-16	≥17
QUINOLONAS				
Acido nalidixico	30 µg	£ 13	14-18	≥19
Norfloxacin	10 µg	£ 12	13-16	≥17
Ciprofloxacina	5 µg	£ 15	16-20	≥21
Ofloxacina	5 µg	£ 12	13-15	≥16
TETRACICLINA				
Tetraciclina	30 µg	£ 14	15-18	≥19
OTROS				
Cloramfenicol	30 µg	£ 12	13-17	≥18
Trimetoprim/sulfametoxazol	1,25/23,75µg	£ 10	11-15	≥16

Fuente: Ministerio de salud del Peru. Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana.ins.2017. (25)

○ CLINDAMICINA

La Clindamicina es un antibiótico que tiene acción contra gérmenes aerobios Gram positivos (estafilococos, neumococos y estreptococos). Es eficaz contra bacterias anaerobias susceptibles, como *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Actinomyces*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* y *estreptococo microaerofílico*. Los niveles séricos y tisulares que se alcanzan con la Clindamicina, generalmente son superiores a las C.M.I. de los microorganismos sensibles. (33)

- **Mecanismo de Acción**

Aunque se considera que la Clindamicina es bacteriostática, se ha demostrado su acción bactericida contra algunas cepas de *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Bacteroides*.

Actúa inhibiendo la síntesis proteica bacteriana al unirse a la subunidad 50S del ribosoma bacteriano, impidiendo la iniciación de la cadena peptídica. El sitio de unión en el ribosoma es el mismo que para los macrólidos y el cloranfenicol, inhibiendo sus acciones por competencia. Por lo tanto, estos agentes son antagónicos y no deben ser usados concomitantemente. In vitro se ha demostrado que inhiben la producción de toxinas estafilocócicas asociadas al síndrome de shock tóxico y previenen la producción de biofilms. Al alterar las moléculas de superficie, Clindamicina facilita la opsonización, fagocitosis y muerte intracelular de bacterias, incluso en concentraciones sub inhibitorias. La consecuente alteración de la pared bacteriana disminuye la capacidad de adherencia de gérmenes como *Staphylococcus aureus* a las células huésped y facilita su destrucción. La Clindamicina ejerce un efecto post antibiótico duradero, contra algunas bacterias susceptibles, quizá por la persistencia del fármaco en el sitio de unión ribosómica. (33)

- **Espectro Antimicrobiano**

La Clindamicina es activa contra casi todos los anaerobios, muchos de los cocos grampositivos y algunos protozoarios.

- **Anaerobios**

Muestra actividad contra: Casi todos los cocos Gram positivos: especies de *Peptostreptococcus* y *Peptococcus niger*, existiendo cepas resistentes.

Bacilos Gram positivos no esporulados: especies de *Actinomyces*, *Propionibacterium* y *Eubacterium*, *Clostridium* (exceptuando *C. difficile* y un notable porcentaje de algunas especies de *C. perfringens*). Bacilos Gram negativos: *Bacteroides*, *Prevotella*, *Porphyromonas* y especies de *Fusobacterium*. Se han aislado cepas resistentes de *Bacteroides fragilis*. (33)

- **Aerobios**

Cocos Gram positivos: Es activa frente a *Streptococcus*, incluyendo *Streptococcus* beta hemolítico del grupo A (*S. pyogenes*), B (*S. agalactiae*), C y G, *S. bovis*, *Streptococcus*

microaerófilos y casi todas las cepas de *S. pneumoniae* y *S. viridans*. Todos los *Enterococcus* son resistentes. (33)

Además es activa frente a *S. aureus* *meticilinosensible* y *S. epidermidis*, debiéndose comprobar esto mediante el estudio de la sensibilidad. Las cepas de *Staphylococcus* resistentes a metilina suelen serlo también a clindamicina. Bacilos Gram positivos: Es activa frente a *Corynebacterium spp.*, *Nocardia*, *Actinomyces* y *Bacillus anthracis*.

Los bacilos Gram negativos aerobios son resistentes a la acción de la clindamicina, a excepción de *Campylobacter fetus* y algunas cepas de *Haemophilus influenzae*. (33)

- **Farmacocinética**

La Clindamicina se absorbe casi completamente después de una administración oral, alcanzando concentraciones plasmáticas máximas de 2-3 ug/mL en una hora después de una dosis de 150 mg. La presencia de alimento no reduce la absorción significativamente. La vida media de este antibiótico es aproximadamente de 2.7 horas. (33)

El palmitato de Clindamicina tiene una absorción similar al clorhidrato de Clindamicina. Después de varias dosis con un intervalo de 6 horas, se alcanzan concentraciones plasmáticas en los niños de 2 a 4 ug/ml con la administración de 8 a 16 mg/kg. Mientras que la Clindamicina es ampliamente distribuida en muchos líquidos y tejidos, incluyendo hueso, no se distribuye en el líquido cefalorraquídeo aun cuando las meninges están inflamadas. Este medicamento cruza la barrera placentaria. (33)

El antibiótico se une en 90 % a las proteínas séricas. Se acumula en los leucocitos polimorfonucleares y en los macrófagos alveolares; la importancia clínica de este fenómeno es desconocida. Solamente 10 % de la Clindamicina administrada es excretada sin alteración alguna en la orina y pequeñas cantidades en las heces. (33)

- **Efectos Adversos**

- a) **Gastrointestinales:** Dolor abdominal, náuseas, vómito, diarrea y esofagitis con las preparaciones orales.
- b) **Reacciones de hipersensibilidad:** Se ha observado rash maculopapular y urticaria durante la terapia con el fármaco. Las reacciones más frecuentemente reportadas son los rash cutáneos generalizados semejantes a los morbiliformes de leves a moderados. Casos raros de eritema multiforme semejante al síndrome de Stevens-Johnson, han sido asociados con la clindamicina. (33)

- c) **Hígado:** Se ha observado ictericia y anormalidades en las pruebas de funcionamiento hepático durante la terapia con clindamicina. (33)
- d) **Piel y membranas mucosas:** Se ha reportado prurito, vaginitis y casos raros de dermatitis exfoliativa y vesiculobulosa. (33)
- e) **Hematopoyético:** Se ha reportado neutropenia transitoria (leucopenia) y eosinofilia. Se han tenido reportes de agranulocitosis y trombocitopenia. No podría establecerse ninguna relación etiológica directa de la terapia concurrente con clindamicina en nada de lo anterior. (33)

Como la Clindamicina no se difunde adecuadamente dentro del fluido cerebroespinal, el fármaco no debe utilizarse en el tratamiento de meningitis. Se ha demostrado antagonismo entre la Clindamicina y la Eritromicina in vitro. Debido a su posible significancia clínica, estos dos fármacos no deben administrarse conjuntamente. La Clindamicina ha demostrado tener propiedades de bloqueo neuromuscular que pueden mejorar la acción de otros agentes bloqueadores neuromusculares. Por lo tanto, debe utilizarse con precaución en pacientes que reciben dichos agentes. Si la terapia es prolongada, deben realizarse pruebas de funcionamiento hepático y renal. (33)

○ CIPROFLOXACINO

El Ciprofloxacino tiene un amplio espectro antibacteriano bactericida, que incluye a la mayoría de las enterobacterias, causantes no sólo de enfermedades urinarias e intestinales, sino de las bacterias responsables de infecciones prostáticas; así como de infecciones respiratorias tanto de vías respiratorias altas como bajas, incluyendo a pacientes que presentan fibrosis quística; ha demostrado también gran utilidad en tratamientos de infecciones en la piel, hueso y articulaciones, infecciones en ginecología e incluso en el tratamiento de la gonorrea no complicada. Su gran efectividad la logra gracias a su poder contra: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Salmonella*, especies de *Shigella* y *Campylobacter*, *P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis* y *Neisseria gonorrhoeae*; es también efectiva contra estafilococos (incluyendo los resistentes a meticilinas). (33)

Posee alguna actividad inhibidora contra intracelulares como *C. trachomatis*, *Mycoplasma*, *Legionella*, *Brucella* y *Mycobacterium tuberculosis*. El ciprofloxacino tiene actividad moderada contra bacilo y cocos anaerobios, enterococos y neumococos. Puede ser utilizado como profiláctico en pacientes inmunosuprimidos o neutropénicos en los

cuales existe peligro inminente de infección. Uno de los aspectos microbiológicos más importantes de esta quinolona se refiere a que la resistencia bacteriana se desarrolla de manera lenta y, por otro lado, también inhibe a los organismos que poseen betalactamasas y a los organismos resistentes a aminoglucósidos. (33)

- **Mecanismo de Acción**

El Ciprofloxacino actúa inhibiendo la girasa (enzima que conserva la estructura del ácido, DNA bacteriano), logrando con esto destruir el enrollamiento del DNA del cromosoma de la bacteria, evitando así su replicación y alterando el crecimiento bacteriano; esto lo logra con una concentración de 0.1 a 10 microgramos por mililitro. El Ciprofloxacino logra también inhibir eucariotes (bacterias que carecen de DNA girasa y poseen DNA tipo isomerasa), sólo que esto lo logra con concentraciones más altas de 100 a 1,000 microgramos por mililitro. (33)

- **Espectro Antibacteriano**

In vitro e in vivo (aerobios Gram +): *Enterococcus Fecalis*, *Staphylococcus Aureus*, *Staphylococcus Epidermidis*, *Staphylococcus Saprophyticus* Y *Streptococcus Agalactiae*.

In vitro e in vivo (aerobios Gram -): *Citrobacter Freundii*, *Enterobacter Aerogenes*, *Enterobacter Cloacae*, *Escherichia Coli*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Neisseria Gonorrhoeae*, *Proteus Mirabilis*, *Proteus Vulgaris*, *Pseudomonas Aeruginosa* Y *Serratia Marcescens*. (33)

- **Farmacocinética**

Una de las ventajas del Ciprofloxacino, es la de ser un antibiótico que puede ser administrado por vía oral y en casos graves por vía intravenosa. Su viabilidad es aproximadamente de 60 % y la concentración pico en plasma es de 2.4 microgramos por mililitro. Después de una administración oral de 500 mg, 50 % de la dosis es recuperada por orina sin cambios, el resto es recuperada inalterada en las heces y como metabolitos urinarios. El tiempo medio para la eliminación de Ciprofloxacino es de 3 a 4 horas, cuando la función renal es normal y aumenta cuando la función renal está alterada. Su unión con proteínas es sólo de 10 a 15 %. (33)

- **Efectos Adversos**

Los efectos adversos suelen aparecer en vías gastrointestinales y en 2 a 4 % de los pacientes surgen náuseas, vómito o ambos; en 1 a 3 % de los pacientes hay cefalea, mareos y obnubilación.

Pueden presentarse alteraciones como cansancio, irritabilidad, rash incluyendo reacciones de fotosensibilidad; anorexia, taquicardia, migraña, colitis pseudomembranosa, reacciones psicóticas, convulsiones, shock, síndrome de Stevens-Johnson, nefritis intersticial y en casos graves se han presentado necrosis hepática y falla renal pasajera, así como, pérdida del sentido del oído, disminución de la aptitud para conducir o manejar máquinas. Son raras las anormalidades que se presentan en el laboratorio, entre los datos más frecuentes encontrados en este sentido están: eosinofilia, leucopenia, alteraciones en las cifras de la función hepática como la elevación de las bilirrubinas totales. (33)

- **AMIKACINA**

Amikacina es un aminoglucósidos perteneciente al grupo de antibióticos de estructura química compleja que se asemejan en su actividad antimicrobiana, está indicado en el tratamiento de las infecciones del aparato respiratorio bajo, en infecciones del aparato genitourinario, en infecciones de huesos y articulaciones, en infecciones del sistema nervioso central, de piel y tejidos blandos así como infecciones intraabdominales, septicemias, bacteriemias y quemaduras e infecciones postquirúrgicas producidas por bacterias Gram negativas sensibles. (34)

- **Mecanismo de acción**

Los aminoglucósidos inhiben la síntesis proteica bacteriana, su penetración a través de la membrana celular de la bacteria depende en parte de un transporte activo dependiente de oxígeno por un sistema transportador poliamínico y tienen una acción mínima frente a los microorganismos anaerobios, el efecto de los aminoglucósidos es bactericida y es potenciado por los fármacos que interfieren en la síntesis de la pared celular. (34)

- **Espectro antibacteriano**

Los aminoglucósidos son eficaces frente a muchos microorganismos anaerobios gramnegativos y frente a algunos Gram positivos Gram-negativos: Especies de *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, especies de *Proteus* (indol-positivos e indol-negativos),

especies de *Providencia*, especies de *Klebsiella* *Enterobacter Serrana*, especies de *Acinetobacter* (*Mima-Herellea*) y *Citrobacter freundii*. (34)

Gram-positivos: Especies de *Estafilococos* productores y no productores de penicilinas, incluyendo cepas resistentes a la Meticilina. No obstante, la amikacina es poco activa frente a otros Gram-positivos: *Streptococcus pyogenes*, *Enterococos* y *Streptococcus pneumoniae* (*Diplococcus pneumoniae*). (34)

- **Farmacocinética**

No se absorben en el tubo digestivo y habitualmente se administran por vía intramuscular o intravenosa. No atraviesan la barrera hematoencefálica, no penetran en el humor vítreo del ojo ni alcanzan concentraciones elevadas en las secreciones y líquidos corporales, aunque se pueden conseguir concentraciones elevadas en el líquido articular y pleural. La semivida plasmática es de 2-3 horas. Se eliminan casi totalmente por filtración glomerular en el riñón y el 50 %-60 % de la dosis se excreta sin modificaciones en 24 horas. Cuando está alterada la función renal, se acumula rápidamente, con un aumento secundario de los efectos tóxicos. (34)

- **Efectos Adversos**

Amikacina es potencialmente inductor de toxicidad vestibular auditiva y renal y de bloqueo neuromuscular. Raramente se pueden presentar erupción cutánea, fiebre por antibióticos, cefalea, parestesias, náusea y vómito, eosinofilia, artralgia, anemia, hipotensión e hipomagnesemia. (34)

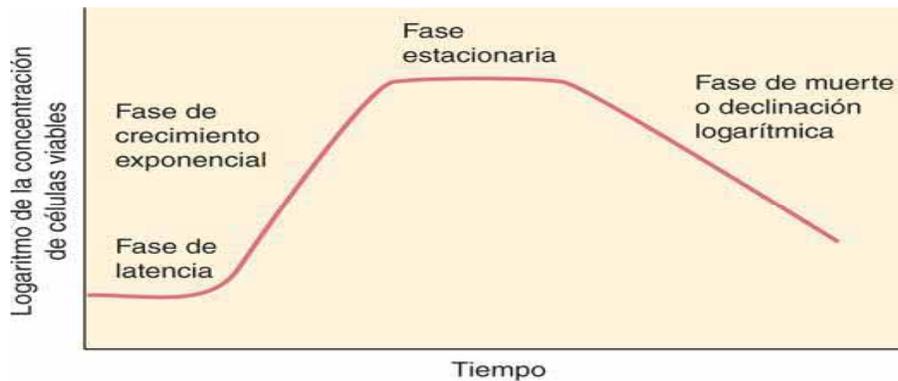
Es potencialmente nefrotóxico, ototóxico y neurotóxico, se debe considerar la posibilidad de bloqueo neuromuscular y parálisis respiratoria cuando se administre junto con agentes anestésicos o bloqueadores neuromusculares. Si esto llegara a ocurrir, se puede administrar sales de calcio para revertir este fenómeno. amikacina no es compatible con aminofilina, anfotericina, clorotiacida, dexametasona, heparina, fenitoína, tetraciclinas, vitaminas B y C, así como cefalosporinas, nitrofuranos y sulfadiacina sódica. (34)

2.2.3 CURVA DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

En un sistema biológico se define al crecimiento como el aumento ordenado de las estructuras y los constituyentes celulares de un organismo. Según ello, el aumento de la masa celular producido por acumulación de productos de reserva (glucógeno, poliβhidroxibutirato) no constituyen crecimiento. Se puede considerar como crecimiento

al incremento de células individuales por un lado, y por otro lado se puede considerar al crecimiento del número de células (proliferación de la población). En lo que se refiere al crecimiento de células individuales, este consiste en el aumento del tamaño y peso de las células que precede a la división celular. Esta división trae aparejada un aumento en el número de células (proliferación de la población). Las bacterias se dividen por fisión binaria, a través de la una cual célula madre al alcanzar un determinado volumen se divide dando dos células hijas. El proceso de fisión binaria consiste en la autoduplicación del material hereditario seguido de la repartición en las dos células hijas, las que se separan por estrangulamiento de la membrana celular y formación de la pared celular. La curva típica de crecimiento se puede describir en términos de cuatro etapas como se muestra en la figura N°3. (35)

FIGURA N°3: CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANO



Fuente: Reproducción y crecimiento microbiano. Proyecto de investigación, 2008.(35)

A. Fase de latencia

Cuando una población bacteriana es inoculada en medio fresco, el crecimiento usualmente no comienza de inmediato sino después de un tiempo llamado de latencia, que puede ser corto o largo dependiendo de las condiciones. La fase de latencia representa un periodo de transición para los microorganismos cuando son transferidos a una nueva condición. En esta fase se producen las enzimas necesarias para que ellos puedan crecer en un nuevo medio ambiente. En esta fase no hay incremento en el número de células, pero hay gran actividad metabólica, aumento en el tamaño individual de las células, en el contenido proteico, ADN y peso seco de las células. Si un cultivo que está creciendo en fase exponencial es inoculado al mismo medio de cultivo bajo las mismas condiciones de crecimiento, no se observa fase de latencia y el crecimiento exponencial sigue a la misma

velocidad. Si el inóculo se toma de un cultivo viejo (fase estacionaria) y se inocula en el mismo medio, generalmente se presenta la fase de latencia esto se debe a que las células generalmente agotan una serie de coenzimas esenciales u otros constituyentes celulares y se requiere cierto tiempo para su resíntesis. También se observa latencia cuando el inóculo está formado por células que han sido dañadas pero no muertas, bien sea por tratamiento con calor, radiaciones o sustancias químicas, puesto que requieren reparar dicho daño. En el caso de que una población se transfiera de un medio de cultivo rico a un medio pobre, se observa latencia puesto que es necesario que las células para poder seguir creciendo tengan una serie de enzimas para poder sintetizar algunos metabolitos esenciales que no están presentes en el medio. (35)

B. Fase exponencial o fase logarítmica

Es el período de la curva de crecimiento en el cual el microorganismo crece exponencialmente, es decir que cada vez que pasa un tiempo de generación la población se duplica. Bajo condiciones apropiadas la velocidad de crecimiento es máxima. Las condiciones ambientales (temperatura, composición del medio de cultivo, etc.) afectan a la velocidad de crecimiento exponencial. (35)

C. Fase estacionaria

En cultivos en recipientes cerrados una población no puede crecer indefinidamente en forma exponencial. Las limitaciones del crecimiento ocurren ya sea por agotamiento de algún nutriente esencial, por acumulación de productos tóxicos, porque se alcance un número de células elevado para el espacio disponible o por una combinación de las causas anteriores. Este periodo durante el cual cesa el crecimiento se conoce como fase estacionaria. (35)

D. Fase de muerte

Si la incubación continúa después de que una población microbiana alcanza la fase estacionaria, las células pueden seguir vivas y continuar metabolizando, pero va a comenzar una disminución progresiva en el número de células viables y cuando esto ocurre se dice que la población ha entrado en fase de muerte. (35)

2.2.4 MÉTODOS BÁSICOS PARA EL ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA

A. Métodos de difusión

- **Método del antibiograma disco-placa**

El antibiograma disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores es uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El antibiograma disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con los diferentes antibióticos. Tan pronto el disco impregnado de antibiótico se pone en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el antibiótico difunde al agar. El antibiótico difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. (36)

- **Método del Epsilon test**

El principio de este método es una expansión de la técnica de difusión en disco. En el método E-test (AB Biodisk, Suecia) podemos, mediante lectura directa, determinar la concentración inhibitoria mínima (CMI). Consiste en una tira de plástico no poroso de 6 cm de largo por 5 mm de ancho que incorpora un gradiente predefinido de antimicrobiano equivalente a 15 diluciones. El protocolo para preparar el inóculo es el mismo que para la difusión en disco. Siguiendo el método de difusión, una vez inoculado la placa de agar con el microorganismo, se coloca la tira de Etest sobre su superficie, produciéndose de forma inmediata una difusión del antibiótico desde el soporte hasta el agar, creándose de este modo a lo largo de la tira un gradiente exponencial de las concentraciones del antimicrobiano. Tras la incubación de las placas, se puede observar una zona de inhibición elipsoidal y simétrica. Después de la incubación la CMI será el valor obtenido en el punto en el que el extremo de inhibición intersecciona con la tira. (36)

B. Métodos de dilución

Estos métodos se basan en la determinación del crecimiento del microorganismo en presencia de concentraciones crecientes del antimicrobiano, que se encuentra diluido en el medio de cultivo (caldo o agar). (36)

- **Dilución en agar**

En estos métodos se incorpora el antimicrobiano a evaluar a un medio con agar. El antimicrobiano se añade cuando el medio aún está fundido. Para lograr el rango de dilución deseado se prepara una serie de placas, cada una con una determinada concentración de antimicrobiano. Las placas se inoculan con un replicador una vez que se haya solidificado el medio de cultivo. El número de placas de cada concentración a preparar vendrá dado por el número de microorganismos que se vaya a estudiar, teniendo en cuenta que la mayoría de los replicadores permiten inocular entre 32 y 36 organismos. (36)

- **Dilución en caldo**

El NCCLS recomienda para la mayoría de los microorganismos utilizar caldo Mueller-Hinton, al que se añadirán los suplementos necesarios para asegurar el crecimiento de organismos exigentes. El medio debe tener un pH de 7.2 a 7.4 y estar ajustado con Ca^{2+} (20-25 mg/l) y Mg^{2+} (10-12.5 mg/L). Esta cantidad de iones divalentes asegura la reproducibilidad de los valores de CMI de aminoglucósidos frente a *P. aeruginosa* y de tetraciclinas frente a la gran mayoría de microorganismos, al compararlos con los que se obtienen con agar Mueller-Hinton. (36)

- **Método de macrodilución**

Se emplea por cada combinación microorganismo/antimicrobiano una batería de tubos. Habitualmente se prepara la batería de tubos con 1 mL de medio estéril sin antimicrobiano. Al primero de ellos se añade 1 mL de la solución inicial del tubo de antimicrobiano hasta conseguir la concentración más alta a estudiar (teniendo en cuenta que este primer paso supone la dilución a la mitad de la solución madre, y que una vez inoculados los tubos, con 1 mL de inóculo, se diluirá nuevamente la concentración de antimicrobiano a la mitad). Tras mezclar adecuadamente, se pasa 1 mL al siguiente tubo; el proceso se repite tantas veces como diluciones se quieran estudiar, eliminando del último tubo de la serie 1 mL de medio con antimicrobiano, con objeto de mantener el volumen final de 1 mL.

Para cada paso de dilución se debe emplear una pipeta diferente. La serie de tubos se completa con uno de control sin antimicrobiano que solamente tiene 1 mL de caldo. (36)

○ **Método de microdilución**

En el método de microdilución cada una de los pocillos de la placa de microtitulación con pocillos de fondo en “U” representa uno de los tubos del método de macrodilución. Las placas de microdilución con diferentes concentraciones de antimicrobianos se pueden preparar en el propio laboratorio o bien se pueden comprar a diferentes compañías que los suministran congelados, deshidratados o liofilizados. (36)

2.2.5 GENERALIDADES DE LA PIEL

En 2006, Llerena y Alvis, sostienen que la piel es un órgano sensorial propio, que recibe y conduce diversos estímulos, razón por la que desempeña funciones de receptor y emisor de impulsos. El grosor de la piel varía por diferentes variables como las condiciones climáticas y según la región corporal de cada individuo; es así como la máxima delgadez se presenta en los párpados (0,2-0,6 mm) y el mayor grosor en la parte interna de la mano (palma) y planta de los pies (2-4 mm). (37)

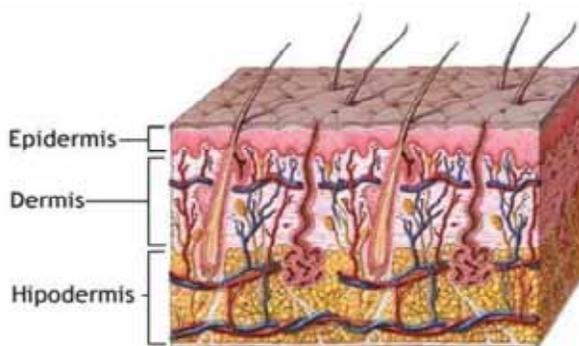
Según Badia y Garcia (2012) mencionan que la piel tiene un pH comprendido entre 5 y 6, cuyo valor debe mantenerse a fin de evitar daños. Además, en aquellos cosméticos cuyo pH sea parecido al de la piel, serán menos agresivos.

La piel es la parte más extensa que recubre toda la superficie corporal incluyendo los orificios de las mucosas. Así la superficie de la piel fluctúa entre 1,5 y 2m² y su grosor varía entre 1,5 y 4 mm. (37)

Está conformado por tres capas como se aprecia en la figura N°4 que son:

- Epidermis
- Dermis
- Tejido celular subcutáneo

FIGURA N°4: CAPAS DE LA PIEL



Fuente: Aguilar, Mello Castellanos y Campo, 2016. (38)

Por su parte, según Buenaventura (2008) menciona que la epidermis representa la capa epitelial derivada de la capa germinal epidérmica del embrión, por su parte la dermis, es más profunda compuesta por una capa de tejido conjuntivo relativamente denso y vascular. Bajo la dermis se halla una capa subcutánea, laxa y alta en grasa y tejido areolar denominada hipodermis, su contenido graso depende del estado de nutrición la cual puede llegar hasta los 10 cm. (38)

2.2.6 PRODUCTO DE HIGIENE

Se definen como aquellas sustancias o formulaciones destinadas a ser puestas en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios, órganos genitales externos, dientes y mucosas bucales) con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, ayudar a modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales. Los productos de higiene se clasifican de la siguiente manera:

1. **Según la parte del cuerpo donde se apliquen:** Área de los ojos, piel, rostro y cuerpo, labios, cosméticos capilares, Uñas y zonas de depilación.
2. **Según su función higiénica:** Desodorantes y antitranspirantes, Productos para antes y después del afeitado, productos para higiene bucal y dental, cosméticos de perfumería.
3. **Según sean utilizados para el cuidado, mantenimiento o cambio corporal:** Para el bronceado, protección solar, autobronceadores y tintes de cabello. (39)

2.2.7 PRODUCTO NATURAL DE HIGIENE

Es aquel producto que reúne las siguientes condiciones: un mínimo del 95% del total de los ingredientes (incluyendo el agua) es natural o de origen natural. Como máximo el 5%

restante pueden ser ingredientes de síntesis, que forman parte de una corta lista restrictiva que incluye algunos conservantes y sustancias auxiliares. Como mínimo el 5% del total de los ingredientes procede de agricultura biológica, que representa como mínimo el 50% de los ingredientes vegetales. (40)

2.2.7.1 JABONES

Jabón, agente limpiador o detergente que se fabrica utilizando grasas animales y/o aceites vegetales. Químicamente, es la sal de sodio o potasio de un ácido graso que se forma por la reacción de grasas y aceites con álcali. (41)

El jabón es un producto básico de pH entre 7.5 a 9. La característica más importante del jabón. Reside en la acción limpiadora radica en la facultad que tiene la parte hidrocarbonada de la molécula de jabón de “disolverse” en gotitas de grasa o mugre, insolubles en agua. Simultáneamente la del grupo -COO^- (carboxilato) de solubilizar en agua el conglomerado de grasas, mediante la solvatación de dichos iones carboxilato. (42)

2.2.7.1.1 CARACTERÍSTICAS DEL JABÓN

Por su parte, Zegpi (2010), sostiene que los componentes activos de un jabón están constituidos por sales de varios ácidos grasos de origen animal o vegetal. Debido a sus propiedades intrínsecas forman micelas que atrapan gotas de grasa permitiendo su remoción de la superficie cutánea. El agua contiene componentes especiales que generan sales tras el contacto de los ácidos grasos que contienen los jabones comunes que no son fáciles de remover permaneciendo en la piel con un probable efecto irritante al pH entre 9 y 10 que habitualmente poseen los jabones comunes y que contrastan con el pH fisiológico de la piel que va de 5 a 6. (40)

2.2.7.1.2 PROPIEDADES Y USOS

Los jabones son solubles en alcohol, insolubles en éter y benceno. Los potásicos son más solubles que los jabones sódicos; estos a su vez absorben más humedad del aire que los sódico, por eso es muy importante tener en cuenta el comportamiento del jabón respecto al agua pues en ello se basa su uso como agente de limpieza.

El jabón que se produce con grasas y aceites naturales tiene la propiedad de ser biodegradable. (31)

2.2.7.1.3 JABÓN LÍQUIDO

Son jabones blandos disueltos en agua, alcohol, glicerina o mezcla de estas sustancias, adicionados o no con esencias que les den olor agradable.

2.2.7.1.3.1 CLASIFICACIÓN

Entre este tipo de jabones se puede diferenciar 3 tipos básicos: naturales, semisintéticos y sintéticos:

- **Los jabones líquidos naturales:** Basan su composición en mezclas de ácidos grasos de aceites vegetales, como coco y/o palma, a los que se les añade pequeñas cantidades de ácido oleico o ácidos grasos insaturados provenientes de aceites de girasol, soya, u otros. Estos últimos son ricos en glicéridos de ácido oleico. La mezcla se neutraliza generalmente con hidróxido de potasio. No se usa hidróxido de sodio ya que el álcali de potasio genera sales más solubles que las de sodio. Los jabones líquidos naturales tienen el inconveniente de tener limitada solubilidad en aguas duras y un valor de pH muy alto (9-10) para mantenerse estables. El uso continuo de estos jabones ocasiona sequedad e irritación en la piel. (43)
- **Los jabones líquidos semisintéticos:** Son mezclas de surfactantes con ácido oleico neutralizados con una amina orgánica como la monoetanolamina. El oleato de monoetanolamina (oleato de etanolamonio) es muy soluble en agua y da sensación de tesura en la piel. (43)
- **Los jabones líquidos sintéticos:** Están basados en mezclas de surfactantes y agentes espumantes, la mayoría de ellos contienen ligeras fragancias y usualmente otros ingredientes para el cuidado de la piel. Son compatibles con todo tipo de agua y usualmente tienen excelentes propiedades limpiadoras y generan alta espuma aún en agua muy dura. Además, dejan la piel tersa y libre de irritación. (43)

2.2.7.1.3.2 FACTORES QUE DETERMINAN LA CALIDAD DEL JABÓN

Aditivos Son materiales destinados a formar parte del jabón final como elementos de relleno o como elementos que conceden propiedades particulares a los jabones tales como: mayor duración, mejor consistencia o mejores aromas. Algunos de estos son:

- Colorantes y perfumes: Su objetivo es mejorar las características de presentación externas del producto comercial.

- Ácidos grasos: Los ácidos grasos que se encuentran en la naturaleza son compuestos alifáticos monobásicos, que constan por lo general de un solo grupo carboxilo, situado en el extremo de una cadena carbonada lineal.
- El pH: Es importante mantener el pH del jabón constante ya que si es demasiado ácido o básico no será adecuado para fines domésticos. El pH debe ser de 5.5 y 8.0 para uso doméstico. Sin embargo, el pH puede variar de acuerdo a la aplicación que deba darse al jabón, en jabón de tocador un pH 7 es adecuado ya que al ser mezclado con el agua disminuye su alcalinidad para así causar los efectos de neutralidad en su uso. (40)

2.2.7.1.3.3 CALIDAD DEL JABÓN

Las propiedades que deben tener los jabones para considerarse un producto de buena calidad, incluyen entre otras:

- Fisicoquímicas
- Organolépticas
- Microbiológicas
- Textura
- Solubilidad
- Formación de espuma

2.2.7.1.3.4 PROPIEDADES FÍSICAS DE LOS JABONES

Los jabones líquidos poseen ciertas características fundamentales relacionadas con su forma y estructura, entre ellas la viscosidad y la generación de espuma. (40)

➤ Viscosidad del jabón líquido

La viscosidad está referida a un aspecto físico que tienen los líquidos o fluidos. La viscosidad es la firmeza que ejercen las moléculas que componen un líquido para separarse entre ellas, es decir es la oposición de un determinado fluido a deformarse en razón de las fuerzas de adherencia que existe entre unas moléculas del líquido con respecto a otras moléculas del mismo. (44)

En cuanto a los jabones líquidos, es importante la característica de su viscosidad dinámica, la cual se especifica como la propiedad de resistencia a fluir de los fluidos o líquidos, debido al rozamiento existente entre sus moléculas. En el sistema Internacional, la viscosidad dinámica se mide en Pascales segundo; sin

embargo, la unidad comúnmente utilizada es el centipoise (cps), equivalente a 1 mP s. (45)

➤ **Espuma**

Se define como un conjunto de burbujas que se topan en contacto extremadamente cercano. La espuma representa una de las características físicas más visibles al utilizar un jabón, sin embargo, su presencia o volumen no tiene nada que ver con la eficacia del jabón, por lo que la espuma no desempeña un factor clave en la acción limpiadora. Sin embargo, las personas consideran importante su presencia al utilizar un jabón, por lo que al elaborar jabones se considera la estabilidad de la espuma. (46)

Es importante que la espuma del jabón se reduzca a más del 50% en un lapso de 30 segundos, ya que un tiempo de secado prolongado puede reducir la velocidad del lavado de las manos al tener que utilizarse mayor cantidad de tiempo para eliminar la espuma. (47)

➤ **Test de irritabilidad**

De acuerdo con Meza y Vargas (2013), la irritación cutánea es un fenómeno de origen inflamatorio, definido como una agresión a la piel, la cual presenta lesiones en la epidermis y/o aparición de una reacción inflamatoria a nivel de la dermis, generando signos visibles entre los cuales, principalmente destacan: eritemas y edemas. (48)

Según Menéndez et al, (2007), la reacción alérgica es una de las causas que puede producir irritación cutánea en la aplicación de productos cosméticos para lo cual es necesaria la evaluación y control de los componentes químicos o naturales de los productos cosméticos y así garantizar los efectos esperados de su uso tópico. (49)

2.2.7.1.3.5 ELEMENTO PRINCIPAL DEL JABÓN

El elemento principal en la formulación del jabón es el agente limpiador, también conocido como surfactante (tensioactivo) y se clasifican en cuatro categorías:

a. Surfactante Aniónicos

Estos surfactantes contienen generalmente uno de cuatro grupos polares solubles, carboxilato, sulfonato, sulfato o fosfato, combinado con una cadena hidrocarbonada hidrófoba. Si esa cadena es corta son muy hidrosolubles, y en caso contrario tendrán baja

hidrosolubilidad y actuaran en sistemas no acuosos como aceites lubricantes. A este tipo pertenecen los surfactantes de mayor producción: detergentes como alquilbencenosulfonatos, jabones o sales de ácido. (50)

b. Surfactante Catiónico

Estos comúnmente utilizados en detergentes, agentes limpiadores, líquidos lavaplatos y cosméticos están compuestos por una molécula lipofílica y otra hidrofílica, consistente de uno o varios grupos amino terciarios o cuaternarios. Su principal aplicación está en el tratamiento de textiles y ocasionalmente como suavizantes tipo rinse. Debido a su capacidad para adsorber sobre fibras o cabello, los inicialmente mencionados sirven como acondicionadores para el cabello. (50)

c. Surfactante No-iónicos

En contraste a sus contrapartes iónicas, los surfactantes no iónicos no se disocian en iones hidratados en medios acuosos. Las propiedades hidrofílicas son provistas por hidratación de grupos amida, amino, éter o hidroxilo. Cuando existe un número suficiente de estos grupos la solubilidad acuosa es comparable con la de los surfactantes iónicos. Las aplicaciones son extensas y dependen de la cantidad de grupos polares presentes, que determinaran la solubilidad tanto en el agua como en aceite. Una gran parte de estos surfactantes son alcoholes o fenoles etoxilados (lavaplatos, shampoo). Ciertos derivados del sorbitol producen surfactantes no- tóxicos para uso farmacéutico o alimenticio. (50)

d. Surfactante Anfotéricos

Productos que según el pH de la solución pueden presentar tanto cargas positivas como negativas, al mismo tiempo. Como por ejemplo los aminoácidos, las betaínas o los fosfolípidos. Según el pH del medio una de las dos disociaciones prevalece. Este tipo de surfactante se usa solo en casos particulares debido a su alto costo. (50)

El término surfactante es una contracción de la expresión agente activo de superficie (Surface- active agent) y fue creado por la corporación GAF. Todos los shampoos, con la excepción de algunos especializados, contienen un surfactante ya que este es necesario para la formación de la espuma, además de ser agente limpiador. Estas moléculas están formadas fundamentalmente por dos partes, una de las cuales es atraída por las grasas/ aceites (lipofílica) y otra que es atraída por el agua (hidrofílica). Esta

propiedad es la que permite que el agua y el aceite/ grasas, lleguen a estar íntimamente mezclados. (50)

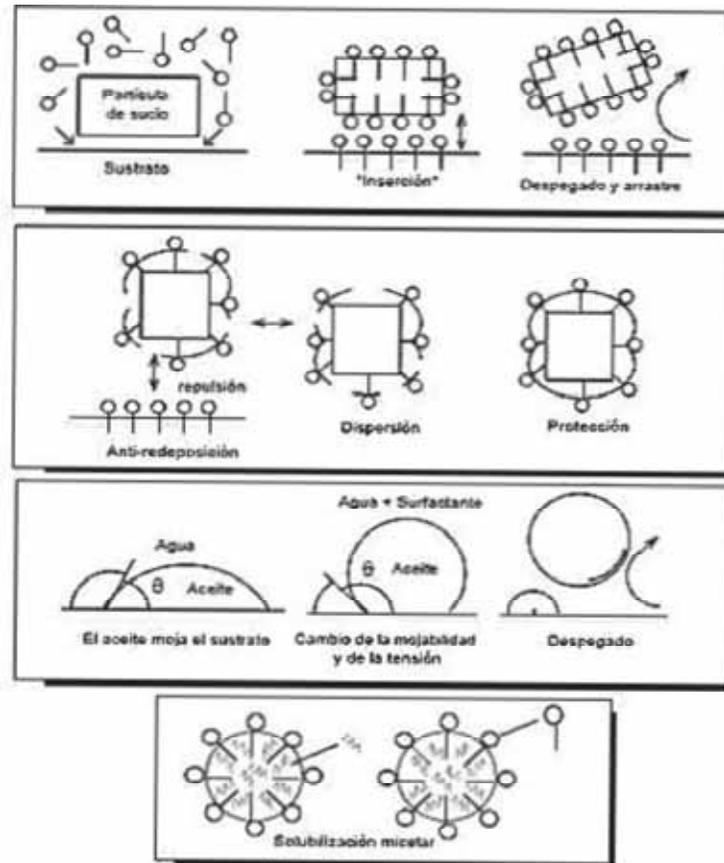
2.2.7.1.3.6 MECANISMO DE DETERGENCIA

Es la propiedad más característica de los tensoactivos aniónicos y una consecuencia de sus excelentes caracteres globales de superficie: la mayoría de los términos resultan incluso en exceso desengrasantes para usos personales y deben formularse adicionados de materiales emolientes. (51)

Esta acción se basa sobre la teoría DLVO (Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek) y las teorías subsecuentes que describen el balance de fuerzas atractivas y repulsivas entre dos partículas sólidas. Hay evidentemente muchos casos, dependiendo de si el sucio y el sustrato son de la misma naturaleza o de naturaleza diferente. Sin embargo, todos se basan en el mismo principio: el detergente produce el despegado del sucio. (51)

Es necesario también, un poco de energía mecánica para terminar de arrancar la partícula de sucio y llevarla lejos de su posición inicial. Esta energía mecánica se introduce en forma de agitación. Una vez la partícula separada del sustrato, hay que evitar que se aglutine con otras partículas o que se pegue de nuevo al sustrato como se observa en la figura N°5. (51)

FIGURA N° 5: ESQUEMA DEL MECANISMO DE DETERGENCIA.



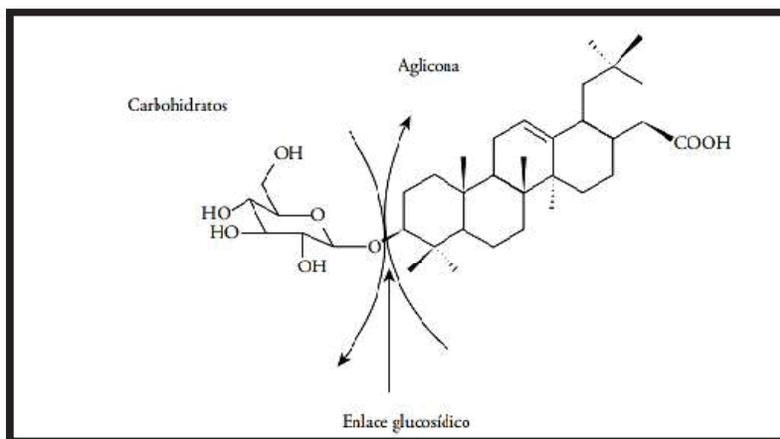
Fuente: Gomez Antón M. Síntesis de detergentes. En "Detergentes". Universidad Nacional a Distancia. Madrid, España; 1996. (9)

2.2.7.1.4 LA SAPONINA, COMPOSICIÓN Y EMPLEO

Las saponinas son glucósidos en los cuales varias de unidades de monosacáridos se enlazan mediante un enlace glicosídico a un resto denominado aglicón. El aglicón puede ser de naturaleza triterpénica o esteroidal y en función de esto las saponinas se clasifican en saponinas triterpénicas y saponinas esteroidales respectivamente. (52)

Estructuralmente constituidos por un anillo terpenoide o esteroidal, conocidos como aglicona o sapogenina, sustituidos por oligosacáridos a través de enlaces glicosídicos que les confieren un carácter anfifílico. De acuerdo con el número de sustituciones, se pueden encontrar agliconas mono, di o triglicosiladas también denominadas mono, di o tridesmosídicas. Como se observa en la figura N°6. Las monodesmosídicas tienen un oligosacárido unido al C-3; las bidesmosídicas tienen dos cadenas de carbohidratos, uno de ellos unido mediante un enlace éter al C-3. (52)

FIGURA N°6: ESTRUCTURA GENERAL DE UNA SAPONINA



Fuente: Fontan CJ. Las saponinas y la botánica. Informe de investigación. Madrid, 2014. (52)

Las saponinas no resisten cambios bruscos de pH, valores muy ácidos o básicos generan la ruptura de los enlaces O-glucosídicos. Esta característica es útil y empleada en metodologías para su cuantificación y elucidación estructural. Con respecto a su estabilidad térmica, las saponinas resisten temperaturas superiores a 150 °C e inferiores a 400 °C, temperatura a la cual se inicia el proceso de carbonización de la molécula, posibilitando la implementación de procesos de extracción convencionales que usualmente son favorecidos por el uso de calor. Las saponinas ofrecen también una alta actividad superficial debido a la combinación estructural de un grupo polar (azúcar) y uno no polar (esteroide o triterpeno), propiedad que permite su uso como un detergente natural, agente estabilizante y emulsificador en productos de limpieza y cosméticos. (52)

Se encuentran presentes en algunos vegetales. Capaces de formar espuma cuando se agita en agua, como el jabón, pues tienen propiedades 3 semejantes a este: cada molécula constituida por un elemento soluble en lípidos y otro soluble en agua. (52)

Estos principios activos estén relacionados con las esterinas vegetales, su característica principal es la de contener muchos grupos hidroxilos y uniones de tipo éter y lactónicas. La mayoría se ajustan a la fórmula general $C_nH_{2n-8}O_{10}$. Tienen sabor amargo, y son capaces de producir la hemólisis de los eritrocitos in vitro. Los contenidos varían del 0.1% al 5%. Por hidrólisis de las saponinas se obtienen carbohidratos y una aglicona, llamada genéricamente sapogenina, la cual puede tener un esqueleto esteroidal de tipo colano como la esmilagenina; de terpeno tipo amirina como la chichipegenina; tipo u-amiarina como el ácido asiático; tipo lupeol como la estallogenina o tetracíclico como el

panaxadiol, con la excepción de la criptogenina. Las saponinas forman micelas y cambian la tensión superficial de los líquidos. Su tamaño molecular se encuentra entre los 600 Da y los 2700 Da, pero cuando forman micelas pueden llegar a tener un peso molecular entre 70 y 150 KDa. Se ven afectas al pH de la solución, ya que a altos pH sufren hidrólisis, formándose saponinas de menor peso molecular. Se conocen dos tipos generales: esteroides como la digitonina y triterpenoide como la aesculina (presente en las semillas de falso casta). La digitonina de las semillas de la digital es una saponina típica. Con la colesteroína (un 3B - hidroxisteroide) forma un compuesto de adición de muy baja solubilidad a lo cual puede atribuirse la inhibición de su acción hemolítica. La digitonina es un glucósido formado por un pentasacárido y el esteroide digitogenina. Las agliconas triterpenoides estén bien representadas por el ácido queretárico. (52)

2.2.7.1.4.1 IDENTIFICACIÓN DE LA PRESENCIA DE SAPONINA

Para la identificación de saponinas se emplea un screening fitoquímico por el método de Cain-Bohmann modificado obteniéndose presencia de buena cantidad de saponinas, las cuales son identificadas como saponinas triterpenoides utilizando pruebas cualitativas como son: prueba de la espuma, reacción con el reactivo de Salkowski y con el reactivo de Liebermann - Bouchard. Una de las principales propiedades de las saponinas son la solubilidad en alcohol absoluto y otros solventes orgánicos, las soluciones adquieren una coloración blanca a ligeramente parda. El reactivo de Liebermann-Burchard se prepara midiendo el volumen necesario de ácido sulfhídrico, calidad analítica y colocándolo en un frasco de Erlenmeyer, se coloca algunos minutos en un freezer, y luego se agrega lentamente el volumen de anhídrido acético necesario, calidad analítica agitando continuamente. Es de destacar que si los reactivos se mezclan al revés, se forman compuestos de color amarillo que puede llegar a ser intenso si no se enfría adecuadamente. Probablemente ocurre una reacción de deshidratación, formando grupos metilenos no saturados que dan productos de condensación coloreados con los aldehídos. Los triterpenos dan un color rojo y los esteroides color verde con la mezcla de anhídrido acético y ácido sulfhídrico, lo cual permite diferenciar las saponinas triterpénicas de las esteroidales. La formación de compuestos coloreados entre las agliconas triterpénicas y vainillina disuelta en ácido perclórico concentrado. (53)

2.2.7.1.4.2 IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DE LA SAPONINA

a) ENSAYO DE ESPUMA

Las saponinas tienen la propiedad de disminuir la tensión superficial del agua, por lo que sus soluciones acuosas producen espuma, de manera similar al jabón. (54)

b) ENSAYO DE HEMOLISIS

El término hemólisis se refiere al fenómeno de ruptura o lisis de membrana del eritrocito que provoca la liberación de la hemoglobina. Como consecuencia, se produce anemia y hemoglobinuria. (55)

Las saponinas han demostrado *in vitro* tener un efecto hemolizante. Propiedad que se atribuye a su interacción con los esteroides de la membrana eritrocitaria, que induce un aumento de la permeabilidad de la membrana y un movimiento de iones: el sodio y el agua ingresan, el potasio sale, la membrana explota, permitiendo de este modo la salida de la hemoglobina. (55)

c) LIEBERMANN-BURCHARD (triterpenos y/o esteroides)

Ocurre una deshidratación con formación de un doble enlace conjugado a un segundo doble enlace, lo que da un producto coloreado. (54)

d) SALKOWSKI (triterpenos y/o esteroides)

Prueba para identificación de esteroides, es positiva cuando hay un cambio de coloración hacia amarillo o rojo; cuando hay presencia de esteroides insaturados se forma un anillo de color rojo. (55)

2.2.7.1.4.3 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

A las saponinas también se les ha reportado actividad antibacteriana. Tres extractos de 5 β -espirostan-3 β -ol saponina mostraron tener actividad antimicrobiana sobre organismos tanto en eucariotas como procariotas, pero solamente cuando hay una baja densidad celular (Sparg et al., 2004). En un estudio realizado por Konishi y cols. Se aislaron tres nuevas saponinas triterpenoides, Nudicaucins A, B y C y una saponina conocida guaiacin D, aisladas de *Hedyotis nudicaulis* Wight & Arn. (Rubiaceae) que fueron probados contra *Bacillus subtilis*. Las cuatro saponinas aisladas mostraron actividad antibacteriana débil. Los resultados indicaron que las saponinas tetraglicosídicas tienen una mayor actividad que las saponinas triglicosídicas (Sparg et al., 2004). (55)

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES BIOLÓGICOS

3.1.1 MUESTRA VEGETAL

- Se utilizó los tallos de la especie vegetal “Roque”. *Colletia spinosissima*. Siendo la localidad de Ocongate (3942 msnm), provincia de Quispicanchis, ubicada al sur de este departamento Cusco la zona de recolección de la muestra vegetal.
- Se utilizó las flores de la especie vegetal “Caléndula”, *Caléndula officinalis*. Siendo la localidad de Ocongate (3788 msnm), provincia de Quispicanchis, ubicada al sur de este departamento Cusco la zona de recolección de la muestra vegetal.

3.1.2 MUESTRA MICROBIANA

- Cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- Cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218.

3.2 MATERIALES E INSTRUMENTOS

3.2.1 MATERIALES DE CAMPO

- Bolsas de polietileno transparentes
- Bolsas de papel kraft
- Cámara fotográfica
- Cuaderno de campo
- Cúter
- Tijeras
- Guantes
- Lapiceros
- Plumones marcadores
- Tijeras podadoras

3.2.2 MATERIALES DE LABORATORIO

- Baguetas
- Botellas de color ámbar
- Embudos
- Fiolas de 50,100,y 250 mL

- Goteros de 10 mL
- Matraz de 250 mL
- Placas Petri
- Probetas de 50,100,y 500 mL
- Tubos de ensayo 5,10 y 20 mL
- Tubos de ensayo de 20 mL con tapa rosca
- Vaso de precipitados 50,100,250 y 500 mL
- Aguja y asa de siembra
- Calibrador digital
- Cintas medidoras de pH
- Gradillas
- Mechero bunsen
- Micropipeta de 5 a 100 uL
- Micropipeta de 100 a 1000 uL
- Micropipeta de 100 a 2000 uL
- Mortero
- Papel filtro
- Pinzas
- Pissetas
- Soporte universal
- Termómetro digital
- Vernier

3.2.3 EQUIPOS DE LABORATORIO

- Autoclave PHOENIX MOD :AVPLUS,vertical de 75 litros
- Agitador VORTEX VELP SCIENTIFICA MOD: WIZART IR
- Balanza analítica AND MOD: GR-200, CON UNA CAPACIDAD DE 210 g. resolución de 0.1 mg y sensibilidad de 1 mg.
- Baño Maria JSWB
- Destilador de agua
- Estufa eléctrica
- Incubadora
- Refrigeradora

3.2.4 SOLVENTES Y REACTIVOS

- Cloroformo Q.P. al 99 %
- Reactivo de fehling A y B
- Reactivo de shinoda
- Reactivo de dragendorff
- Reactivo de bajlet
- Limaduras de magnesio
- Agua destilada
- Cloruro férrico al 1 %
- Limaduras de magnesio
- Metanol
- Poli etilenglicol
- Éter etílico Q.P.
- N-Hexano QP
- Hidróxido de sodio
- Etanol 70° y 96°

3.2.5 INSUMOS PARA ELABORACIÓN DE JABÓN LÍQUIDO DE *Colletia spinosissima* “ROQUE”

- Deiton
- Lauril sulfato
- Coperland
- EDTA
- Glicerina
- Parabenos
- Ácido cítrico
- Cloruro de sodio
- Extracto etanólico de *Colletia spinosissima* “Roque”
- Agua purificada

3.2.6 INSUMOS PARA ELABORACIÓN DE JABÓN LÍQUIDO DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA”

- Deiton
- Lauril sulfato

- Coperland
- EDTA
- Glicerina
- Parabenos
- Ácido cítrico
- Cloruro de sodio
- Extracto etanólico de *Caléndula officinalis* “Caléndula”
- Agua purificada

3.2.7 JABÓN LÍQUIDO PATRÓN

- Jabón líquido antibacterial comercial.

3.2.8 MEDIOS DE CULTIVO

- Agar Mueller Hinton
- Agar Trypticosa Soya
- Caldo Brain Heart Infusión(BHI)
- Agar Mc Conkey
- Agar SS
- Agar Sabouraud

3.2.9 FÁRMACOS EMPLEADOS COMO PATRÓN (DISCOS DE SENSIBILIDAD)

Para Cepa de *Staphylococcus aureus*

- Ciprofloxacino 5 ug
- Clindamicina 2 ug

Para Cepa de *Escherichia coli*

- Amikacina 30 ug
- Ciprofloxacino 5 ug

3.3 METODOLOGÍA

3.3.1 TIPO DE ESTUDIO

El presente estudio de investigación es del tipo cuasi experimental prospectivo ya que establece relación entre efecto antibacteriano *in vitro* de jabón líquido elaborados a partir de cada extracto etanólico al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” frente a cepas *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

3.3.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

Es presente trabajo de investigación es del tipo:

- **Cuasi experimental:** Porque se manipula deliberadamente al menos una variable independiente para ver su efecto y relación con una o más variables dependientes

3.3.2.1 DISEÑO DE PRUEBA ANTIBACTERIANA DE EXTRACTO ETANÓLICO

Para determinar la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” se seguirá el diseño de pos prueba y grupo control.

A. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Colletia spinosissima* Y *Caléndula officinalis* FRENTE A *Staphylococcus aureus*

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICIÓN DE LA PRUEBA
G ₁	X ₁	O ₁
G ₂	X ₂	O ₂
.	.	.
.	.	.
G _x	X _x	O _x
G _x +1	X _x +1	O _x +1
G _x +2	X _x +2	O _x +2

Donde:

- $G_1, G_2, \dots, G_{X+1}, G_{X+2}$: Son cepas estándar de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- X_1, X_2, \dots, X_x : Son diferentes concentraciones en mg/mL de los extractos etanólicos al 70 % de Roque y Caléndula que serán sembradas en placas Petri por triplicado por el método de discos.
- X_{x+1} : Concentración del fármaco patrón (Ciprofloxacino)
- X_{x+2} : Concentración del fármaco patrón (Clindamicina)
- $O_1, O_2, \dots, O_{X+1}, O_{X+2}$: Observación y medición de los halos de inhibición a las 24 horas.

B. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE *Colletia spinosissima* Y *Caléndula officinalis* FRENTE A *Escherichia coli*

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICIÓN DE LA PRUEBA
G_1	X_1	O_1
G_2	X_2	O_2
.	.	.
.	.	.
G_x	X_x	O_x
G_{x+1}	X_{x+1}	O_{x+1}
G_{x+2}	X_{x+2}	O_{x+2}

Donde:

- $G_1, G_2, \dots, G_{X+1}, G_{X+2}$: Son cepas estándar de *Escherichia coli* ATCC 35218
- X_1, X_2, \dots, X_x : Son diferentes concentraciones en mg/mL de los extractos etanólicos al 70 % de Roque y Caléndula que serán sembradas en placas Petri por triplicado por el método de discos.
- X_{x+1} : Concentración del fármaco patrón (Amikacina)
- X_{x+2} : Concentración del fármaco patrón (Ciprofloxacino)
- $O_1, O_2, \dots, O_{X+1}, O_{X+2}$: Observación y medición de los halos de inhibición a las 24 horas.

3.3.2.2 DETERMINACIÓN DE PRUEBA ANTIBACTERIANA DE JABÓN LÍQUIDO ELABORADOS A PARTIR DE CADA EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 %

Para determinar la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” se seguirá el diseño de prueba, post prueba y grupo control.

A *Colletia spinosissima* “Roque” frente a cepas de *Staphylococcus aureus*

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICIÓN DE LA PRUEBA		
G ₁	X ₁	O ₁	O ₂	O ₃
G ₂	X ₂	O ₄	O ₅	O ₆
G ₃	--	O ₇	O ₈	O ₉

Donde:

- G₁, G₂, G₃: Son cepas estándar de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- X₁: Jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % del *Colletia spinosissima* “Roque”.
- X₂: Jabón líquido patrón
- --: Ausencia de estímulo: Administración de agua destilada
- O₁, O₂, O₃: Observación y medición de los halos de inhibición del *Colletia spinosissima* “Roque” a las 24 horas.
- O₄, O₅, O₆: Observación y medición de los halos de inhibición representada por el grupo de jabón líquido patrón a las 24 horas.
- O₇, O₈, O₉: Observación y medición de los halos de inhibición representada por el grupo control a las 24 horas.

B *Colletia spinosissima* “Roque” frente a cepas de *Escherichia coli*

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICIÓN DE LA PRUEBA		
G ₁	X ₁	O ₁	O ₂	O ₃
G ₂	X ₂	O ₄	O ₅	O ₆
G ₃	--	O ₇	O ₈	O ₉

Donde:

- G₁,G₂,G₃: Son cepas estándar de *Escherichia coli* ATCC 35218
- X₁: Jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque”.
- X₂: Jabón líquido patrón
- --: Ausencia de estímulo: Administración de agua destilada
- O₁, O₂, O₃: Observación y medición de los halos de inhibición del *Colletia spinosissima* “Roque” a las 24 horas.
- O₄, O₅, O₆: Observación y medición de los halos de inhibición representada por el grupo de jabón líquido patrón a las 24 horas.
- O₇, O₈, O₉: Observación y medición de los halos de inhibición representada por el grupo control a las 24 horas.

C *Caléndula officinalis* “Caléndula” frente a cepas de *Staphylococcus aureus*

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICIÓN DE LA PRUEBA		
G ₁	X ₁	O ₁	O ₂	O ₃
G ₂	X ₂	O ₄	O ₅	O ₆
G ₃	--	O ₇	O ₈	O ₉

Donde:

- G₁,G₂,G₃: Son cepas estándar de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- X₁: Jabón líquido elaborado con extracto etanólico de *Caléndula officinalis* “Caléndula”.
- X₂: Jabón líquido patrón
- --: Ausencia de estímulo: Administración de agua destilada
- O₁, O₂,O₃: Observación y medición de los halos de inhibición del *Caléndula officinalis* “Caléndula” a las 24 horas.
- O₄, O₅, O₆: Observación y medición de los halos de inhibición representada por el grupo de jabón líquido patrón a las 24 horas.
- O₇, O₈, O₉: Observación y medición de los halos de inhibición representada por el grupo control a las 24 horas.

D *Caléndula officinalis* “Caléndula” frente a cepas de *Escherichia coli*

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL	MEDICIÓN DE LA PRUEBA		
		O ₁	O ₂	O ₃
G ₁	X ₁	O ₁	O ₂	O ₃
G ₂	X ₂	O ₄	O ₅	O ₆
G ₃	--	O ₇	O ₈	O ₉

Donde:

- G₁,G₂,G₃:Son cepas estándar de *Escherichia coli* ATCC 35218
- X₁: Jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de *Caléndula officinalis* “Caléndula”.
- X₂: Jabón líquido patrón
- --: Ausencia de estímulo: Administración de agua destilada
- O₁, O₂, O₃: Observación y medición de los halos de inhibición de *Caléndula officinalis* “Caléndula” a las 24 horas.
- O₄, O₅, O₆: Observación y medición de los halos de inhibición representada por el grupo de jabón líquido patrón a las 24 horas.
- O₇, O₈, O₉: Observación y medición de los halos de inhibición representada por el grupo control a las 24 horas.

3.3.2.3 DISEÑO DE LA FORMULACIÓN DE JABÓN LÍQUIDO ELABORADOS A PARTIR DE CADA EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 %

➤ **JABÓN LÍQUIDO DE *Colletia spinosissima* “ROQUE”**

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL						MEDICIÓN DE LA PRUEBA								
	G ₁	X ₁	X ₇	X ₁₃	X ₁₉	X ₂₅	X ₃₁	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈
G ₂	X ₂	X ₈	X ₁₄	X ₂₀	X ₂₆	X ₃₂	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈	O ₉
G ₃	X ₃	X ₉	X ₁₅	X ₂₁	X ₂₇	X ₃₃	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈	O ₉
G ₄	X ₄	X ₁₀	X ₁₆	X ₂₂	X ₂₈	X ₃₄	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈	O ₉
G ₅	X ₅	X ₁₁	X ₁₇	X ₂₃	X ₂₉	X ₃₅	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈	O ₉
G _x	X ₆	X ₁₂	X ₁₈	X ₂₄	X ₃₀	X ₃₆	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈	O ₉

Donde:

- G₁: Formulación del jabón líquido N°1
- G₂: Formulación del jabón líquido N°2
- G₃: Formulación del jabón líquido N°3
- G₄: Formulación del jabón líquido N°4
- G₅: Formulación del jabón líquido N°5
- G_x: Formulación del jabón líquido N°6
- X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆: Tensioactivo X %
- X₇, X₈, X₉, X₁₀, X₁₁, X₁₂: Espesante X %
- X₁₃, X₁₄, X₁₅, X₁₆, X₁₇, X₁₈: Espesante activador de tensioactivo X %
- X₁₉, X₂₀, X₂₁, X₂₂, X₂₃, X₂₄: Aditivo X%
- X₂₅: Conservante
- X₂₆: Extracto etanólico al 70 % de *Colletia spinosissima*

DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS DEL JABÓN LÍQUIDO DE *Colletia spinosissima* “ROQUE”

- O₁: Color
- O₂: Olor
- O₃: Apariencia

DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL JABÓN LÍQUIDO DE *Colletia spinosissima* “ROQUE”

- O₄: Densidad relativa
- O₅: Determinación de pH
- O₆: Viscosidad
- O₇: Determinación de residuo seco
- O₈: Índice de espuma
- O₉: Estabilidad de color

➤ **JABÓN LÍQUIDO DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA”**

GRUPO	TRATAMIENTO EXPERIMENTAL						MEDICIÓN DE LA PRUEBA								
	X ₁	X ₇	X ₁₃	X ₁₉	X ₂₅	X ₃₁	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈	O ₉
G ₁	X ₁	X ₇	X ₁₃	X ₁₉	X ₂₅	X ₃₁	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈	O ₉
G ₂	X ₂	X ₈	X ₁₄	X ₂₀	X ₂₆	X ₃₂	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈	O ₉
G ₃	X ₃	X ₉	X ₁₅	X ₂₁	X ₂₇	X ₃₃	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈	O ₉
G ₄	X ₄	X ₁₀	X ₁₆	X ₂₂	X ₂₈	X ₃₄	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈	O ₉
G ₅	X ₅	X ₁₁	X ₁₇	X ₂₃	X ₂₉	X ₃₅	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈	O ₉
G _x	X ₆	X ₁₂	X ₁₈	X ₂₄	X ₃₀	X ₃₆	O ₁	O ₂	O ₃	O ₄	O ₅	O ₆	O ₇	O ₈	O ₉

Donde:

- G₁: Formulación del jabón líquido N°1
- G₂: Formulación del jabón líquido N°2
- G₃: Formulación del jabón líquido N°3
- G₄: Formulación del jabón líquido N°4
- G₅: Formulación del jabón líquido N°5
- G_x: Formulación del jabón líquido N°6
- X₁, X₂, X₃, X₄, X₅, X₆: Tensioactivo X %
- X₇, X₈, X₉, X₁₀, X₁₁, X₁₂: Espesante X %
- X₁₃, X₁₄, X₁₅, X₁₆, X₁₇, X₁₈: Espesante activador de tensioactivo X %
- X₁₉, X₂₀, X₂₁, X₂₂, X₂₃, X₂₄: Aditivo X%
- X₂₅: Conservante
- X₂₆: Extracto etanólico al 70 % de la *Caléndula officinalis*.

DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS DEL JABÓN LÍQUIDO DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA”

- O₁: Color
- O₂: Olor
- O₃: Apariencia

DETERMINACIÓN DE PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS DEL JABÓN LÍQUIDO DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA”

- O₄: Densidad relativa
- O₅: Determinación de pH
- O₆: Viscosidad
- O₇: Determinación de residuo seco
- O₈: Índice de espuma
- O₉: Estabilidad de color

3.4 IDENTIFICACIÓN, DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.4.1 VARIALES IMPLICADAS

3.4.1.1 VARIABLES INDEPENDIENTES

- Concentración del extracto etanólico al 70 %de *Colletia spinosissima* “Roque”.
- Concentración del extracto etanólico al 70 % de *Caléndula officinalis* “Caléndula”.
- Jabón líquido elaborado a base del extracto etanólico al 70 %de *Colletia spinosissima* “Roque”.
- Jabón líquido elaborado a base del extracto etanólico al 70 % de *Caléndula officinalis* “Caléndula”.

3.4.1.2 VARIABLES DEPENDIENTES

- Actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

3.4.2 VARIABLES NO IMPLICADAS

3.4.2.1 VARIABLES INTERVINIENTES

DE LA ESPECIE VEGETAL

- Lugar de recolección
- Temporada de recolección
- Horario de recolección
- Técnica de recolección
- Partes de la planta a estudiar
- Estadío de crecimiento

DE LA BACTERIA

- Medio de cultivo
- Cepas.
- Estadío de crecimiento

DE LA FORMULACIÓN

- Color
- Olor
- Apariencia
- Determinación de pH
- Viscosidad
- Índice de espuma
- Estabilidad de color

3.4.3 OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

3.4.3.1 VARIABLES INDEPENDIENTES

A. Concentración del extracto etanólico al 70 % de “Roque” *Colletia spinosissima*

Definición conceptual: Es la cantidad de extracto sólido obtenido por evaporación del etanol previa maceración de los tallos de este. Disuelto en un disolvente adecuado (Villar, 1999)

Definición operacional:

- **Naturaleza:** Cuantitativo
- **Tipo de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Razón
- **Instrumento de medición:** Balanza analítica
- **Procedimiento de medición de la variable:** Se pesó el extracto seco etanólico en mg y luego se realizaron las diluciones con los solventes adecuados (mL).
- **Indicadores:** Cantidad de extracto disuelto/cantidad de solvente)
- **Expresión final:** mg/mL

B. Concentración del extracto etanólico al 70 % de “Caléndula” *Caléndula officinalis*.

Definición conceptual: Es la cantidad de extracto sólido obtenido por evaporación del etanol previa maceración de las flores de esta. Disuelto en un disolvente adecuado (Villar, 1999)

Definición operacional:

- **Naturaleza:** Cuantitativo
- **Tipo de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Razón
- **Instrumento de medición:** Balanza analítica
- **Procedimiento de medición de la variable:** Se pesó el extracto seco etanólico en mg y luego se realizaron las diluciones con los solventes adecuados (mL).
- **Indicadores:** Cantidad de extracto disuelto/cantidad de solvente)
- **Expresión final:** mg.

C. Jabón líquido elaborado a base del extracto etanólico al 70 % de “Roque” *Colletia spinosissima*.

Definición operacional:

- **Naturaleza** : Cuantitativa
- **Forma de medición** : Directa
- **Escala de medición** : Razón
- **Instrumento de medición** : Micropipeta

- **Procedimiento de medición** :Se pesó el extracto etanólico, llevado a una forma farmacéutica “jabón líquido”
- **Indicadores** : Porcentaje
- **Expresión final** : % en miligramos

D. Jabón líquido elaborado a base del extracto etanólico al 70 % de “Caléndula”

Caléndula officinalis.

- **Definición operacional:**
- **Naturaleza** : Cuantitativa
- **Forma de medición** : Directa
- **Escala de medición** : Razón
- **Instrumento de medición** : Micropipeta
- **Procedimiento de medición** : Se pesó el extracto etanólico, llevado a una forma farmacéutica “jabón líquido”
- **Indicadores** : Porcentaje
- **Expresión final** : % en miligramos

3.4.3.2 VARIABLES DEPENDIENTES

A. Actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Definición conceptual: Capacidad de una sustancia que actuando sobre una etapa esencial y específica del metabolismo microbiano puede inhibir el crecimiento a algunos microorganismos (farreras, 2005)

Definición operacional:

- **Naturaleza:** Cuantitativo
- **Tipo de medición:** Directa
- **Escala de medición:** Razón
- **Instrumento de medición:** Vernier
- **Procedimiento de medición de la variable:** Se midió los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano producido por la sensibilidad de las bacterias al extracto.
- **Indicadores:** Diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano, CMI y CMB.

- **Expresión final:** mm (diámetro del halo).

3.4.3.3 VARIABLES INTERVINIENTES

A. DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO

- Lugar de recolección : Se realizó la recolección de las especies en estudio en la Localidad de Ocongate, provincia de Quispicanchis, Departamento de Cusco.
- Temporada de recolección: La especie vegetal de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Calendula officinalis* “Caléndula” se recolectaron en los meses de enero y febrero.
- Horario de recolección: La especie vegetal de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Calendula officinalis* “Caléndula” se recolectaron en horas de la mañana.
- Técnica de recolección: La presencia de espinas del Roque y flores de la Caléndula.
- Partes de la planta a estudiar : Se estudió el tallo y las flores.
- Estadío de crecimiento: Especies maduras, en floración.

B. DE LA BACTERIA

- Tipo de cepa
- Medios de cultivo:
- Temperatura de incubación
- Estado de crecimiento: fase de crecimiento

C. DE LA FORMULACIÓN

- Color: Se observó el color, la transparencia, la presencia de partículas.
- Olor: Se tomó una tira de papel secante aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de largo y se introdujo un extremo en la formulación.
- Apariencia: análisis del aspecto extremo.
- Densidad relativa: Es la relación entre el peso del cuerpo y el peso específico de la sustancia de referencia; la sustancia de referencia es aire para los gases y agua para el sólido y líquidos.
- Determinación de pH: La medición del pH se llevo a cabo por medio de la lectura de pH en la escala de in instrumento de medidor de pH.
- Viscosidad: Se midió directamente utilizando un discometro rotacional de Brookfield.

- Índice de espuma: Se midió la altura total y la altura de la espuma al minuto, a los 3 y 5 minutos, luego de agitar la muestra.
- Estabilidad de color: Se expuso el producto a la luz solar indirecta durante 12 horas; el color debe ser estable a la luz.

TABLA N°7 : RESUMEN DE LA OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES IMPLICADAS									
DEFINICIÓN OPERACIONAL									
INDEPENDIENTES	INDICADOR	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	NATURALEZA	TIPO DE MEDICIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN	PROCEDIMIENTO DE MEDICIÓN	INSTRUMENTO	EXPRESIÓN FINAL	
Extracto etanólico al 70% de la especie vegetal de <i>Colletia spinosissima</i> "Roque"	Cantidad del extracto disuelto/ cantidad de solventes	Es la cantidad del extracto sólido obtenido por evaporación del etanol previa maceración de los tallos de este. Disuelto con los solventes adecuados(villar,1999)	Cuantitativa	Directa	Razón	Se pesó el extracto seco en mg luego se realizaron las diluciones con el solvente adecuado (mL)	Balanza analítica Ficha de datos	mg/mL	
Extracto etanólico al 70% de la especie vegetal de <i>Caléndula officinalis</i> "Caléndula"	Cantidad del extracto disuelto/ Cantidad de solventes	Es la cantidad del extracto sólido obtenido por evaporación del etanol previa maceración de los tallos de este. Disuelto con los solventes adecuados(villar,1999)	Cuantitativa	Directa	Razón	Se pesó el extracto seco en mg luego se realizaron las diluciones con el solvente adecuado (mL)	Balanza analítica Ficha de datos	mg/mL	

Jabón líquido elaborado a base del extracto etanólico al 70% de <i>Colletia spinosissima</i> "Roque".	Porcentaje	Son jabones disueltos en agua, alcohol, glicerina o mezcla de estas sustancias.	Cuantitativa	Directa	Razón	Se pesó el extracto etanólico de <i>colletia spinosissima</i> Roque, llevados a una forma farmacéutica jabón líquido.	Micropipeta	% en miligramos.
Jabón líquido elaborado a base del extracto etanólico al 70% de <i>Caléndula officinalis</i> "Caléndula".	Porcentaje	Son jabones disueltos en agua, alcohol, glicerina o mezcla de estas sustancias.	Cuantitativa	Directa	Razón	Se pesó el extracto etanólico de <i>Caléndula officinalis</i> Caléndula, llevados a una forma farmacéutica jabón líquido.	Micropipeta	% en miligramos.
DEPENDIENTES	INDICADOR	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	NATURALEZA	TIPO DE MEDICIÓN	ESCALA DE MEDICIÓN	PROCEDIMIENTO DE MEDICIÓN	INSTRUMENTO	EXPRESIÓN FINAL
Actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos de <i>Colletia spinosissima</i> "Roque" y <i>Caléndula officinalis</i> "Caléndula" sobre las cepas ATCC de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	Diámetro del halo de inhibición del crecimiento bacteriano CMI CMB	Capacidad de una sustancia que actuando sobre una cepa esencial y específica del metabolismo microbiano puede inhibir el crecimiento en algunos microorganismos (farreras,2005)	Cuantitativa	Directa	Razón	Se midieron los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano producido por la sensibilidad de las bacterias al extracto.	Vernier Ficha de datos de los halos de inhibición	mm

TABLA N°8: VARIABLES NO IMPLICADAS

VARIABLES NO IMPLICADAS	
INTERVINIENTES	
De las plantas en estudio	Estado de crecimiento
	Temporada de recolección
	Horario de recolección
	Técnica de recolección
	Parte de la planta a estudiar
	Estado de crecimiento
De las bacterias	Tipo de cepa
	Medios de cultivo
	Temperatura de incubación
	Estado de crecimiento
	Color: Se observó el color, la transparencia, la presencia de partículas.
De la formulación	Olor: Se tomó una tira de papel secante aproximadamente 1 cm de ancho por 10 cm de largo y se introdujo un extremo en la formulación
	Apariencia: Análisis del aspecto extremo
	Densidad relativa: Es la relación entre el peso del cuerpo y el peso específico de la sustancia de referencia; la sustancia de referencia es aire para los gases y agua para los sólidos y líquidos.
	Determinación de pH: La medición del pH se llevó a cabo por medio de la lectura de pH en la escala de in instrumento de medidor de pH.
	Viscosidad: Se midió directamente utilizando un viscosímetro rotacional de Brookfield.
	Determinación de residuo seco: Se realizó por medición gravimétrica en peso que se produce cuando se calienta una muestra por un determinado periodo de tiempo.
	Índice de espuma: Se midió la altura total y la altura de la espuma al minuto, a los 3 y 5 minutos, luego de agitar la muestra.
Estabilidad de color: Se expuso el producto a la luz solar indirecta durante 12 horas; el color debe ser estable a la luz.	

3.5 CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y DE EXCLUSIÓN

3.5.1 DE LAS MUESTRAS VEGETALES

Criterios de inclusión:

- Especie vegetal en buen estado *Colletia spinosissima* “Roque”
- Flores en buen estado de la especie vegetal *Caléndula officinalis* “Caléndula”

Criterio de exclusión:

- Especie vegetal *Colletia spinosissima* “Roque” con parásitos o contaminados por hongos.
- Flores dañadas, con parásitos o contaminados por hongos de la especie vegetal *Caléndula officinalis* “Caléndula”
- Raíz de la especie vegetal *Colletia spinosissima* “Roque”

3.5.2 DE LAS BACTERIAS

Criterios de inclusión:

- Cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Criterios de exclusión:

- Cepas bacterianas que no se encontraron en buenas condiciones o presentaron contaminación y que no cumplieron con las características básicas de las cepas.

3.5.3 DE LA FORMULACIÓN

Criterios de inclusión:

- Se trabajó con la formulación elaborada a partir del extracto etanólico al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” que presentaron las características idóneas.

Criterios de exclusión:

- No se trabajó con las formulaciones que no pasen el control de calidad.

3.6 PROCEDIMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

3.6.1 MUESTREO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

3.6.1.1 RECOLECCIÓN DE LAS PLANTAS EN ESTUDIO

Se recolectó la parte aérea (tallos) de la especie vegetal *Colletia Spinosissima* “Roque” en el mes de enero, en el distrito de Ocongate en la localidad de Ccolcca a una altitud de 3942 msnm, del departamento de Cusco.

Se recolectó la parte aérea (flores) de la especie vegetal *Caléndula officinalis* “Caléndula” en el mes de enero, en el distrito de Ocongate en la localidad de Jullicunca a una altitud de 3788 msnm, del departamento de Cusco.

3.6.1.2 SELECCIÓN Y SECADO DE LAS MUESTRAS

Una vez obtenidas las muestras vegetales se procedió a la selección y limpieza de los mejores ejemplares de los tallos de la especie vegetal *Colletia Spinosissima* “Roque” y de las flores de la especie vegetal *Caléndula officinalis* “Caléndula”, luego se extendieron los tallos y flores en papel kraft para su secado el cual se realizaron en un lugar fresco, limpio, ventilado, sombra y temperatura ambiente.

3.6.1.3 MOLIENDA Y TAMIZAJE DE LAS MUESTRAS

Una vez obtenida las muestras secas se procedió a molerlas con un molino de granos previamente desinfectado, luego se tamizaron las muestras para obtener la finura adecuada y se traspasaron a frascos de color ámbar con tapas herméticas.

3.6.2 DETERMINACIÓN DE PORCENTAJE DE HUMEDAD

La determinación de los porcentajes de humedad de los tallos de la especie vegetal *Colletia Spinosissima* “Roque” y de las flores de la especie vegetal de *Caléndula officinalis* “Caléndula” se realizaron por triplicado en placas Petri con 5 g de muestra fresca, las mismas serán introducidas a la estufa a 40 °C hasta peso constante para luego determinar el porcentaje humedad mediante la siguiente relación.

Donde:

- %H= % Humedad
- M1= peso de la muestra fresca
- M2=peso de la muestra seca

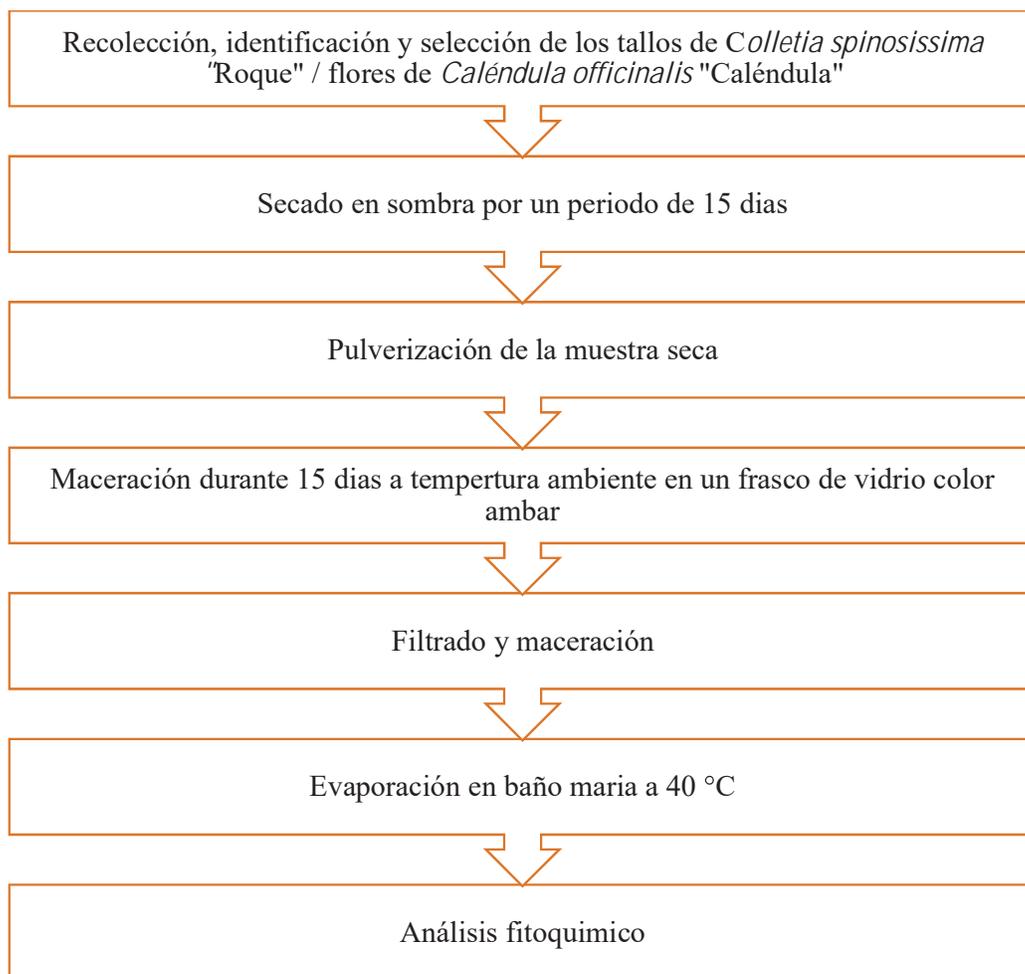
$$\% = \frac{M1 - M2}{M1}$$

3.6.3 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO

La parte molida se colocó en un envase, el cual se sometió a maceración con alcohol de 70° de las dos especies vegetales en envases de color ámbar debidamente etiquetadas según el extracto obtenido, se agitó diariamente por un periodo de 15 días a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se procedió a filtrar el macerado, el producto filtrado se traspasó a envases de boca ancha y fueron sometidos a evaporación a una temperatura de 40 °C.

Estos extractos se usaron para las pruebas de solubilidad, análisis fitoquímico cualitativo, control de calidad microbiológico y para la determinación antibacteriana.

FLUJOGRAMA N° 1: OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS SECOS ETANÓLICOS Y ANÁLISIS FITOQUÍMICO



Fuente: Bruneton, J. Farmacognosia General. Plantas medicinales, Paris 1993. (56)

3.6.4 PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN

El porcentaje de extracción se calculó con la siguiente relación.

$$\%extraccion = \frac{PF}{PI} X 100$$

Donde:

- PI=peso final(muestra molida)
- PF=peso final (extracto seco)

3.6.5 PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Para realizar las pruebas de solubilidad se pesó aproximadamente 100 mg de los extractos etanólicos los cuales se depositaron en diferentes tubos de ensayo a los cuales se agregaron 1 a 3 mL en disolventes de a menor polaridad: agua, metanol, etanol 70 y 96 %, acetona, acetato de etilo, cloroformo, éter etílico, bencina y hexano.

3.6.6 ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

Los extractos etanólicos obtenidos fueron analizados mediante una marcha fitoquímica para la determinación de los metabolitos secundarios.

TABLA N°9: MARCHA FITOQUÍMICA

REACTIVO	METABOLITO SECUNDARIO
Dragendorff	Alcaloides
Benedict	Azucares reductores
Cloruro férrico al 1 %	Compuestos fenólicos
Reacción de shinoda	Flavonoides
Fehling A y B	Glucósidos
Ácido sulfúrico concentrado	Saponinas
Lieberman-burchart	Esteroides
Molish	Glucósidos
Ninhidrina	Aminoácidos
Bontranger	Quinonas
Gelatina	Taninos

Fuente: O.lock de ugaz. Investigacion fitoquimica, 2017. (57)

3.6.7 ENSAYO DEL RECONOCIMIENTO DE SAPONINAS

Las saponinas esteroides se pueden reconocer fácilmente en los análisis fitoquímicos preliminares mediante los ensayos de espuma, hemólisis de glóbulos rojos, liebermann-burchard y ensayos para carbohidratos.

a) ENSAYO DE ESPUMA

Al agitar una solución acuosa de una muestra que sea o contenga saponinas, se forma una espuma estable como la obtenida al agitar la solución acuosa de un jabón. Puesto que existen otras sustancias que pueden formar también también espuma, se debe asumir este ensayo como una prueba presuntiva de la presencia de saponinas esteroides.

b) ENSAYO DE HEMÓLISIS

Este ensayo es más confiable que el de la espuma .a una suspensión de glóbulos rojos en una solución salina diluida, se añade una solución de la muestra que se presume que es o que contiene saponinas. Si los glóbulos rojos se rompen, se asume que la prueba es positiva. Este ensayo puede realizarse en tubo de ensayo, en placas Petri con agar sangre.

Cuando la muestra contiene taninos, debe eliminarse antes de realizar la prueba ya que estas interfieren. Esto se lograra por tratamiento repetido de la muestra con oxido de magnesio, el cual forma complejos insolubles con los taninos, por lo cual es fácil eliminarlos por filtración.

Este ensayo, junto con el de espuma, cuando ambos resultan positivos en una muestra vegetal (extracto, fracción o sustancia pura) permiten establecer que la muestra es o contiene en su composición saponinas.

c) LIEBERMANN-BURCHARD (triterpenos y/o esteroides)

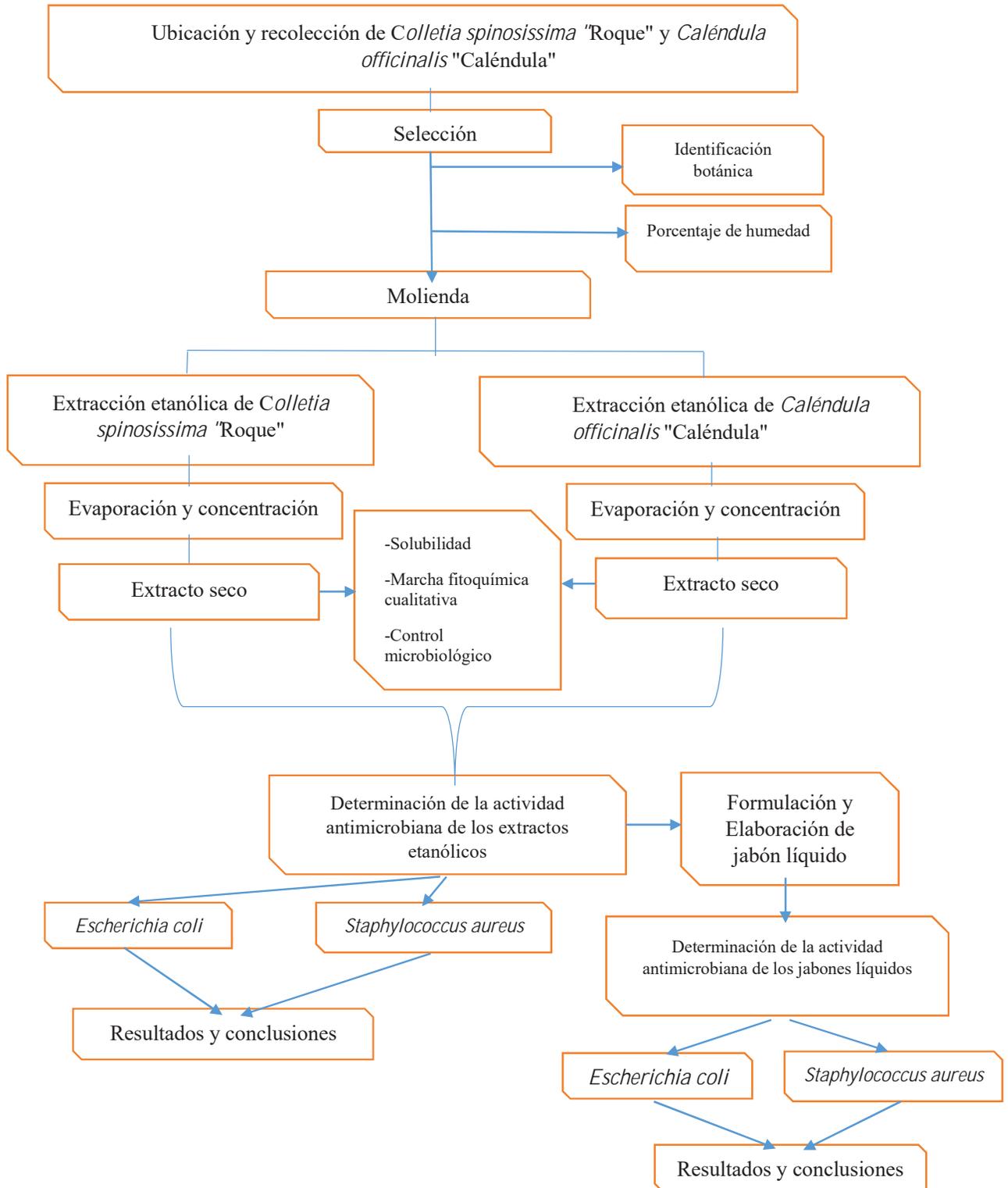
Tomar una pequeña cantidad de extracto etanólico y se añadirá 2 mL de anhídrido acético ,2 mL de cloroformo y se enfriara a 0 °C. Se añadirá 2 gotas de ácido sulfúrico. La aparición de coloración azulada que pasa a anaranjado para luego volverse verde, indica que la reacción es positiva. (58)

d) SALKOWSKI (triterpenos y/o esteroides)

Tomar una pequeña cantidad del extracto y se le añadirá 2 mL de cloroformo y 2 mL de ácido sulfúrico. Una coloración anaranjada indica reacción positiva. (59)

3.6.8 PROCEDIMIENTO GENERAL DEL ESTUDIO

FLUJOGRAMA N° 2 : RESUMEN GENERAL DE LA INVESTIGACIÓN



Fuente: Elaborado en base a Capasso, O. Fitofarmacia. Milan 1996. (60)

3.6.9 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70%

Esta prueba se realizó para determinar las concentración mínima inhibitoria para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, incubando cada unidad durante 24 horas a 37 °C.

Después de la incubación, la ausencia de crecimiento, detectada por la translucidez o un solo botón de sedimentación microbiana (comparándola con el control positivo y control negativo) en el tubo con la menor concentración de extracto, se designó como la CMI.

3.6.10 DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

Método de dilución en agar

Para la determinación de la CMB se realizó un sembrado estriado en la placa con agar Muller Hinton y luego se incubo a 37°C por 24 horas. Para la evaluación de la CMB se observó la ausencia o presencia de crecimiento, luego se tomó como la CMB a la mayor dilución de los extractos, al cual al subcultivarse redujo el crecimiento del inóculo inicial en un 99,9%.

CUADRO N° 1: DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA

Especie	Complejo activo	Concentraciones del extracto etanólico al 70 % (mg/mL)	Número de placas para cada concentración
<i>Staphylococcus aureus</i>	Extracto etanólico de <i>Colletia spinosissima</i> "Roque" Extracto etanólico de <i>Caléndula officinalis</i> "Caléndula"	100.00	3
		59.99	3
		25.00	3
		12.50	3
		6.250	3
		3.125	3
		1.560	3
		0.780	3
		0.390	3
		0.195	3
		0.097	3
		0.048	3
		0.024	3
		0.012	3

<i>Escherichia coli</i>		100.00	3
		59.99	3
		25.00	3
	Extracto etanólico de	12.50	3
	<i>Colletia spinosissima</i>	6.250	3
	“Roque”	3.125	3
		1.560	3
	Extracto etanólico de	0.780	3
	<i>Caléndula officinalis</i>	0.390	3
	“Caléndula”	0.195	3
		0.097	3
		0.048	3
		0.024	3
	0.012	3	

3.6.11 ESTANDARIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ANTIBACTERIANA

Las distintas concentraciones se determinaron a través del factor de incremento, teniendo en cuenta las concentraciones mínimas y máximas realizadas en la prueba piloto.

$$F = \sqrt[r]{I}$$

DONDE:

$$I: \frac{DOSIS\ MAXIMA}{DOSIS\ MINIMA}$$

r : **N – 1** =Número de dosis en la serie logarítmica.

N: Número de concentraciones con las que se trabajo

F: factor de incremento

Las dosis con las que se trabajaran se determinaran de la siguiente manera.

- 1- Concentración mínima = 1
- 2- Concentración mínima x factor de crecimiento = concentración 2
- 3- Concentración 2 x factor de crecimiento = 3
- 4- Concentración 3 x factor de crecimiento = 4
- 5- Concentración 4 x factor de crecimiento = 5
- 6- Concentración 5 x factor de crecimiento = 6
- 7- Concentración 6 x factor de crecimiento = 7
- 8- Concentración 7 x factor de crecimiento = 8
- 9- Concentración 8 x factor de crecimiento = 9
- 10- Concentración 9 x factor de crecimiento = 10
- 11- Concentración 10 x factor de crecimiento = 11
- 12- Concentración 11 x factor de crecimiento = 12
- 13- Concentración máxima

3.6.12 CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE LAS ESPECIES VEGETALES *Colletia spinosissima* “ROQUE” Y *Calendula officinalis* “CALÉNDULA”

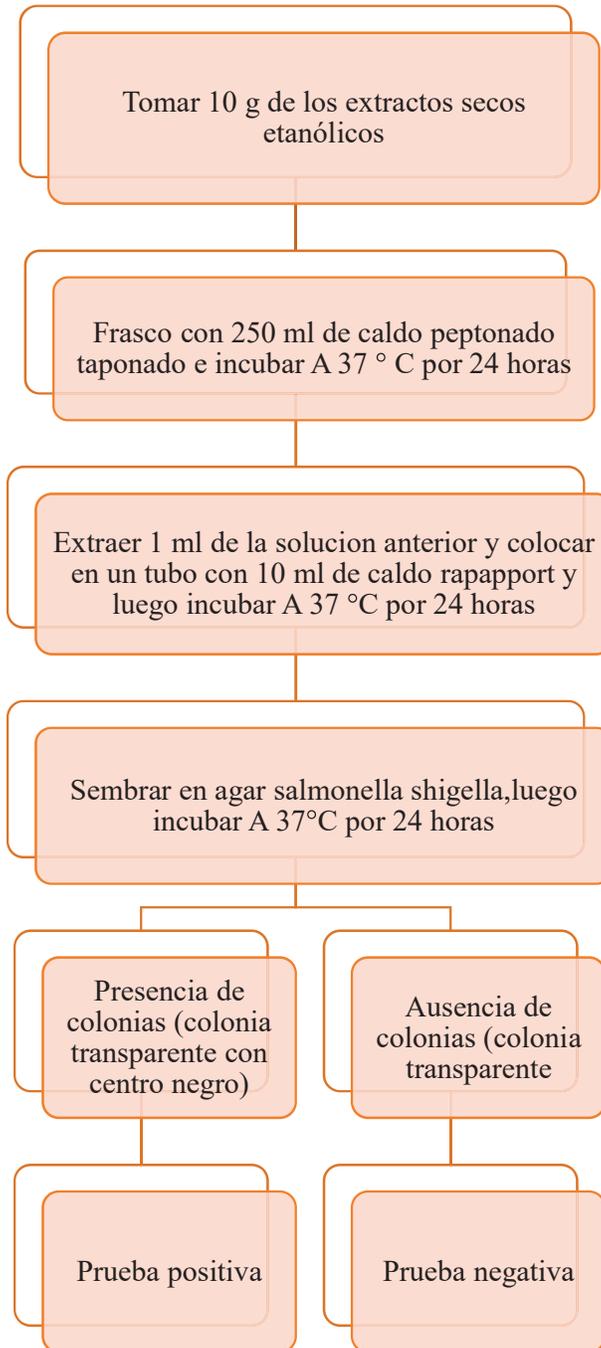
Según la norma sanitaria sobre los criterios microbiológicos de calidad sanitaria de salud, se observa en el siguiente cuadro los criterios a tomar en cuenta para el control de calidad de los extractos secos en estudio.

TABLA N°10: ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

CRITERIOS	AGAR	PESO DEL EXTRACTO	BACTERIAS Y HONGOS	RESULTADOS ACEPTABLES
Criterio imperativo: No debe presentar, en caso hubiera el riesgo es muy elevado	Agar SS	10 g	Salmonella	Negativo
Criterios indicativos de higiene: El exceso indica que las condiciones de higiene en el proceso son deficientes y que el producto puede ser rechazado	Agar Mc Conkey	1 g	Coliformes fecales	Negativo
Criterios de alerta o límites críticos: Significa que durante el proceso de preparación del extracto no debe exceder los límites especificados.	Agar Sabouraud	1 g	Aerobios, mesofilos y hongos y levaduras	Negativo

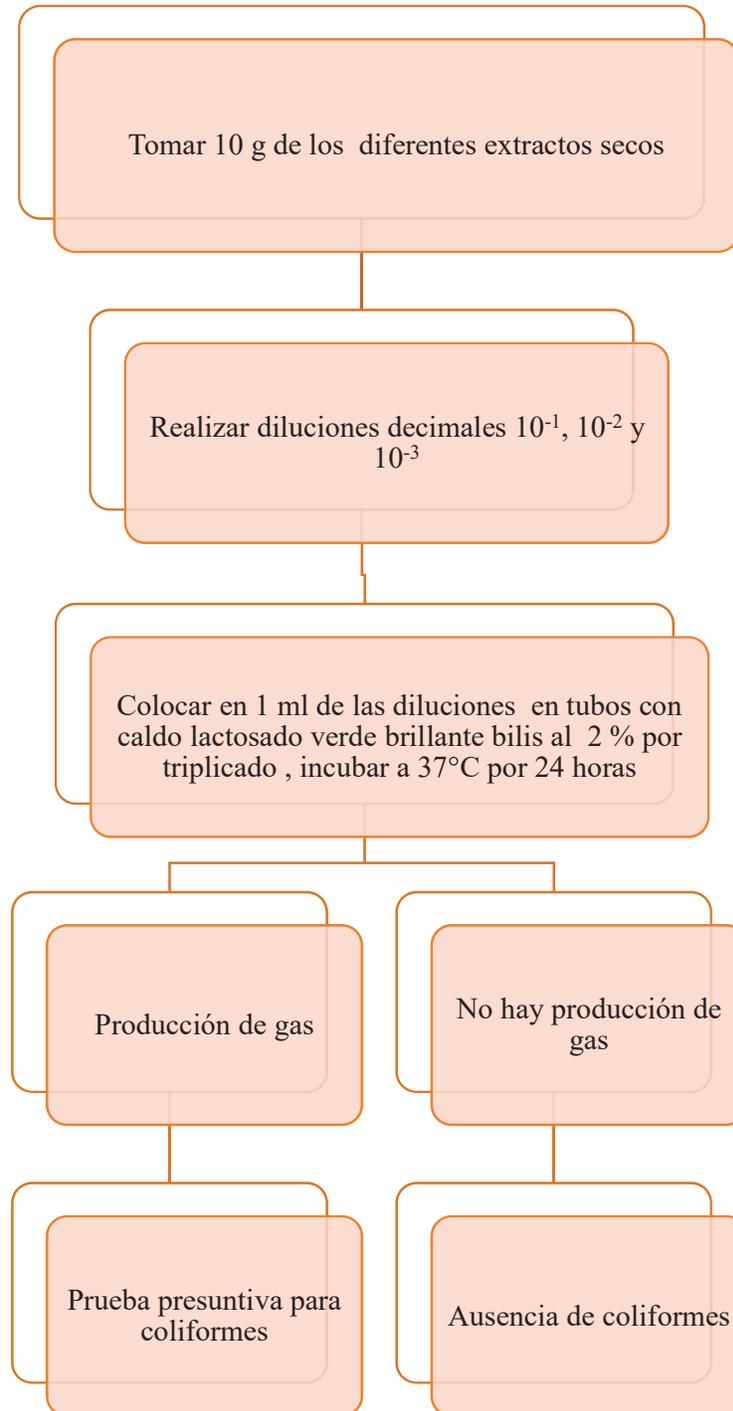
Fuente: DIGESA, norma sanitaria sobre criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos bebidas de consumo humano .cusco-Perú, 1999. (61)

**FLUJOGRAMA N°3: CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS
CONCENTRADOS EN BASE AL CRITERIO IMPERATIVO**



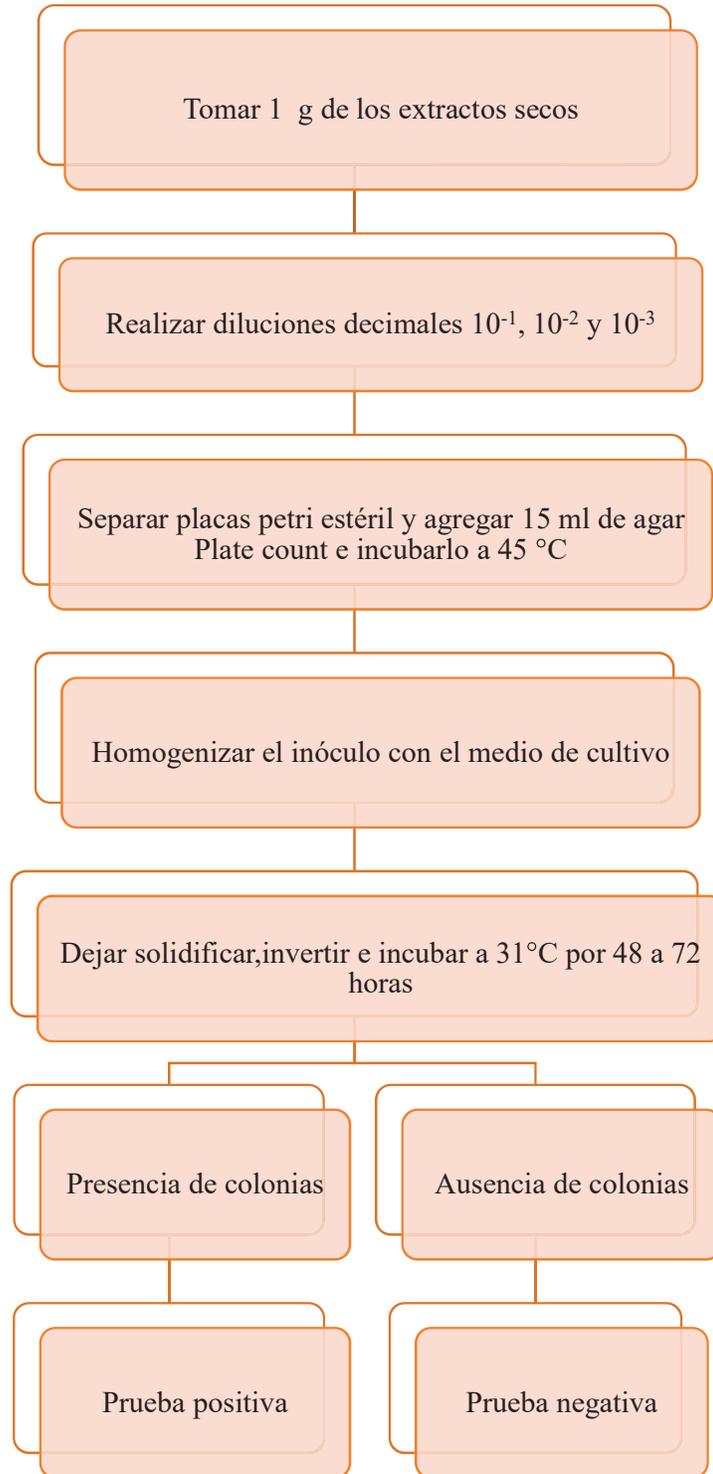
Fuente: Elaborado en base a Agurto, S.T. Manual de técnicas en microbiología 1989. (62)

**FLUJOGRAMA N°4: CONTROL DE CALIDAD DE LOS EXTRACTOS
CONCENTRADOS EN BASE AL CRITERIO INDICATIVO DE HIGIENE**



Fuente: Elaborado en base a Agurto, S.T.Manual de técnicas en microbiología 1989. (62)

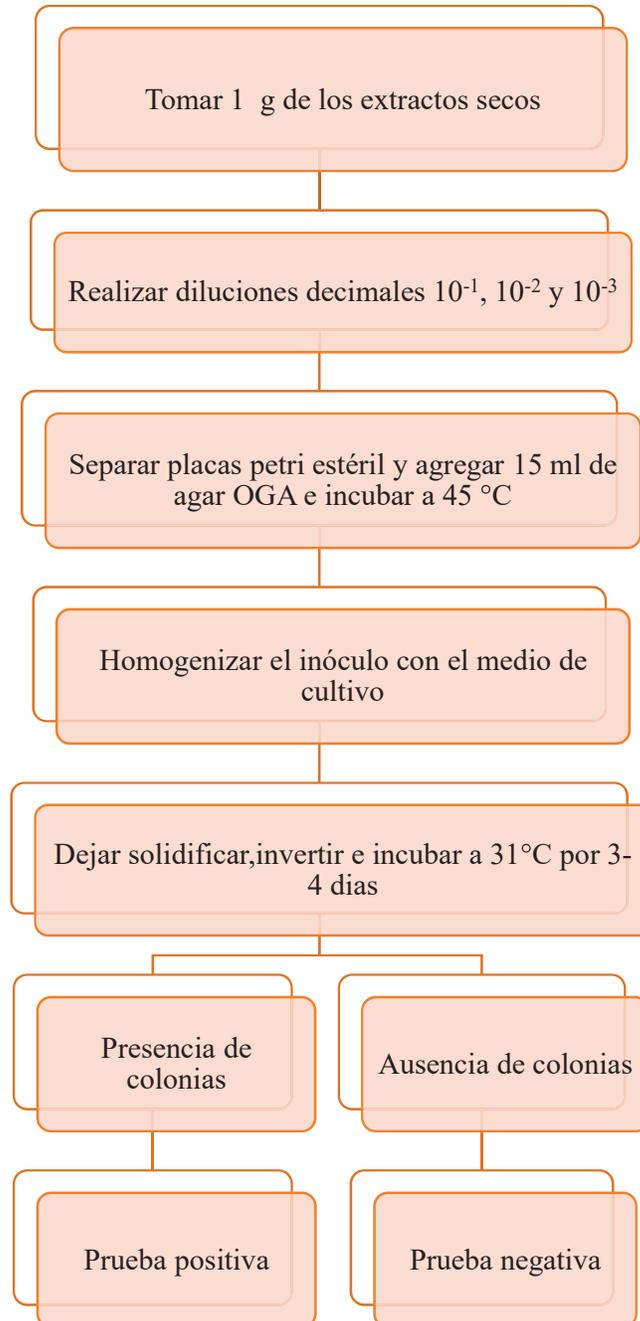
**FLUJOGRAMA N°5: CONTROL DE LOS EXTRACTOS CONCENTRADOS EN
BASE AL CRITERIO DE ALERTA O LÍMITES DE CRITERIO**



Fuente: Elaborado en base a Agurto, S.T.Manual de técnicas en microbiología 1989. (62)

**FLUJOGRAMA N°6: CONTROL DE LOS EXTRACTOS CONCENTRADOS EN
BASE AL CRITERIO IMPERATIVO DE ALERTA O LÍMITES CRÍTICOS.**

(HONGOS Y LEVADURAS)



Fuente: Elaborado en base a Agurto, S.T.Manual de técnicas en microbiología 1989. (62)

3.6.13 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

A. Reactivación de las cepas

Las cepas fueron obtenidas de microbiólogos INS, para su reactivación se recomienda los siguientes agares:

- Agar Trypticasa soya
- Agar Mueller Hinton.

Entonces para *Staphylococcus áureus* y *Escherichia coli* se usó Agar Trypticasa Soya y para favorecer el desarrollo bacteriano el Agar Mueller Hinton.

B. Conservación de las bacterias

Staphylococcus áureus ATCC 25923

La cepa bacteriana se conservó en un tubo con tapa y con 4 ml de Agar Trypticasa Soya en pico de flauta debidamente rotulado y codificado e incubó a 37 ° C x 24 horas, para posteriormente ser conservado a 4 °C en refrigerador y repicado en un medio nuevo cada 15 días para la conservación de la sepa.

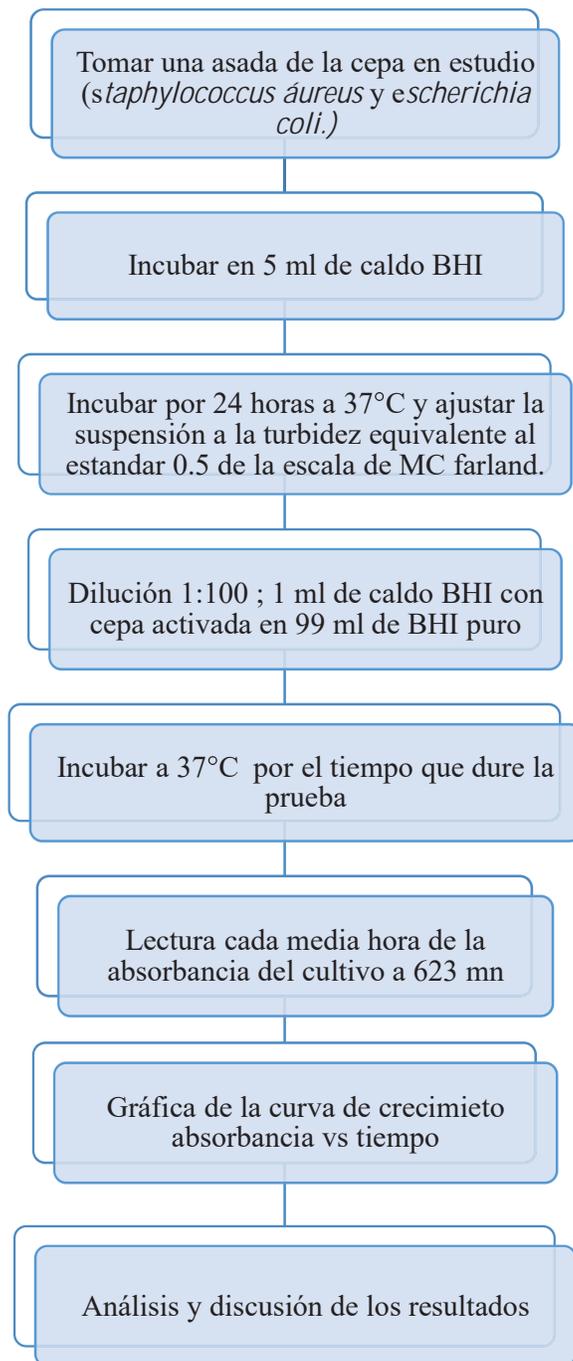
Escherichia coli ATCC 35218

La cepa bacteriana se conservó en un tubo con tapa y con 4 mL de Agar Trypticasa Soya en pico de flauta debidamente rotulado y codificó e incubó a 37 ° C x 24 horas, para posteriormente ser conservada a 4°C en refrigerador y repicado en un medio nuevo cada 15 días para la conservación de la sepa.

C. Estandarización de la curva de crecimiento para *Staphylococcus áureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 35218

Se tomó una asada (2 a 3 colonias) de *Staphylococcus áureus* y *Escherichia coli*. Que se encuentran en estado de conservación en el Agar Trypticasa Soya, y se inoculó en 5 mL de caldo de cultivo BHI y luego se incubó durante 24 horas a 37°C, transcurrido ese tiempo se ajustó la suspensión bacteriana a la turbidez equivalente al estándar 0.5 de la escala MC Farland, inmediatamente después se realizó una dilución de 1/100 tomando 1 mL de este caldo con bacterias y verterlo en un matraz con 99 mL de caldo BHI puro, luego se incubó a 37 °C, la evaluación del crecimiento bacteriano se realizó cada media hora mediante la lectura de absorción del cultivo a una longitud de onda de 623 nm en el espectrofotómetro.

**FLUJOGRAMA N°7 : DE LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA DE
CRECIMIENTO PARA *Staphylococcus aureus* Y *Escherichia coli***



Fuente: Elaborado en base al Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana.INS.2017. (25)

D. Determinación de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos por el método de discos sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

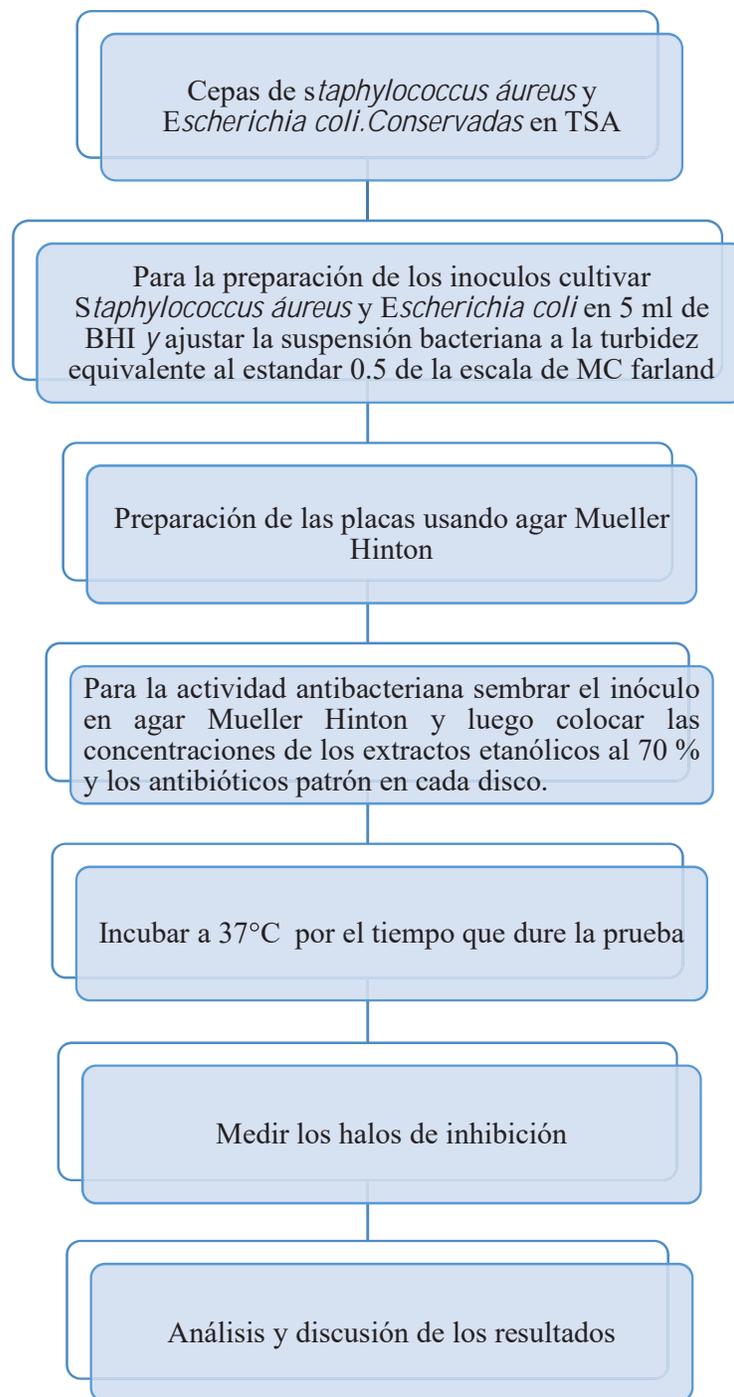
• **Preparación de inóculo:**

Se cultivó las especies bacterianas en estudio en 5 mL de caldo BHI y se incubó a temperatura de 37°C durante un periodo de 7 horas con la finalidad de realizar a partir de este el sembrado en las placas. Además se ajustó la suspensión bacteriana a la turbidez equivalente al estándar 0.5 de la escala de MC Farland.

• **Preparación de las placas Petri y procedimiento.**

- 1) Se preparó las placas Petri que contengan Agar Mueller Hinton con una cantidad de 20 ml aproximadamente.
- 2) Luego de incubó a 37°C por 24 horas para el respectivo control de esterilidad, luego se colocó 3 discos por placa.
- 3) Se elaboró los preparados de las concentraciones de los extractos etanólicos.
- 4) Una vez obtenida la suspensión bacteriana se procedió a la siembra con la ayuda de hisopo estéril, en las placas Muller Hinton ya preparadas.
- 5) Usando una pipeta pasteur se realizó los pozos donde se introdujo los extractos ya preparados y se colocó los discos de sensibilidad de los fármacos patrón, finalmente se incubó a 37°C por 24 horas, luego de este tiempo se midió los halos de inhibición.

FLUJOGRAMA N° 8: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA POR EL MÉTODO DE POZOS EXCAVADOS DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Colletia spinosissima* Y *Caléndula officinalis*



Fuente: Elaborado en base a Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana.INS.2017. (25)

3.6.14 FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DE JABÓN LÍQUIDO

3.6.14.1 INSUMOS:

- Agua destilada
- Glicerina
- Deyton
- Coperland
- EDTA
- Cloruro de sodio
- Methyl parabeno
- Texapom
- Ácido cítrico
- Extracto etanólico al 70 % de la especie vegetal *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula”.

3.6.14.2 MÉTODO OPERATIVO:

1. Se pesó todos los insumos.
2. En un vaso de precipitado se adicionó texapom.
3. Se adicionó agua destilada caliente a una temperatura aproximada de 80°C a 85°C.
4. Se agitó con la ayuda de una bagueta de vidrio hasta completa disolución.
5. Se adicionó coperland y se agitó durante 3- 5 minutos.
6. Se adicionó EDTA
7. Se añadió glicerina y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 24 horas.
8. Se adicionó el extracto etanólico al 70 % de la especie vegetal *Colletia spinosissima* “Roque” / *Caléndula officinalis* “Caléndula” al 70%.
9. Se adicionó cloruro de sodio al 50 %.
10. Se verificó el pH de la muestra. Especificación: 6.5- 7.0
11. Se controló el pH, color y viscosidad.
12. Finalmente se envasó y etiquetó.

3.6.15 CONTROL DE CALIDAD DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO DE *Colletia spinosisissima* / *Caléndula officinalis* al 70%

A. ANALISIS FISICO-QUÍMICO

1. Análisis organoléptico

Procedimiento: Mediante la aplicación de una ficha de control organoléptico del producto, por observación directa. (Anexo N°8)

2. Determinación de la densidad

Método: Picnómetro.

Procedimiento:

1. Se pesó el picnómetro limpio y seco.
2. Se llenó el picnómetro con la muestra líquida.
3. Se pesó el picnómetro lleno
4. Se realizó diferencia de masas (a una temperatura de 25°C.)

$$\delta = \frac{m(\text{diferencia de pesada})}{v(\text{Volumen picnómetro})}$$

Ecuación de determinación de densidad.

Fuente: Sanitaria ANDES. Serie en calidad de cosméticos. ANVISA. 2005 (64)

3. Determinación de la viscosidad

Procedimiento:

- Se realizó mediante el viscosímetro de Brookfield.
- Se tomó 150 mL de muestra y se colocó en un vaso precipitado.
- Se colocó el spink número 3 en el centro del vaso y se aseguró que este en el centro de la sustancia. Ajustó el Spink.
- Se prendió el equipo cerciorándose que este a 30 rpm y a 25°C deje girar de 30 seg. a 1min.
- Se detuvo el quipo y se anotó la lectura de este.

Fuente: Sanitaria ANDES. Serie en calidad de cosméticos. ANVISA. 2005 (64)

4. Determinación del pH

Método: Potenciómetro

Procedimiento:

- Se trasvasó 10 mL de la muestra a un vaso precipitado.
- Se colocó el electrodo del potenciómetro.
- Se realizó la lectura del pH.

Fuente: Sanitaria ANDES.Serie en calidad de cosméticos.ANVISA.2005 (64)

B. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

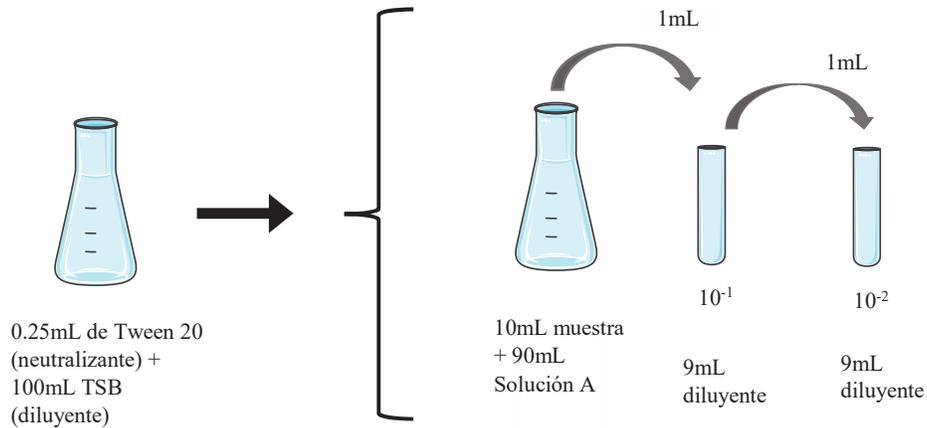
Se realizó el análisis microbiológico, al jabón líquido elaborado con extracto etanólico de Roque /Caléndula, se tomó como referencia la norma sanitaria de la DIGESA.1999

1. Preparación de la muestra

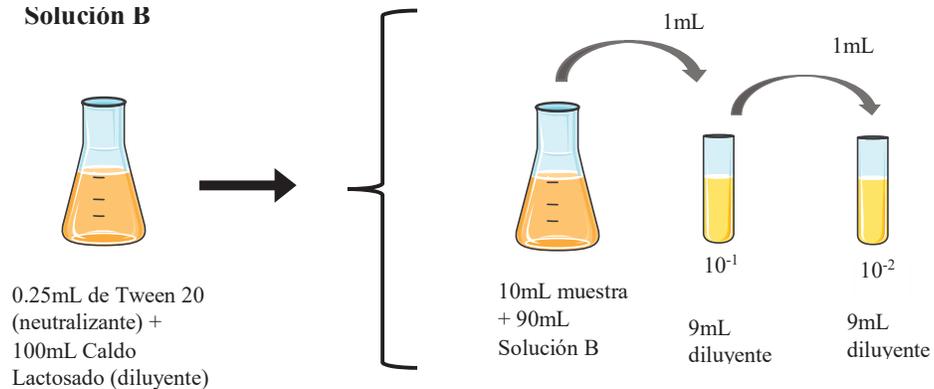
- 1) Se tomó 0.25 mL de Tween 20 y se mezcló con 100mL de TSB (caseína soya), se agitó hasta obtener una dilución homogénea.
- 2) Se tomó 10mL de la muestra y se agregó 90mL de diluyente caseína soya + Tween. Se procedió a agitar 25 veces para obtener una mezcla homogénea la cual es la dilución 10^{-1} . Con una pipeta estéril se tomó 1 mL de la disolución obtenida la cual se agregó en un tubo que contiene 9 mL de caldo caseína soya. Así se obtuvo una dilución 10^{-2} . De esta se tomó 1 mL con una pipeta estéril se agregó en un tubo que contiene 9mL de caldo Caso obteniendo la dilución 10^{-3} .
- 3) Se tomó 0.25 mL de Tween 20 y se mezcló con 100 mL de caldo lactosado (caseína soya), se agitó hasta obtener una dilución homogénea.
- 4) Se tomó 10 mL de la muestra y se agregó 90 mL de caldo lactosado y se realizó las demás disoluciones (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3})

ESQUEMA N°1: PREPARACIÓN DE LA MUESTRA PARA EL ANÁLISIS MICROBIOLÓGICO

Solución A



Solución B



Fuente: Elaborado en base a Torres R.M.L. Control microbiológico de materias primas y productos farmacéuticos no esteriles. 2009. (63)

2. Presencia de aerobios mesófilos viables

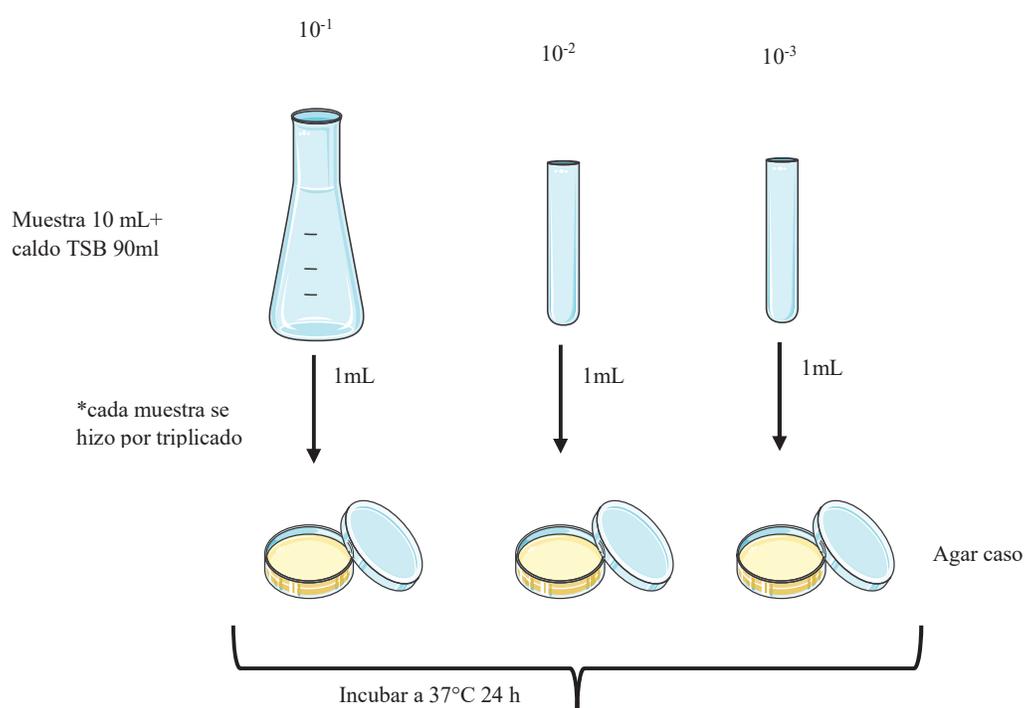
Método: Recuento en la placa por siembra en todo el medio.

Procedimiento:

- 1) Se pipeteó 1 mL de cada una de las diluciones realizadas en caldo caso (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) en placas Petri, por triplicado.
- 2) Luego se añadió en cada una de las placas 15 mL de agar caso
- 3) Templado a 44 - 46°C.
- 4) Se mezcló el inóculo con el medio fundido, mediante movimiento de vaivén. Una secuencia satisfactoria de pasos es la siguiente: Se movió la placa de arriba abajo,

- de derecha a izquierda en una sola dirección. Se hizo rotar la placa en el sentido de las agujas del reloj y en sentido contrario a las agujas del reloj.
- 5) Se incubaron las placas invertidas a 37°C durante 24 – 48 horas.
 - 6) Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó la lectura de las placas.
 - 7) Se expresó el número de microorganismos aerobios mesófilos por gramo de muestra (ufc/g mL), multiplicando el número de colonias por la dilución correspondiente.

ESQUEMA N° 2: RECuento DE MICROORGANISMOS *Aerobios mesófilos*.



Recuento de microorganismos.

Fuente: Elaborado en bases a Torres R.M.L. Control microbiológico de materias primas y productos farmacéuticos no estériles. 2009. (63)

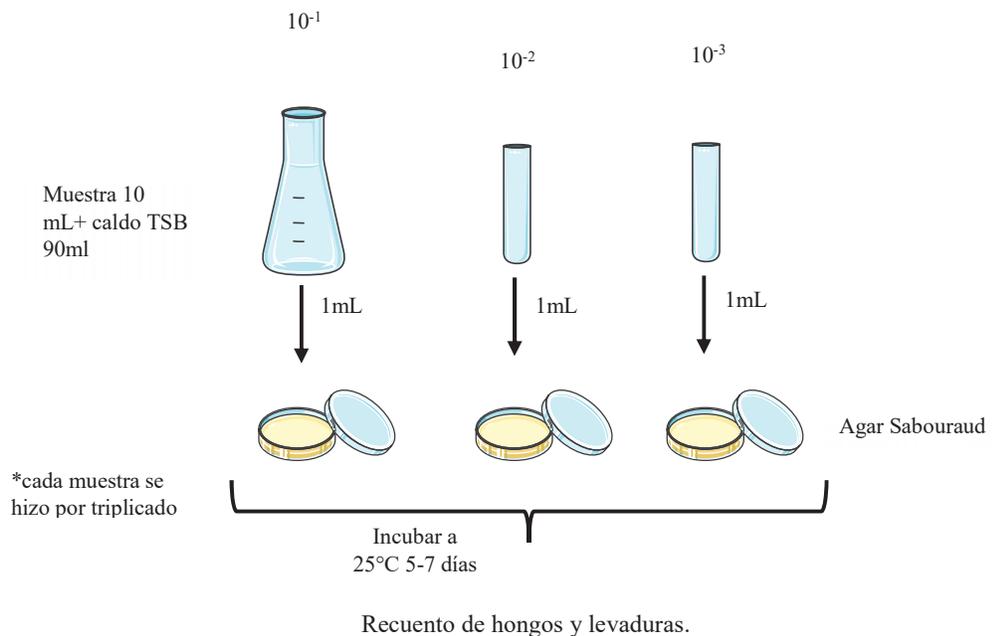
3. Recuento de hongos y levaduras

Método: Siembra por difusión.

Procedimiento:

- 1) Se tomó 1mL de cada una de las diluciones realizadas en caldo caso y se colocó en cada placa de Petri, enseguida se añadió a cada placa de Petri 15mL o 20mL de agar Sabouraud, a no más de 45°C. se preparó tres placas por dilución.
- 2) Se incubaron las placas invertidas a una temperatura de 20 a 25°C durante 5 a 7 días.
- 3) Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el conteo, se seleccionó las placas correspondientes a una dilución que muestre el mayor número de colonias pero no menos de 100 colonias.
- 4) Se expresó el número de hongos y levaduras por gramo o mL de muestra (ufc/g o mL, multiplicando el número de colonias por la dilución correspondiente, de acuerdo a las recomendaciones de las ICMSF).

ESQUEMA N° 3: RECUENTO DE HONGOS Y LEVADURAS.



Fuente: Elaborado en base a Torres R.M.L. Control microbiológico de materias primas y productos farmacéuticos no estériles. 2009. (63)

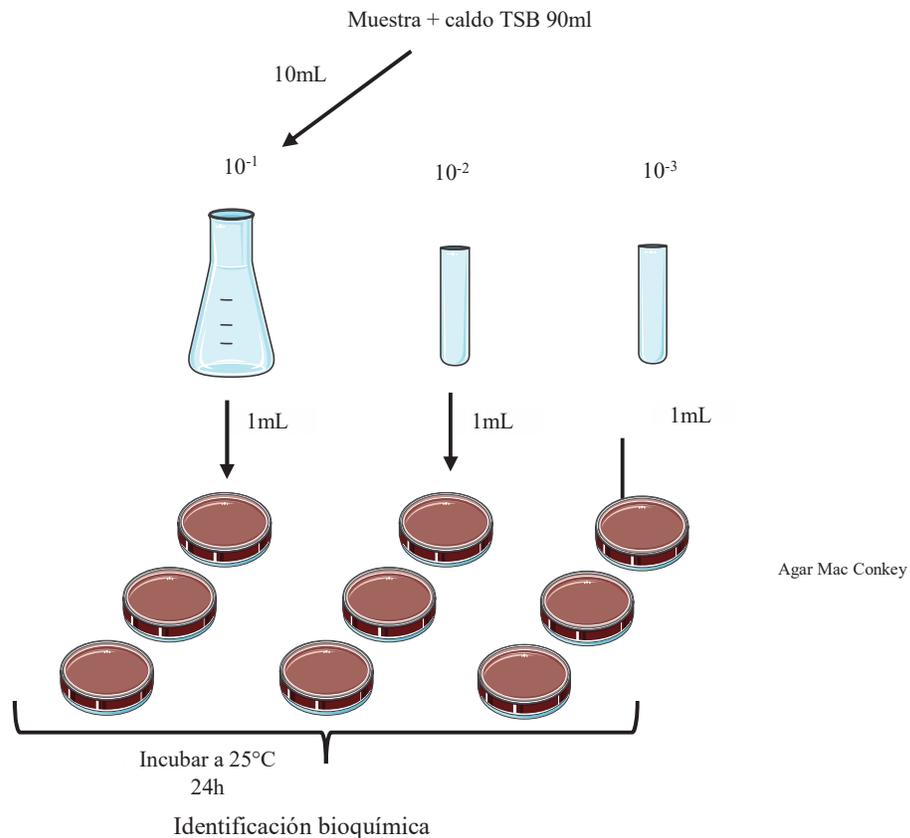
4. Recuento de *Escherichia coli*

Método: Recuento en la placa por siembra en todo el medio.

Procedimiento:

- 1) Luego de haber sido incubadas por 24 horas a 37°C las diluciones realizadas en caldo lactosado, se realizó la siembra de cada dilución (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}) mediante una asa de siembra por estrías hasta agotamiento en placas que contenían Agar Mac Conkey, cada dilución se trabajó por triplicado.
- 2) Se incubaron las placas invertidas a 37°C durante 24 – 72 horas.
- 3) Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el conteo de las placas correspondientes a una dilución que presentan entre 30 y 300 colonias.

ESQUEMA N° 4: RECuento DE *Escherichia coli*.



Fuente: Elaborado en base a Torres R.M.L. Control microbiológico de materias primas y productos farmacéuticos no esteriles. 2009. (63)

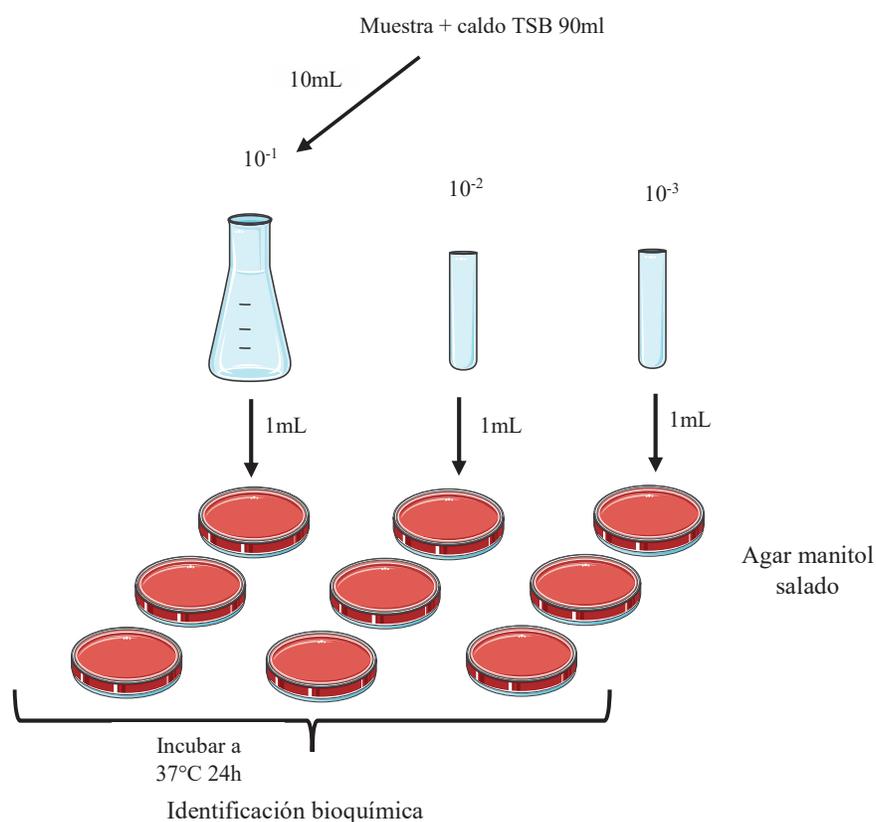
5. Recuento de *Pseudomonas aeruginosa*

Método: Recuento en la placa por siembra en todo el medio.

Procedimiento:

- 1) Luego de haber sido incubadas por 48 horas a 37°C las diluciones realizadas con caldo caso, se realizó la siembra de cada dilución (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), mediante un asa de siembra por estrías hasta agotamiento en placas que contenían agar manitol salado. Cada dilución se trabajó por triplicado.
- 2) Se incubaron las placas invertidas a 37°C durante 24 – 72 horas.
- 3) Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizó el conteo de colonias. Las lecturas se realizó a las 24 y 48 horas.

ESQUEMA N° 5: RECuento DE *Pseudomonas aeruginosa*.



Fuente: Elaborado en base a Torres R.M.L. Control microbiológico de materias primas y productos farmacéuticos no estériles. 2009. (63)

6. Recuento de *Staphylococcus aureus*

Método: Por siembra en placa en todo el medio.

Procedimiento:

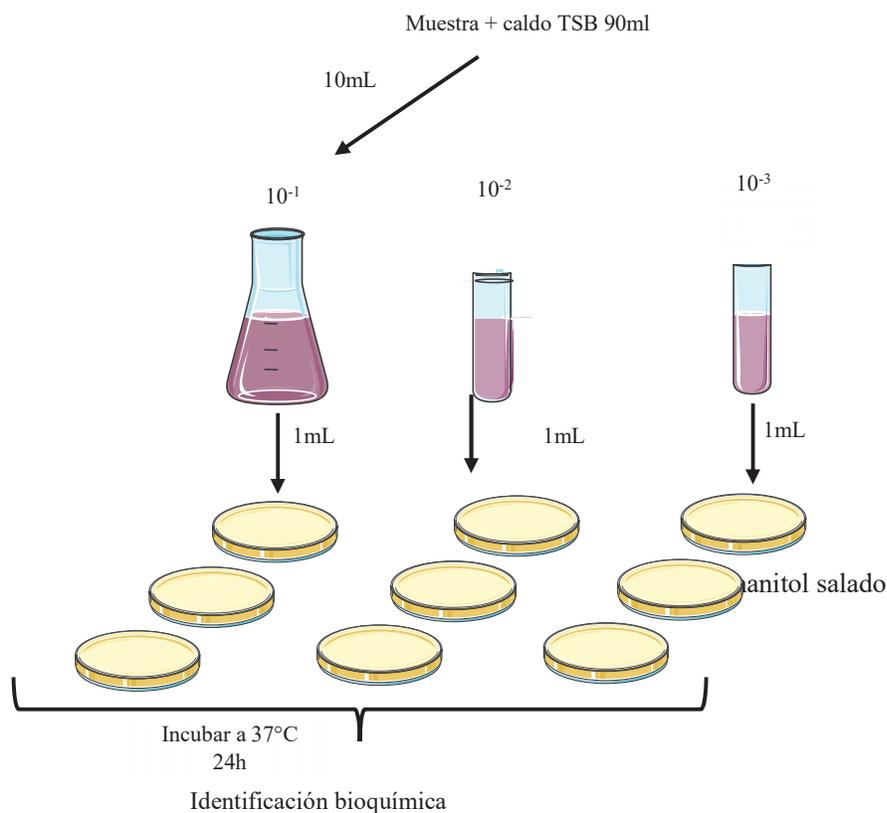
- 4) Luego de haber sido incubadas por 48 horas a 37°C las diluciones realizadas con caldo caso, se realizó la siembra de cada dilución (10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3}), mediante un asa de siembra por estrías hasta agotamiento en placas que contenían agar manitol salado. Cada dilución se trabajó por triplicado.
- 5) Se incubaron las placas invertidas a 37°C durante 24 – 72 horas.
- 6) Una vez transcurrido el tiempo de incubación, realizar el conteo de colonias, realizar las lecturas a las 24 y 48 horas.

6.1 Identificación de *S. aureus* (coagulasa positiva):

Una vez realizada el recuento, se aíslan algunas colonias características (color amarillo), repicando en agar Chapman.

- 1) Se incuban las placas a 37°C por 24 horas.
- 2) Se toman las colonias características de color amarillo para realizar la coloración de Gram (cocos Gram positivos en racimos) y la prueba de la catalasa
- 3) Dichas colonias repicar en agar manitol salado y agar sangre.
- 4) Incubar las placas a 37°C por 24 – 48 horas.
- 5) Culminado el tiempo de incubación, tomar en cuenta las colonias presuntivas de *S. Aureus* (aquellas que harán virar del medio de cultivo a amarillo en agar manitol salado y presentaron B-hemolisis en agar sangre) para realizar la prueba de la coagulasa.

ESQUEMA N° 6: RECUENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Staphylococcus aureus*.



Fuente: Elaborado en base a Torres R.M.L. Control microbiológico de materias primas y productos farmacéuticos no esteriles. 2009. (63)

3.6.16 ESTABILIDAD DEL PRODUCTO.

Se tomó como referencia la Guía de estabilidad de ANVISA para cosméticos, volumen 1, mayo 2005. (ANVISA- BRASIL). (64)

Procedimiento:

- 1) Se colocaron 3 muestras de jabón líquido elaborado con extracto etanólico de Roque /Caléndula a cada una de las condiciones de 40°C, 4°C y 25°C, por un periodo de 15 días.
- 2) En el estudio de estabilidad preliminar se evaluó el análisis organoléptico, pH y viscosidad de las muestras en diferentes periodos de tiempo y condiciones.

3.6.17 MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

Actualmente existen varios métodos para la evaluación de la actividad antimicrobiana y antimicótica de las plantas medicinales, pero los más utilizados son los métodos de difusión y dilución. Estos dos métodos pueden variar dependiendo de varios factores tales como: composición del medio de cultivo, microorganismos de prueba, método de

extracción, pH, y otros, que afectan los resultados obtenidos. Se han minimizado estas variaciones, realizando ambos métodos en condiciones estándar. Se han propuesto modificaciones de los métodos, con el fin de mejorar los resultados, tomando en cuenta que los principios básicos son los mismos. (65)

MÉTODO DE DIFUSIÓN AGAR

El antibiograma por el método de difusión en agar es una prueba en la que se enfrenta la bacteria inoculada sobre la superficie de un medio de agar a una solución antibiótica absorbida en discos de papel filtro o en pastillas. Este método fue estandarizado y los halos de inhibición obtenidos, correlacionados con la CMI por Bauer y cols., en 1966. Este estudio dio lugar al método de Kirby- Bauer, que es el recomendado por la Food and Drug Administration (FDA) y el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS), aunque con ligeras modificaciones.

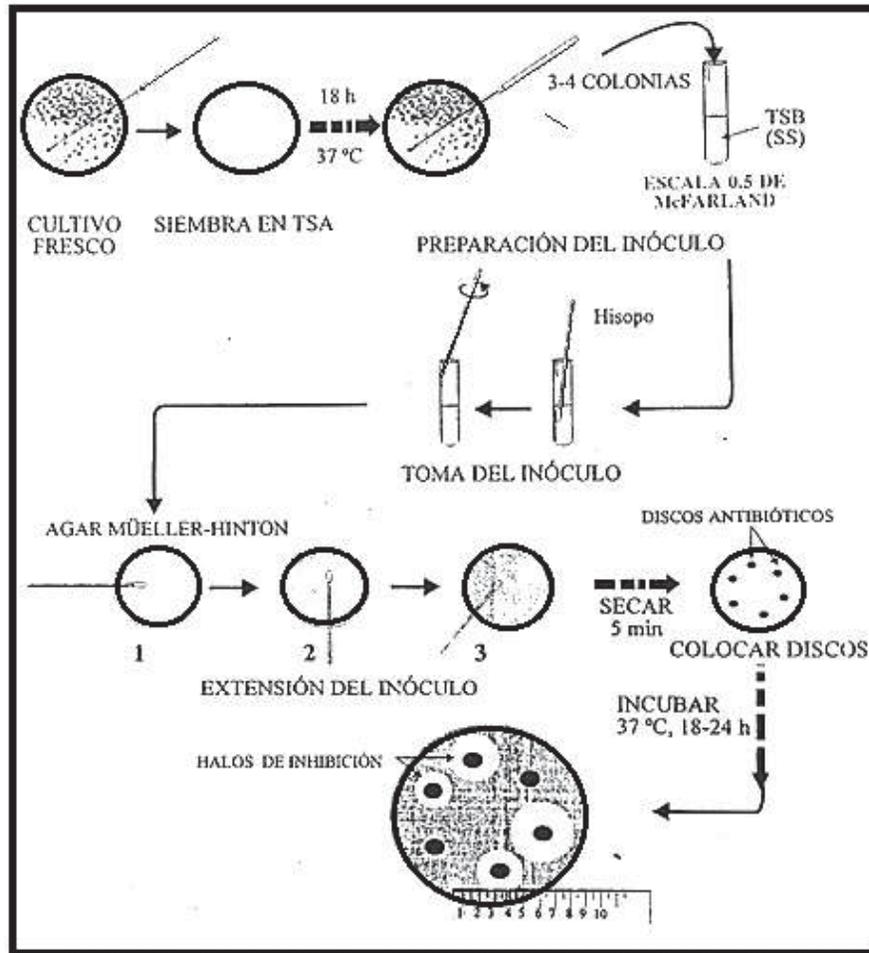
El medio de cultivo más frecuentemente empleado es el de Müeller- Hinton, que permite el crecimiento de casi todas las bacterias. Este medio puede ser suplementado con un 5% de sangre desfibrinada de caballo, oveja u otro animal, cuando la bacteria lo requiera para su desarrollo. El pH del medio debe estar entre 7.2 y 7.4, y el grosor, entre 4 y 6 mm. Los discos de antibióticos son adquiridos comercialmente, aunque también pueden ser preparados. Deben contener la cantidad establecida de antibiótico y ser conservados a 4°C protegidos de la humedad.

El inóculo bacteriano debe tener una turbidez similar al 0.5 de la escala de McFarland, aproximadamente 10^8 UFC/ml, y se prepara en solución salina estéril o caldo de cultivo. La inoculación se puede efectuar con hisopo de algodón estéril.

Las placas se deben incubar a 37°C en atmosfera aerobia. Se debe evitar en lo posible la incubación en presencia de CO₂, ya que modifica el pH del medio y esto puede afectar la actividad de algunos antibióticos.

La lectura se debe realizar entre 18 y 24 horas. Este método es adecuado únicamente para bacterias patógenas de crecimiento rápido. Una incubación más prolongada puede dar lugar a interpretaciones erróneas del halo de inhibición. (37)

FIGURA N°7: ANTIBIOGRAMA.



Fuente: Adaptado de Deacon, J. W. 1993. (66)

3.6.18 PREPARACIÓN DEL INÓCULO

Se retiró la cepa a trabajar de la refrigeradora, por lo menos 15 minutos antes de trabajar, para que este pueda estar a temperatura ambiente. (23)

3.7 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

a. TÉCNICA

En el presente proyecto de investigación se realizó la recolección de datos utilizando la técnica de observación experimental mediante instrumentos como cámara fotográfica y fichas de recolección de datos.

b. INSTRUMENTOS

- Para la determinación del porcentaje de humedad
Anexo N°1
- Para la determinación del porcentaje de extracción
Anexo N° 2
- Para las pruebas de solubilidad
Anexo N°3
- Para el análisis fitoquímico cualitativo
Anexo N°4
- Para la medición de los halos de inhibición de los extractos
Anexo N°5

3.8 TÉCNICAS PARA EL PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.

Para el análisis de los datos que se obtendrán en la determinación de la actividad antibacteriana de las especies vegetales Roque y Caléndula se utilizó el paquete estadístico R versión 3.5.3 R Commander versión 2.5-2 PSPP versión 1.2.0.

Para el procesamiento de variables cuantitativas se realizará mediante el análisis de la varianza ANOVA y la prueba de HSD de Tukey con el 95 % de confianza y coeficiente de correlación de Pearson.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

4.1 RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

La especie vegetal *Colletia Spinosissima* “Roque” fue recolectada en el mes de Enero del 2019 en la localidad de Ccolcca, distrito de Ocongate, provincia de Quispicanchis, departamento de Cusco a una altura aproximada de 3942 m.s.n.m.

La especie vegetal *Caléndula officinalis* “Caléndula” fue recolectada en el mes de Enero del 2019 en la localidad de Jullicunca, distrito de Ocongate, provincia de Quispicanchis, departamento de Cusco a una altura aproximada de 3788 m.s.n.m.

4.2 SECADO DE LA PLANTA

Toda la especie vegetal recolectada fue seleccionada, separando los tallos y flores en mal estado, con plagas o dañadas y posteriormente se procedió a su secado.

4.3 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD

TABLA N° 11: RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” Y *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA”

<i>Colletia spinosissima</i> “ROQUE”				
N° DE DETERMINACIONES	PESO DE LA MUESTRA FRESCA	PESO DE LA MUESTRA SECA	% DE HUMEDAD	PROMEDIO DEL % DE HUMEDAD
1	5.021	0.998	80.12 %	80.18 %
2	5.013	0.987	80.31 %	
3	5.002	0.994	80.12 %	
<i>Caléndula officinalis</i> “CALÉNDULA”				
N° DE DETERMINACIONES	PESO DE LA MUESTRA FRESCA	PESO DE LA MUESTRA SECA	% DE HUMEDAD	PROMEDIO DEL % DE HUMEDAD
1	5.014	1.093	78.20	78.14 %
2	5.003	1.097	78.07	
3	5.010	1.095	78.14	

Fuente: Datos experimentales del estudio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N°11, se muestran los resultados del porcentaje de humedad de las especies vegetales: *Colletia spinosissima* “Roque” es de 80.18%, y *Caléndula officinales* “Caléndula” es de 78.14%, valores que reflejan un alto contenido de agua en las especies en estudio.

El contenido de humedad determina la actividad fisiológica y bioquímica en la planta, por lo tanto la determinación del porcentaje de humedad es un parámetro indicador de la cantidad relativa de agua, sustancias que participan en los procesos de degradación de los metabolitos con acción de enzimas.

Por ello el proceso de secado es de suma importancia, porque además de lo ya mencionado el porcentaje de humedad es un factor para el desarrollo de bacterias, hongos y la producción de reacciones de oxidación e hidrólisis que son los principales causales de descomposición o alteración de los metabolitos presentes en la planta. (50)

Según **Amaguaña Rojas 2018** y **Churuchumbi Rojas, 2018** en su estudio estandarización fitoquímica del extracto de *Caléndula officinalis* “Caléndula” realizado en Quito Ecuador, donde determinó el porcentaje de humedad presentando un 81.67 %. El cual es mayor al porcentaje de humedad obtenido en nuestra planta de 78.14 %, que podría ser un valor que puede determinar ciertas diferencias entre la especie por ubicación geográfica. (58)

4.4 DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN

TABLA N° 12: RESULTADOS DEL PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” Y *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA”

PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN	PESO DE LA MUESTRA MOLIDA (g)	PESO DEL EXTRACTO SECO (g)	PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN (%)	PROMEDIO DEL % DE EXTRACCIÓN
<i>Colletia spinosissima</i> “ROQUE”	200	29.74	14.87	14.62 %
	200	28.91	14.45	
	200	29.09	14.54	
<i>Caléndula officinalis</i> “CALÉNDULA”	100	15.34	15.34	14.53 %
	100	14.03	14.03	
	100	14.21	14.21	

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

La tabla N°12, nos presenta el porcentaje de extracción obtenida por maceración de los tallos de *Colletia spinosissima* “Roque” con etanol de 70° hasta agotamiento; resultando 14.62% y para las flores de *Caléndula officinalis* “Caléndula” en 14.53%. Con lo cual concluimos que las especie vegetales de Roque y Caléndula presentan un porcentaje de extracción similar.

Velazco G.2018. Determinó el porcentaje de rendimiento de extracción de los extractos etanólicos al 96 % de *Caléndula officinalis*, el cual fue 29.4%. Estos resultados son superiores a los obtenidos en esta investigación. [20] Estas diferencias podrían estar relacionadas con la época del año en la cual la planta fue recolectada, ya que los cambios estacionales como temperatura , humedad, longitud de luz, y sumado a esto las condiciones del suelo generan en la planta un estrés oxidativo que produce cambios en la producción de metabolitos. Según **Ortiz MD.2014.** (59)

Efstratios E.y Roopashree TS.2017. Quienes determinaron el porcentaje de rendimiento de la *Calendula officinalis* por el método de maceración, reportando un porcentaje de rendimiento de 19.8 y 19.5 respectivamente. Siendo estos resultados superiores a los obtenidos en este estudio. (67)

Se puede concluir que el porcentaje de rendimiento de estas especies vegetales provenientes de la localidad de Ocongate posee menor porcentaje de rendimiento

respecto a los antecedentes, posiblemente se deba a la época del año de recolección, temperatura, humedad, tipo de suelo y ubicación geográfica.

4.5 DETERMINACIÓN DE LAS PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Para la determinación de las pruebas de solubilidad de los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” se utilizaron diferentes solventes de diferente polaridad obteniéndose los siguientes resultados:

TABLA N° 13: RESULTADOS DE LA SOLUBILIDAD DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70% DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” y *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA”

SOLVENTE	<i>Colletia spinosissima</i> “ROQUE”	<i>Caléndula officinalis</i> “CALÉNDULA”
Agua destilada	+++	++
Metanol	++	++
Etanol 40 %	+++	+++
Etanol 70 %	++	+++
Etanol 96 %	+	+
Acetona	+	-
Acetato de etilo	-	-
Cloroformo	-	-
Hexano	-	-

Fuente: Datos experimentales del estudio.

DONDE:

- +++ = Muy soluble
- ++ = Soluble
- + = Poco soluble
- = Insoluble

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N°13, se muestra los resultados del extracto etanólico al 70%, de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” frente a diferentes solventes de polaridad descendente.

Se observa que el extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque es muy soluble en solventes polares agua destilada, etanol al 40%, soluble en etanol 70%, poco soluble en etanol 96% y acetona e insoluble en acetato de etilo, cloroformo y hexano. Lo que indica que en el proceso de extracción se obtuvieron metabolitos polares y además se deduce que el extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” presenta naturaleza polar.

Se observa que el extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula” es muy soluble en solventes polares etanol al 40% y etanol 70%, soluble en agua destilada y metanol y poco soluble en etanol 96% e insoluble en acetona, acetato de etilo, cloroformo y hexano. Lo que indica que en el proceso de extracción se obtuvieron metabolitos polares y además se deduce que el extracto etanólico al 70% *Caléndula officinalis* “Caléndula” presenta naturaleza polar, por lo que el extracto más favorable en cuanto a su solubilidad viene a ser el de 40% y 70%.

Según **Sarmiento Pérez, Olga Isabel, 2016**. Mencionan que: El aceite esencial de *Caléndula officinalis*, “Caléndula” es muy soluble en hexano, diclorometano y soluble en etanol; para determinar el índice de refracción de la mezcla aceite-solvente por unidad de tiempo. (68)

Según estos resultados obtenidos, los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* y *Caléndula officinalis* son solubles en solventes polares al igual que los antecedentes mencionados.

4.6 ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

Los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” en los cuales se obtuvieron los siguientes resultados.

**TABLA N° 14: RESULTADOS DEL ANÁLISIS FITOQUÍMICO
CUALITATIVO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70% DE *Colletia
spinosissima* “ROQUE” y *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA”**

METABOLITOS SECUNDARIOS	REACTIVO	EXTRACTOS ETANÓLICOS	
		<i>Colletia spinosissima</i> “ROQUE”	<i>Caléndula officinalis</i> “CALÉNDULA”
Flavonoides	Reacción de Shinoda	+++	+++
Compuestos Fenólicos	Cloruro Férrico 1%	+++	+++
Taninos	Gelatina	++	++
Quinonas	Reacción de Bornträger	+++	+++
Glicósidos	Reacción de Molish	+++	++
Azúcares reductores	Fehling A y Fehling B	++	+++
Lactonas	Reacción de Baljet	++	+
Alcaloides	Reacción de Dragendorff	+	++
Aminoácidos	Reacción con Ninhidrina	++	+
Esteroides	Reacción de Liebermann- Burchard	+++	+
Saponinas	Prueba de espuma	+++	+

Fuente: Datos experimentales del estudio.

DONDE:

+++ = Abundante cantidad

++ = Regular cantidad

+ = Poca cantidad

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N°14, se observa que:

El extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque”, tiene abundante cantidad de Flavonoides, Compuestos Fenólicos, Quinonas, Glicósidos, y saponinas esteroidales; presenta en regular cantidad taninos, azúcares reductores, lactonas y aminoácidos; poca cantidad de alcaloides.

El extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula”, tiene abundante cantidad de Flavonoides, Compuestos Fenólicos, Quinonas y azúcares reductores; presenta en regular cantidad taninos, glicosidos y alcaloides; poca cantidad de lactonas, aminoácidos y saponinas.

Según **Herrera Matos, Salonida Beatriz, 2015**. Mencionan que: El extracto etanólico de la corteza y brotes tiernos de *Colletia spinosissima* *J.Gmelin* presenta metabolitos secundarios; Conteniendo abundante cantidad de saponinas y carbohidratos, regular cantidad de alcaloides, poca cantidad de taninos, flavonoides y ausencia de quinonas. (11)

Según **Lic. Valdés, et al 2015**. Mencionan que: Los extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo), contienen metabolitos secundarios de elevado interés farmacológico; conteniendo abundante cantidad de saponinas (sobre todo en fruto), flavonoides, azúcares reductores y compuestos fenólicos; regular cantidad de alcaloides y poca cantidad de estructuras polisacarídicas. (65)

Según **Lastra Valdés, Humberto y Piquet García, Rosario, 2017**. Mencionan que la Caléndula contiene 0,078 y 0,017 % de carotenoides totales en las flores liguladas y de los compuestos identificados se encuentran a, b, y g -caroteno, violaxantina, rubixantina, citroxantina, flavocromo, flavoxantina, galenina, luteína, licopeno, valentioxantina, auroxantina, microxantina, 5,6 epoxicaroteno, b-zeacaroteno, mutatoxantina y lutein epóxido, también triterpenos. (69)

Se concluye que los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* y *Caléndula officinalis* presenta en mayor cantidad compuestos fenólicos, flavonoides y quinonas, además presentando mayor cantidad de saponinas triterpenicas *Colletia spinosissima*, en comparación a los antecedentes con resultados similares.

4.7 ENSAYO DE RECONOCIMIENTO DE SAPONINAS

TABLA N° 15: RESULTADOS DEL ENSAYO DE RECONOCIMIENTO DE SAPONINAS

PRUEBA	EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE <i>Colletia spinosissima</i> “ROQUE”	EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE <i>Caléndula officinalis</i> “CALÉNDULA”
Ensayo de espuma	+++	+
Ensayo de hemólisis	+++	-
Lieberman burchard (triterpenos y/o esteroides)	+++	+
Salkowsky	+++	+

Fuente: Datos experimentales del estudio.

DONDE:

+++ = Abundante cantidad.

++ = Regular cantidad.

+ = Poca cantidad.

- = Ausencia.

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N° 15, se observa que:

El extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque”, presenta abundante cantidad de saponinas, mediante el ensayo de espuma, hemólisis, Lieberman-Bourchard y Salkowsky.

El extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula”, presenta poca cantidad de saponinas, mediante el ensayo de espuma, Lieberman-Bourchard y Salkowsky y ausencia mediante el ensayo de hemólisis.

Según **Herrera Matos, Salonida Beatriz 2015**. Mencionan que: el extracto etanólico de la corteza y brotes tiernos de *Colletia spinosissima* J. Gmelin, presenta abundante cantidad de saponinas mediante el ensayo de espuma. (11)

Según Hernández Guzmán, Astrid Carolina y Hermosilla Carazo, Virginia Jeannette, 2014. Mencionan que: La presencia de saponinas, se realiza mediante la prueba de espuma, y el método de hemólisis. (55)

Se concluye *Colletia spinosissima* presenta mayor cantidad de saponinas y *Caléndula officinalis* en menor porcentaje siendo estos datos similar a los antecedentes nombrados.

4.8 RESULTADOS DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70% DE *Colletia spinosissima* "ROQUE" y *Caléndula officinalis* "CALENDULA"

TABLA N° 16: RESULTADOS DEL CONTROL MICROBIOLÓGICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS AL 70% DE *Colletia spinosissima* "ROQUE" Y *Caléndula officinalis* "CALENDULA"

CRITERIOS	BACTERIAS Y HONGOS	EXTRACTO ETANÓLICO AL 70%	RESULTADO
CRITERIO IMPERATIVO: La presencia de este microorganismo indica riesgo elevado, la prueba debe resultar negativa	<i>Salmonella</i>	<i>Colletia spinosissima</i> "Roque"	Ausencia
		<i>Caléndula officinalis</i> "Caléndula"	Ausencia
CRITERIOS INDICATIVOS DE HIGIENE: Su presencia indica la deficiencia de higiene del producto y por lo tanto puede rechazarse.	Coliformes fecales (<i>Escherichia coli</i>)	<i>Colletia spinosissima</i> "Roque"	Ausencia
		<i>Caléndula officinalis</i> "Caléndula"	Ausencia
CRITERIOS DE ALERTA O LÍMITES CRÍTICOS: El producto no debe de exceder los límites específicos	Aeróbios mesófilos, hongos y levaduras	<i>Colletia spinosissima</i> "Roque"	Ausencia
		<i>Caléndula officinalis</i> "Caléndula"	Ausencia

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En la tabla N°16, se observan los resultados del control microbiológico que se realizó a los extractos etanólicos al 70%, de los tallos de *Colletia spinosissima* “Roque” y las flores de *Caléndula officinalis* “Caléndula”.

Los resultados obtenidos indican que los extractos están libres de contaminación, usando los criterios que se encuentran dentro de los límites de conteo de calidad a nivel microbiológico indicado por la DIGESA y el MINSA, lo cual indica que los extractos están aptos para el ensayo de la actividad antibacteriana in vitro y para la formulación de los jabones líquidos.

4.9 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

4.9.1 ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO PARA

Escherichia coli ATCC 35218

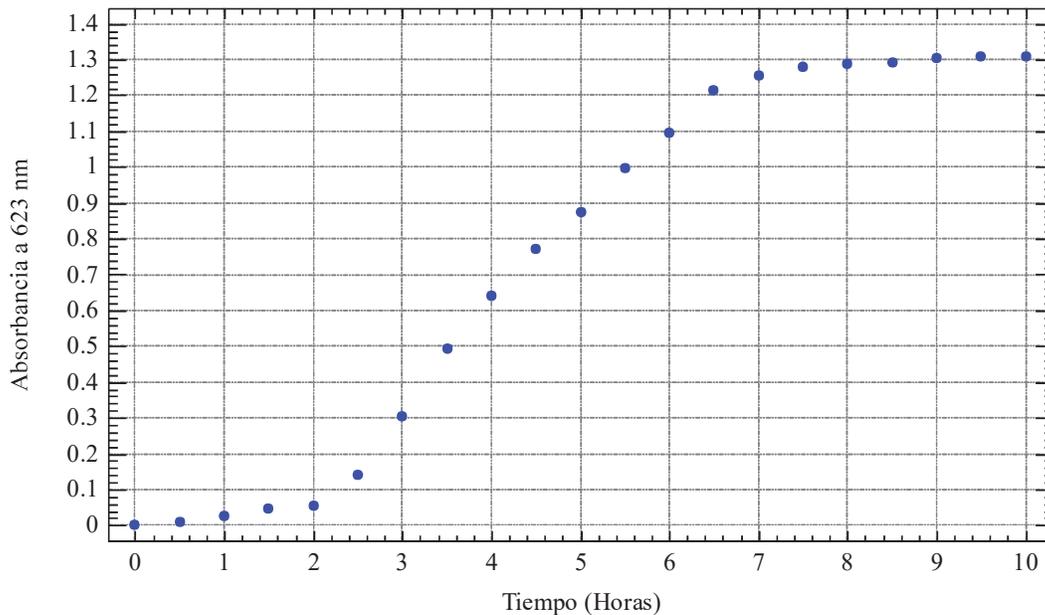
TABLA N° 17: ABSORBANCIA PARA LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO PARA *Escherichia coli* ATCC 35218

TIEMPO (HORAS)	ABSORBANCIA (A 623 nm)*
0.5	0.010
1.0	0.025
1.5	0.045
2.0	0.054
2.5	0.141
3.0	0.305
3.5	0.495
4.0	0.642
4.5	0.770
5.0	0.876
5.5	0.996
6.0	1.096
6.5	1.214
7.0	1.255
7.5	1.279
8.0	1.290
8.5	1.292
9.0	1.303
9.5	1.310
10.0	1.310

Fuente: Datos experimentales del estudio.

(*) = Promedio de tres medidas de absorbancias.

GRÁFICO N° 1: CURVA DE CRECIMIENTO PARA *Escherichia coli* ATCC 35218.



Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

En el gráfico N°1, se puede observar el desarrollo de la bacteria en estudio *Escherichia coli* ATCC 35218; donde se aprecia la curva de crecimiento celular y se puede reconocer las fases de crecimiento como son la fase de latencia, la fase exponencial y la fase estacionaria.

En la cual se observa que la cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218 se adaptó al medio de cultivo en un tiempo de 2 horas esta fase es la llamada fase de latencia; la fase exponencial de crecimiento está entre 2 y 7.5 horas, en esta fase es donde la cepa ya está adaptada a su ambiente por lo que presenta un crecimiento acelerado; entre las 8 y 10 horas se puede observar la fase estacionaria ,donde los nutrientes del medio se está agotando ,y además existe la acumulación de los desechos metabólicos de la bacteria. Este grafico es semejante a la curva de crecimiento bacteriano típica de una población bacteriana según **Madigan ,Martinko, Dunlap y Clark 2014. (70)**

4.9.2 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA FRENTE A CEPAS

DE *Escherichia coli* ATCC 35218

4.9.2.1 DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CMI) POR DILUCIÓN EN CALDO DE *Colletia spinosissima* “ROQUE”

Del ensayo estandarizado para hallar la CMI por dilución en caldo.

Aplicando la fórmula de estandarización, $F = \sqrt[3]{I}$, para hallar el factor de incremento F, basándonos en los resultados de la prueba piloto, se obtuvo un valor F= 1.49. Con este valor se determinaron las concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” para aplicar en el ensayo de CIM por dilución en caldo

TABLA N°18: CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” PARA EL ENSAYO DEL CMI

PROCEDIMIENTO	N° DE CONCENTRACIONES	RESULTADOS (mg/mL)
Concentración mínima	C1	6.25
C1 *F	C2	9.29
C2 *F	C3	13.80
C3 *F	C4	20.51
C4 *F	C5	30.48
C5 *F	C6	45.29
C6 *F	C7	67.30
C7 *F	C8	100.0

Fuente: Datos experimentales de estudio.

INTERPRETACIÓN:

La Tabla N°18, muestra concentraciones de trabajo en creciente proporción geométrica respecto a las usadas para el ensayo piloto. Estas nuevas concentraciones fueron usadas para determinar la concentración inhibitoria mínima del extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” frente a la cepa de estudio, por el método de dilución en caldo.

TABLA N°19: RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A *E. coli*

N° TUBOS	CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO (mg/mL)	TURBIDEZ	PRESENCIA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.
1	3.21	+	Crecimiento bacteriano
2	6.25	-	Ausencia
3	9.29	-	Ausencia
4	13.80	-	Ausencia
5	20.51	-	Ausencia
6	30.48	-	Ausencia
7	45.29	-	Ausencia
8	67.30	-	Ausencia
9	100.0	-	Ausencia

Fuente: Datos experimentales del estudio.

DONDE:

(+) =Turbio

(-) =Sin turbidez

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADO

Los tubos fueron incubados a 37 °C durante 24 horas, al cabo de las cuales se obtuvo turbidez en el tubo 1(relacionado al crecimiento bacteriano).Hay translucidez desde el tubo 2 hasta el 9 (no hay crecimiento bacteriano apreciable), todo esto nos puede indicar que el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se ubica en el tubo 2 a una concentración de 6.25 mg/mL.

Según **Avellana et al. 2005**, una cepa bacteriana es muy sensible cuando la sustancia evaluada presenta una CMI inferior a 12.5 mg/mL, de mediana sensibilidad 12.5 y 50 mg/mL y de baja sensibilidad cuando la CMI está entre 50 y 100 mg/mL.Según esta escala *Escherichia coli* es muy sensible frente al extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” ya que presentó una CMI de 6.25 mg/mL.

4.9.2.2 DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DE *Colletia spinosissima* “ROQUE”

Del ensayo estandarizado para hallar la concentración bactericida mínima por el método de sembrado en agar.

Aplicando la fórmula de estandarización, $F = \sqrt[7]{I}$, para hallar el factor de incremento F, basándonos en los resultados de la prueba piloto, se obtuvo un valor de $F= 1.219$. Con este valor se determinaron las concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” para aplicar en el ensayo de CBM.

TABLA N°20: CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” PARA EL ENSAYO DE LA CMB

PROCEDIMIENTO	N° DE CONCENTRACIONES	RESULTADO (mg/mL)
Conc.mínima	C1	12.50
C1* F	C2	15.24
C2* F	C3	18.57
C3* F	C4	22.64
C4* F	C5	27.60
C5* F	C6	33.65
C6* F	C7	41.02
C7* F	C8	50

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN:

La Tabla N°20, muestra concentraciones estándar de trabajo en creciente proporción geométrica respecto a las usadas para el ensayo piloto. Estas nuevas concentraciones fueron usadas para determinar la concentración bactericida mínima del extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” frente a la cepa de estudio.

TABLA N° 21: NÚMERO DE COLONIAS DEL ENSAYO ESTÁNDAR DE LA CMB DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A *E.coli*

#	EXTRACTO ETANÓLICO DE ROQUE (mg/mL)	NÚMERO DE COLONIAS			
		Placa 01	Placa 02	Placa 03	Promedio
1	12.50	622	617	619	619.33
2	15.24	551	548	556	551.67
3	18.57	490	478	483	483.67
4	22.64	402	388	396	395.33
5	27.60	289	293	299	293.67
6	33.65	166	164	175	168.33
7	41.02	15	19	18	17.33
8	50	0	0	0	0

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

La Tabla N°21, muestra los valores del conteo de colonias, tanto de manera individual, así como el promedio de estos. Los valores de las concentraciones del extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” junto al promedio de número de colonias se usaron para determinar la ecuación de regresión lineal.

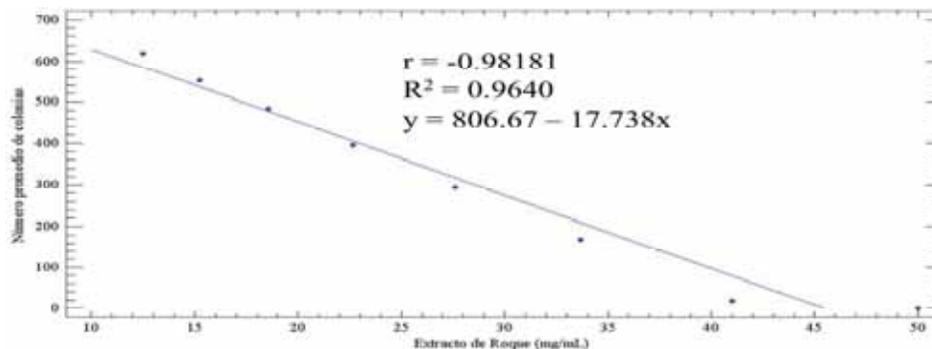
Podemos observar la ausencia de crecimiento bacteriano a una concentración de 50 mg/mL y desde la concentración 12.50 mg/mL hasta la concentración 41.02 mg/mL hubo presencia de crecimiento bacteriano, resultando que la concentración de 50 mg/mL fue la mayor concentración del extracto etanólico al 70% que elimina el 99.9 % de las bacterias.

Guerra et.al 2016 determinó la concentración mínima bactericida del extracto etanólico al 70 % de las hojas de *Artemisa absinthium L.* frente a *Escherichia coli* con una CMB de 26 mg/ml. Estos resultados son superiores a este estudio ya que en el extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” presento una CMB de 50 mg/ml.

Lloccallasi al 2017 determinó la concentración mínima bactericida del extracto etanólico al 70 % de la hojas de *Mutisia acuminata* frente a cepas de *Escherichia coli* con una CMB

de 50mg/mL. Estos resultados coinciden con este estudio ya que el extracto etanólico al 70 % de *Colletia spinosissima* presento un CMB de 50 mg/ml.

GRÁFICO N° 2 : REGRESIÓN LINEAL DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE ROQUE VS LOS PROMEDIOS DEL NÚMERO DE COLONIAS EN CULTIVOS DE *E. coli*.



Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN

El Gráfico N°2, muestra la línea de tendencia obtenida mediante regresión lineal entre las concentraciones del extracto etanólico de Roque versus los promedios del número de colonias en cultivos de *E. coli*; es así que se obtiene el estadístico $R^2 = 0.9640$, el cual nos indica que el modelo ajustado explica el 96.40% de la variabilidad en las concentraciones del extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* Roque. Por lo que se concluye que existe una relación inversamente proporcional entre la concentración del extracto extanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” y su actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli*; mientras que el coeficiente de correlación $r = -0.98181$ (valor muy próximo a -1) muestra una correlación negativa fuerte entre las variables.

Asimismo, de acuerdo a la ecuación $y = 806.67 - 17.738x$ para la línea de tendencia, podemos inferir el valor de CBM teórico del extracto etanólico al 70% de Roque frente a *E. coli* asumiendo un valor de $y = 0$, procediendo de la siguiente manera:

$$y = 806.67 - 17.738x$$

$$0 = 806.67 - 17.738x$$

$$17.738x = 806.67$$

$$x = \frac{806.67}{17.738}$$

$$x = 45.48 \text{ mg/mL}$$

Representando este resultado la CBM teórica del extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* frente a cepas de *E. coli* ATCC 35218.

4.9.2.3 DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 35218

4.9.2.3.1 RESULTADOS DE LOS DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE LOS TALLOS DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A CEPAS DE *E.coli*.ATCC 35218

TABLAN°22: RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Colletia spinosissima* FRENTE A *E. coli*

# PLACA	EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DEL ROQUE (mg/50µL)	DIÁMETROS DE HALO DE INHIBICIÓN (mm)			
		D ₁	D ₂	D ₃	P _D
1	6.25	8.97	8.64	7.62	8.41
2	9.29	8.17	8.71	8.53	8.47
3	13.80	10.43	8.97	9.65	9.68
4	20.51	10.23	10.99	9.79	10.34
5	30.48	11.69	12.44	11.94	12.03
6	45.29	16.44	15.38	16.59	16.13
7	67.30	18.62	19.94	19.18	19.25
8	100.00	25.81	23.86	26.05	25.24
9	Ciprofloxacino 5 µg	36.05	35.87	35.54	35.82
10	Amikacina 30 µg	30.24	29.57	30.13	29.98

Fuente: Datos experimentales del estudio.

DONDE:

D₁ = Diámetro 1

D₂ = Diámetro 2

D₃ = Diámetro 3

P_D = Diámetro promedio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADO.

En la tabla N°22, podemos observar los resultados de los diámetros de los halos de inhibición con las concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70 % de *Colletia spinosissima* frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218.

En la tabla se muestran resultados que el extracto etanólico al 70 % presenta un halo de inhibición mínimo de 8.41 mm en promedio a una concentración de 6.25 mg/50µL, presenta una actividad antibacteriana ligera; entre las concentraciones 30.48 mg/50µL y 45.29 mg/50µL del extracto etanólico presenta una actividad antibacteriana moderada; y entre las concentraciones 67.30 mg/50µL y 100.00 mg/50µL del extracto etanólico al 70 % presenta una actividad antibacteriana marcada. Según los criterios de Toda y Col. (71)

TABLA N°23: HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS FÁRMACOS PATRÓN PARA
Escherichia coli

FÁRMACO	CONCENTRACIÓN	ZONA DE DIÁMETRO DE INTERPRETACIÓN CRÍTICA (mm)		
		Sensible	Intermedio	Resistente
Ciprofloxacino	5 ug	≥ 21	16-20	≤ 15
Amikacina	30 ug	≥ 17	15-16	≤ 14

Fuente: Comité Nacional De Estándares De Laboratorio (NCCLS) 2017. (25)

La tabla N°23, nos muestra los halos de inhibición para los discos de sensibilidad de Ciprofloxacino 5 ug y Amikacina 30 ug aceptables de acuerdo al Comité Nacional de Estándares de Laboratorio (NCCLS). Estos fármacos se utilizaron como patrón en la determinación de la actividad antibacteriana de extracto etanólico al 70 % de *Colletia spinosissima*, lo cual nos permite determinar si la cepa bacteriana es resistente, intermedio o sensible al antibiótico, estos datos nos ayudan a concluir los resultados de la tabla N°22; en la cual podemos observar los halos de inhibición obtenidos para Ciprofloxacino y Amikacina que fueron de 35.82 y 29.98 mm respectivamente de acuerdo a estos resultados la cepa ATCC 35218 de *Escherichia coli* es sensible a los fármacos patrón utilizados.

El extracto etanólico al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” presentó un halo de inhibición promedio máximo de 25.24 mm a una concentración de 100 mg/50uL frente a los fármacos patrón Ciprofloxacino y Amikacina. Con estos resultados podemos

concluir que *Escherichia coli* ATCC 35218 es sensible al extracto etanólico al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y también se encuentra dentro de los parámetros establecidos por el NCCLS ,con lo cual podemos afirmar que el extracto presenta actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*.

La actividad antibacteriana de esta especie podría deberse a la presencia de saponinas que se encontró en el análisis fitoquímico cualitativo y en la determinación cualitativa de saponinas, ya que se han reportado estudios sobre actividad antibacteriana atribuyendo la actividad a las saponinas como lo menciona **Ramirez A. 2017** en su estudio fitoquímico preliminar y evaluación de su actividad antibacteriana del *Solanun dolichosepa bitter* (Frutillo). (72)

4.9.2.3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A CEPAS DE *E. coli* ATCC 35218

TABLA N°24: RESULTADOS DESCRIPTIVOS PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A CEPAS DE *E. coli* ATCC 35218

Extracto etanólico de Roque (mg/50µL)	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Error estándar	Mínimo	Máximo
6.25	3	8.41	0.70	0.41	7.62	8.97
9.29	3	8.47	0.27	0.16	8.17	8.71
13.80	3	9.68	0.73	0.42	8.97	10.43
20.51	3	10.34	0.61	0.35	9.79	10.99
30.48	3	12.02	0.38	0.22	11.69	12.44
45.29	3	16.14	0.66	0.38	15.38	16.59
67.30	3	19.25	0.66	0.38	18.62	19.94
100.00	3	25.24	1.20	0.69	23.86	26.05
Ciprofloxacino 5 µg	3	35.82	0.26	0.15	35.54	36.05
Amikacina 30 µg	3	29.98	0.36	0.21	29.57	30.24
Total	30	17.53	9.46	1.73	7.62	36.05

Fuente: Datos estadísticos del Estudio

INTERPRETACIÓN

En la tabla N°24, se observan los resultados descriptivos de los datos reportados en la tabla 22, donde la media del diámetro de mayor actividad fue de 25.24 mm (celda turquesa) a una concentración de extracto de 100 mg/50µL y la media del diámetro de menor actividad fue de 8.41 mm (celda amarilla) a una concentración de extracto de 6.25 mg/50µL. El menor error estándar de la media de diámetro de inhibición (celda verde) se dio a una concentración de 9.29 mg/50µL con 8.47 mm de diámetro (celda naranja). Se distingue que los diámetros entre los puntos mayor y menor son concentración-dependientes. Con respecto a los fármacos patrones Ciprofloxacino 5 µg y Amikacina 30 µg, poseen un diámetro promedio de inhibición de 35.82 mm y 29.98 mm respectivamente.

TABLA N°25: ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A CEPAS DE *E. coli* ATCC 35218

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2588.26	9	287.59	696.05	0.00
Intra grupos	8.26	20	0.41		
Total (Corr.)	2596.53	29			

Fuente: Datos estadísticos del Estudio

DONDE:

Gl= grados de libertad

F= distribución de Fisher

Sig= significancia

Sig= mayor a 0.05 no existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

Sig= menor igual a 0.05 existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

INTERPRETACIÓN

La tabla N°25, muestra el análisis de la varianza de los resultados reportados en la tabla N°22; y de acuerdo a éste análisis se puede apreciar que se halló una diferencia estadísticamente significativa en las medias de los diámetros de inhibición de crecimiento bacteriano a favor del extracto etanólico del Roque, siendo el valor obtenido de

significancia menor a 0.05 (Valor-P = 0.00), por tanto se considera que las concentraciones agrupadas de extracto no tienen un efecto similar en la inhibición de crecimiento; o dicho de otra forma, cada grupo de concentraciones genera halos de inhibición diferentes.

TABLA N°26: PRUEBA POST HOC DE TUKEY PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A CEPAS DE *E. coli* ATCC 35218

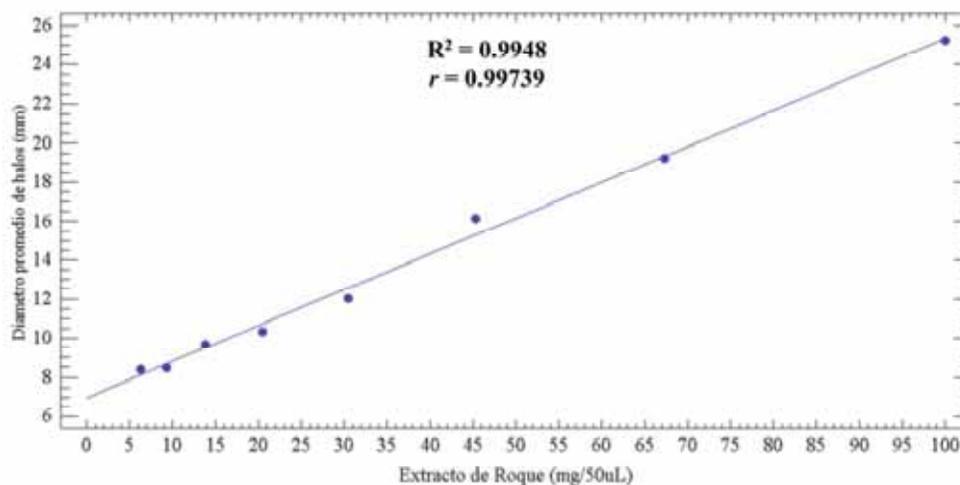
Extracto etanólico del Roque (mg/50µL)	N	Subconjunto para alfa = 0.05							
		1	2	3	4	5	6	7	8
6.25	3	8.41							
9.29	3	8.47							
13.80	3	9.68	9.68						
20.51	3		10.34	10.34					
30.48	3			12.02					
45.29	3				16.14				
67.30	3					19.25			
100.00	3						25.24		
Ciprofloxacino 5 µg	3							29.98	
Amikacina 30 µg	3								35.82
Sig.		0.36	0.96	0.10	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

INTERPRETACIÓN

La tabla N°26, nos muestra en función a la prueba HSD de Tukey, las medias que pueden ser consideradas similares, existiendo 8 subgrupos. Así los valores de significancia mayores a 0.05 nos dicen que las medias de los halos de inhibición son similares entre sí, ya que las diferencias no son estadísticamente significativas. Además se puede inferir que ninguna concentración tiene una actividad comparable a los patrones Ciprofloxacino 5 µg y Amikacina 30 µg.

GRÁFICO N°3 : REGRESIÓN LINEAL DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE ROQUE VS LOS DIÁMETROS PROMEDIOS DE SUS HALOS DE INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE *E. coli*



Fuente: Datos experimentales del Estudio

INTERPRETACIÓN

El Gráfico N°3, muestra la línea de tendencia obtenida mediante regresión lineal relación entre las concentraciones del extracto etanólico de Roque versus los promedios de las mediciones de los halos de inhibición en cultivos de *E. coli*; es así que se obtiene el estadístico $R^2 = 0.9948$, el cual nos indica que el modelo ajustado explica el 99.48% de la variabilidad en los promedios de los halos de inhibición, mientras que el coeficiente de correlación $r = 0.99739$ (valor muy próximo a 1) muestra una correlación positiva fuerte entre las variables.

4.9.2.4 DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CMI) POR DILUCIÓN EN CALDO DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA”

Del ensayo estandarizado para hallar la CMI por dilución en caldo.

Aplicando la fórmula de estandarización, $F = \sqrt[n]{I}$, para hallar el factor de incremento F, basándonos en los resultados de la prueba piloto, se obtuvo un valor $F = 1.22$. Con este valor se determinaron las concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70% para aplicar en el ensayo de CIM por dilución en caldo

TABLA N°27: CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Caléndula officinales* “CALÉNDULA” PARA EL ENSAYO DE LA CMI

PROCEDIMIENTO	N° DE CONCENTRACIONES	RESULTADO (mg/mL)
Conc.mínima	C1	25.00
C1* F	C2	30.48
C2* F	C3	37.15
C3* F	C4	45.29
C4* F	C5	55.20
C5* F	C6	67.30
C6* F	C7	82.03
C7* F	C8	100.00

Fuente: Datos experimentales del Estudio

INTERPRETACION:

La Tabla N°27, muestra concentraciones de trabajo en creciente proporción geométrica respecto a las usadas para el ensayo piloto. Estas nuevas concentraciones fueron usadas para determinar la concentración inhibitoria mínima del extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinales* “Caléndula” frente a la cepa de estudio, por el método de dilución en caldo.

TABLA N°28: RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Caléndula officinalis* “CALENDULA” FRENTE A *E. coli*

N° TUBOS	CONCENTRACIONES		PRESENCIA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.
	DEL EXTRACTO (mg/mL)	TURBIDEZ	
1	12.50	+	Crecimiento bacteriano
2	25.00	-	Ausencia
3	30.48	-	Ausencia
4	37.15	-	Ausencia
5	45.29	-	Ausencia
6	55.20	-	Ausencia
7	67.30	-	Ausencia
8	82.03	-	Ausencia
9	100.00	-	Ausencia

Fuente: Datos experimentales del estudio.

DONDE:

(+) =Turbio

(-) =Sin turbidez

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADO

Los tubos fueron incubados a 37 °C durante 24 horas, al cabo de las cuales se obtuvo turbidez en el tubo 1(relacionado al crecimiento bacteriano).Hay translucidez desde el tubo 2 hasta el 9 (no hay crecimiento bacteriano apreciable), todo esto nos puede indicar que el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se ubica en el tubo 2 a una concentración de 25.0 mg/mL.

Según **Avellana et al. 2005**, una cepa bacteriana es muy sensible cuando la sustancia evaluada presenta una CMI inferior a 12.5 mg/mL, de mediana sensibilidad 12.5 y 50 mg/mL y de baja sensibilidad cuando la CMI esta entre 50 y 100 mg/mL.Según esta escala *Escherichia coli* de mediana sensibilidad frente al extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula” ya que presentó una CMI de 25.0 mg/mL.

4.9.2.5 DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA”

Del ensayo estandarizado para hallar la concentración bactericida mínima por el método de sembrado en agar.

Aplicando la fórmula de estandarización, $F = \sqrt[3]{I}$, para hallar el factor de incremento F, basándonos en los resultados de la prueba piloto, se obtuvo un valor de $F=1.104$. Con este valor se determinaron las concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula” para aplicar en el ensayo de CBM.

TABLA N°29: CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Caléndula officinalis* PARA EL ENSAYO DE LA CMB

PROCEDIMIENTO	N° DE CONCENTRACIONES	RESULTADO (mg/mL)
Conc.minima	C1	50.00
C1* F	C2	55.20
C2* F	C3	60.95
C3* F	C4	67.30
C4* F	C5	74.30
C5* F	C6	82.03
C6* F	C7	90.57
C7* F	C8	100.00

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN:

La Tabla N°29, muestra concentraciones estándar de trabajo en creciente proporción geométrica respecto a las usadas para el ensayo piloto. Estas nuevas concentraciones fueron usadas para determinar la concentración bactericida mínima del extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula” frente a la cepa de estudio.

TABLA N°30: NÚMERO DE COLONIAS DEL ENSAYO ESTÁNDAR DE LA CMB DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A *E.coli*

#	EXTRACTO ETANÓLICO DEL CALÉNDULA (mg/mL)	NÚMERO DE COLONIAS			
		Placa 01	Placa 02	Placa 03	Promedio
1	50	596	603	611	603.33
2	55.20	542	530	537	536.33
3	60.95	439	449	440	442.67
4	67.30	363	351	346	353.33
5	74.30	250	258	252	253.33
6	82.03	138	146	152	145.33
7	90.57	12	18	22	17.33
8	100	0	0	0	0

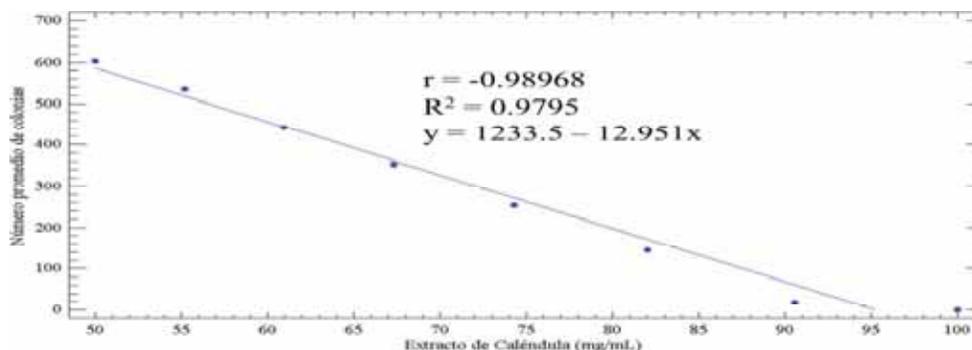
Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADO

La Tabla N°30, muestra los valores del conteo de colonias, tanto de manera individual, así como el promedio de estos. Los valores de las concentraciones del extracto etanólico al 70% de Caléndula junto al promedio de número de colonias se usaron para determinar la ecuación de regresión lineal.

Podemos observar la ausencia de crecimiento bacteriano a una concentración de 100 mg/mL y desde la concentración 50.0 mg/mL hasta la concentración 90.57 mg/mL hubo presencia de crecimiento bacteriano, resultando que la concentración de 100 mg/mL fue la mayor concentración del extracto etanólico que elimina el 99.9 % de las bacterias.

**GRÁFICO N°4: REGRESIÓN LINEAL DE LAS CONCENTRACIONES DE
EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE CALÉNDULA VS LOS PROMEDIOS
DEL NÚMERO DE COLONIAS EN CULTIVOS DE *E. coli***



Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN

El Gráfico N°4, muestra la línea de tendencia obtenida mediante regresión lineal relación entre las concentraciones del extracto etanólico al 70% de Caléndula versus los promedios del número de colonias en cultivos de *E. coli*; es así que se obtiene el estadístico $R^2 = 0.9795$, el cual nos indica que el modelo ajustado explica el 97.95% de la variabilidad en las concentraiones de extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula”, Por lo que se concluye que existe una relación inversamente proporcional entre la concentración del extracto extanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula” y su actividad antibacteriana frente a cepas de *Escherichia coli*; mientras que el coeficiente de correlación $r = -0.98968$ (valor muy próximo a -1) muestra una correlación negativa fuerte entre las variables.

Asimismo, de acuerdo a la ecuación $y = 1233.5 - 12.951x$ para la línea de tendencia, podemos inferir el valor de CBM teórico del extracto etanólico de Caléndula frente a *E. coli* asumiendo un valor de $y = 0$, procediendo de la siguiente manera:

$$y = 1233.5 - 12.951x \qquad x = \frac{1233.5}{12.951}$$

$$0 = 1233.5 - 12.951x$$

$$12.951x = 1233.5 \qquad x = 95.24 \text{ mg/mL}$$

Representando este resultado la CBM teórica del extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* frente a cepas de *E. coli* ATCC 35218.

4.9.2.6 DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 35218

4.9.2.6.1 RESULTADOS DE LOS DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A CEPAS DE *E.coli*. ATCC 35218.

TABLA N°31: RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* FRENTE A *E. coli*

# PLACA	EXTRACTO ETANÓLICO DE CALÉNDULA (mg/50µL)	DIÁMETROS DE HALO DE INHIBICIÓN (mm)			
		D ₁	D ₂	D ₃	P _D
1	25.00	8.29	8.98	8.21	8.49
2	30.48	9.37	8.92	8.73	9.01
3	37.15	8.89	10.74	9.08	9.57
4	45.29	10.79	9.94	10.37	10.37
5	55.20	10.99	10.53	11.34	10.95
6	67.30	13.80	12.65	12.01	12.82
7	82.03	13.82	13.25	13.96	13.68
8	100.00	16.72	15.76	16.24	16.24
9	Ciprofloxacino 5 µg	35.34	36.43	35.21	35.66
10	Amikacina 30 µg	29.89	30.02	30.42	30.11

Fuente: Datos experimentales del estudio.

DONDE:

D₁ = Diámetro 1

D₂ = Diámetro 2

D₃ = Diámetro 3

P_D = Diámetro promedio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADO

En la tabla N°31, podemos observar los resultados de los diámetros de los halos de inhibición con las concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218.

En la tabla se muestran resultados que el extracto etanólico presenta un halo de inhibición mínimo de 8.49 mm en promedio a una concentración de 25.0 mg/50µL, presenta una actividad antibacteriana ligera y entre las concentraciones 67.30 mg/50µL y 100 mg/50µL del extracto etanólico presenta una actividad antibacteriana moderada. **Según los criterios de Toda y Col. (71)**

TABLA N°32: HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS FÁRMACOS PATRÓN PARA
Escherichia coli

FÁRMACO	CONCENTRACIÓN	ZONA DE DIÁMETRO DE INTERPRETACIÓN CRÍTICA (mm)		
		Sensible	Intermedio	Resistente
Ciprofloxacino	5 ug	≥ 21	16-20	≤ 15
Amikacina	30 ug	≥ 17	15-16	≤ 14

Fuente: Comité Nacional de Estándares de Laboratorio (NCCLS) 2017. (25)

La tabla N°32, nos muestra los halos de inhibición para los discos de sensibilidad de ciprofloxacino 5 ug y amikacina 30 ug aceptables de acuerdo al Comité Nacional de Estándares de Laboratorio (NCCLS). estos fármacos se utilizaron como patrón en la determinación de la actividad antibacteriana de extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis*, lo cual nos permite determinar si la cepa bacteriana es resistente, intermedio o sensible al antibiótico, estos datos nos ayudan a concluir los resultados de la tabla N° ;en la cual podemos observar los halos de inhibición obtenidos para ciprofloxacino y amikacina que fueron de 35.66 y 30.11 mm respectivamente de acuerdo a estos resultados la cepa ATCC 35218 de *Escherichia coli* es sensible a los fármacos patrón utilizados.

El extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* presentó un halo de inhibición promedio máximo de 16.24 mm a una concentración de 100 mg/50uL siendo este no cercano al patrón ciprofloxacino y amikacina. Con estos resultados podemos concluir que *Escherichia coli* ATCC 35218 es de intermedia sensibilidad al extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* y también se encuentra dentro de los parámetros establecidos por

el NCCLS, con lo cual podemos afirmar que el extracto al 70% presenta actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*.

La actividad antibacteriana de esta especie podría deberse a la presencia de flavonoides ,compuestos fenólicos y saponinas que se encontró en el análisis fitoquímico cualitativos y en la determinación cualitativa de saponinas, ya que se han reportado estudios sobre actividad antibacteriana atribuyendo la actividad a los flavonoides, ácidos fenólicos, taninos y saponinas como lo menciona **Lastra Valdez H. 2016** en su estudio centro de investigación y desarrollo de medicamentos *Caléndula officinalis*. (69)

Los flavonoides provocan la muerte bacteriana al inhibir la síntesis de ADN o ARN, debido a que tienen una estructura plana similar a la de las bases púricas y pirimídicas; por lo tanto, se pueden intercalar formando puentes de hidrógeno con las bases de la doble hélice y de esta forma las flavonas alteran la estructura tridimensional de los ácidos nucleicos, impidiendo su adecuada síntesis de novo; además, de provocar errores de lectura durante la transcripción **según Cushnie & Lamb, 2015**. (73)

Según **Leal M.2014** determinó la eficacia antibacteriana de los extractos de *Thymus vulgaris*, *Caléndula officinalis* y *Salvia officinalis*. Frente a *Escherichia coli*, por el método de difusión en agar, donde se observó que el extracto al 70% de *Caléndula officinalis* posee efecto bactericida en la diluciones 1:2 y 1:4 que se interpreta como efecto bactericida de 100%.Este resultado es superior a este estudio ya que el extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* presento sensibilidad intermedia. (13)

Según **Soto vasquez .2014** determinó metabolitos secundarios y efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroetanólico de las flores de *Cantua buxifolia* frente a cepas de *Escherichia coli* por el método de difusión en agar con halos de inhibición de 21.7 mm a una concentración de 1.5 mg/ml. Estos resultados son superiores a los obtenidos en este estudio. (74)

4.9.2.6.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A CEPAS DE *E. coli* ATCC 35218

TABLA N°33: RESULTADOS DESCRIPTIVOS PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* FRENTE A CEPAS DE *E. coli* ATCC 35218

Extracto etanólico de Caléndula (mg/50µL)	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Error Estándar	Mínimo	Máximo
25.00	3	8.49	0.42	0.24	8.21	8.98
30.48	3	9.01	0.33	0.19	8.73	9.37
37.15	3	9.57	1.02	0.59	8.89	10.74
45.29	3	10.37	0.43	0.25	9.94	10.79
55.20	3	10.95	0.41	0.23	10.53	11.34
67.30	3	12.82	0.91	0.52	12.01	13.80
82.03	3	13.68	0.38	0.22	13.25	13.96
100.00	3	16.24	0.48	0.28	14.76	15.72
Ciprofloxacino 5 µg	3	35.66	0.67	0.39	35.21	36.43
Amikacina 30 µg	3	30.11	0.28	0.16	29.89	30.42
Total	30	15.59	9.13	1.67	8.21	36.43

Fuente: Datos estadísticos del Estudio

INTERPRETACIÓN

En la tabla N°33, se observan los resultados descriptivos de los resultados reportados en la tabla N°31, donde la media del diámetro de mayor actividad fue de 16.24 mm (celda turquesa) a una concentración de extracto de 100 mg/50µL y la media del diámetro de menor actividad fue de 8.49 mm (celda amarilla) a una concentración de extracto de 25 mg/50µL. El menor error estándar de la media de diámetro de inhibición (celda verde) se dio a una concentración de 30.48 mg/50µL con 9.01 mm de diámetro (celda naranja). Se distingue que los diámetros entre los puntos mayor y menor son concentración-dependientes. Con respecto a los fármacos patrones Ciprofloxacino 5 µg y Amikacina 30 µg, poseen un diámetro promedio de inhibición de 35.66 mm y 30.11 mm respectivamente.

TABLA N°34: ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A CEPAS DE *E. coli* ATCC 35218

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2411.45	9	267.94	790.76	0.00
Intra grupos	6.78	20	0.34		
Total (Corr.)	2418.23	29			

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

DONDE:

Gl.= grados de libertad

F= distribución de Fisher

Sig.= significancia

Sig.= mayor a 0.05 no existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

Sig.= menor igual a 0.05 existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

INTERPRETACIÓN

La tabla N°34, muestra el análisis de la varianza de los resultados reportados en la tabla N°31; y de acuerdo a éste análisis se puede apreciar que se halló una diferencia estadísticamente significativa en las medias de los diámetros de inhibición de crecimiento bacteriano a favor del extracto etanólico de Caléndula, siendo el valor obtenido de significancia menor a 0.05 (Valor-P = 0.00), por tanto se acepta la hipótesis de que las concentraciones agrupadas de extracto no tienen un efecto similar en la inhibición de crecimiento; o dicho de otra forma, cada grupo de concentraciones genera halos de inhibición diferentes.

TABLA N° 35: PRUEBA POST HOC DE TUKEY PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A CEPAS DE *E. coli* ATCC 35218

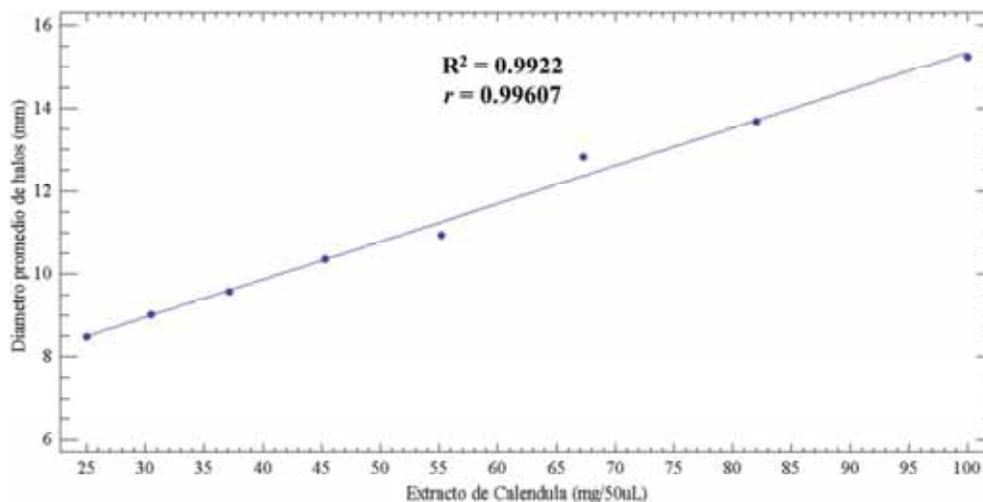
Extracto etanólico de Caléndula (mg/50µL)	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
25.00	3	8.49						
30.48	3	9.01	9.01					
37.15	3	9.57	9.57	9.57				
45.29	3		10.37	10.37				
55.20	3			10.95				
67.30	3				12.82			
82.03	3				13.68	13.68		
100.00	3					16.24		
Ciprofloxacino 5 µg	3						30.11	
Amikacina 30 µg	3							35.66
Sig.		0.45	0.18	0.17	0.73	0.08	1.00	1.00

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

INTERPRETACIÓN

La tabla N°35, nos muestra en función a la prueba HSD de Tukey, las medias que pueden ser consideradas similares, existiendo 7 subgrupos. Así los valores de significancia mayores a 0.05 nos dicen que las medias de los halos de inhibición son similares entre sí, ya que las diferencias no son estadísticamente significativas. Además se puede inferir que ninguna concentración tiene una actividad comparable a los patrones ciprofloxacino 5 µg y amikacina 30 µg.

GRÁFICO N°5: REGRESIÓN LINEAL DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE CALÉNDULA VS LOS DIÁMETROS PROMEDIOS DE SUS HALOS DE INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE *E. coli*



Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN

El Gráfico N°5, muestra la línea de tendencia obtenida mediante regresión lineal relación entre las concentraciones del extracto etanólico al 70% de Caléndula versus los promedios de las mediciones de los halos de inhibición en cultivos de *E. coli*; es así que se obtiene el estadístico $R^2 = 0.9922$, el cual nos indica que el modelo ajustado explica el 99.22% de la variabilidad en los promedios de los halos de inhibición, mientras que el coeficiente de correlación $r = 0.99607$ (valor muy próximo a 1) muestra una correlación positiva fuerte entre las variables.

4.9.3 ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO PARA
Staphylococcus aureus ATCC® 29213

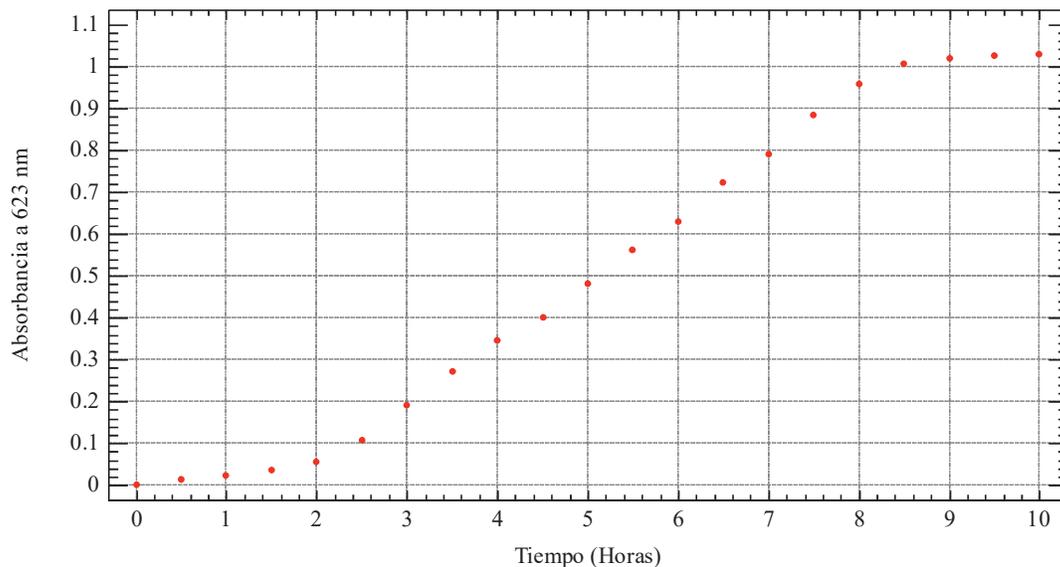
TABLA N°36: ABSORBANCIA PARA LA ESTANDARIZACIÓN DE LA CURVA
DE CRECIMIENTO PARA *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

TIEMPO(HORAS)	ABSORBANCIA (A 623 nm)*
0.5	0.010
1.0	0.014
1.5	0.025
2.0	0.036
2.5	0.057
3.0	0.106
3.5	0.192
4.0	0.271
4.5	0.345
5.0	0.399
5.5	0.481
6.0	0.562
6.5	0.630
7.0	0.722
7.5	0.790
8.0	0.883
8.5	0.956
9.0	1.007
9.5	1.017
10.0	1.024

Fuente: Datos experimentales del estudio.

(*) = Promedio de tres medidas de absorbancias.

GRÁFICO N°6: CURVA DE CRECIMIENTO PARA *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.



Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS:

En el gráfico N°6, se puede observar claramente el crecimiento bacteriano de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, en este gráfico se puede evidenciar las 4 fases típicas del crecimiento bacteriano; fase de latencia, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte.

En la curva exponencial se observa que la fase de latencia dura aproximadamente 1 hora, en el cual la cepa bacteriana de *Staphylococcus aureus* demora en adaptarse al medio de cultivo; la fase exponencial de crecimiento está entre la 1.5 y 8.5 horas en esta fase la cepa bacteriana está adaptada a su nuevo medio por lo que presenta un crecimiento acelerado; a partir de las 8.5 y 9.5 la cepa bacteriana entra en la fase estacionaria, donde los nutrientes del medio se están agotando y además a la acumulación de desechos metabólicos de la bacteria, la fase de la muerte empieza aproximadamente las 10 horas. Este gráfico se asemeja a la curva de crecimiento típica de una bacteria según **Madigan Martinko, Dunlap y Clark 2014. (70)**

4.9.4 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

4.9.4.1 DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MINIMA (CMI) POR DILUCIÓN EN CALDO DE *Colletia spinosissima* “ROQUE”

Del ensayo estandarizado para hallar la CMI por dilución en caldo.

Aplicando la fórmula de estandarización, $F = \sqrt[r]{I}$, para hallar el factor de incremento F, basándonos en los resultados de la prueba piloto, se obtuvo un valor F= 1.35. Con este valor se determinaron las concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70% para aplicar en el ensayo de CIM por dilución en caldo.

TABLA N°37: CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” PARA EL ENSAYO DEL CMI

PROCEDIMIENTO	N° DE CONCENTRACIONES	RESULTADOS (mg/mL)
Concentración mínima	C1	12.50
C1 *F	C2	16.82
C2 *F	C3	22.64
C3 *F	C4	30.48
C4 *F	C5	41.02
C5 *F	C6	55.20
C6 *F	C7	74.30
C7 *F	C8	100.0

Fuente: Datos experimentales de estudio.

INTERPRETACION:

La Tabla N°37, muestra concentraciones de trabajo en creciente proporción geométrica respecto a las usadas para el ensayo piloto. Estas nuevas concentraciones fueron usadas para determinar la concentración inhibitoria mínima del extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” frente a la cepa de estudio, por el método de dilución en caldo.

TABLA N°38: RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A *Staphylococcus aureus*

N° TUBOS	CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO (mg/mL)	TURBIDEZ	PRESENCIA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.
1	6.25	+	Crecimiento bacteriano
2	12.50	-	Ausencia
3	16.82	-	Ausencia
4	22.64	-	Ausencia
5	30.48	-	Ausencia
6	41.02	-	Ausencia
7	55.20	-	Ausencia
8	74.30	-	Ausencia
9	100.0	-	Ausencia

Fuente: Datos experimentales del estudio.

DONDE:

(+) =Turbio

(-) =Sin turbidez

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADO.

Los tubos fueron incubados a 37 °C durante 24 horas, al cabo de las cuales se obtuvo turbidez en el tubo 1(relacionado al crecimiento bacteriano).Hay translucidez desde el tubo 2 hasta el 9 (no hay crecimiento bacteriano apreciable), todo esto nos puede indicar que el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se ubica en el tubo 2 a una concentración de 12.50 mg/mL.

Según **Avellana et al. 2005**, una cepa bacteriana es muy sensible cuando la sustancia evaluada presenta una CMI inferior a 12.5 mg/mL, de mediana sensibilidad 12.5 y 50 mg/mL y de baja sensibilidad cuando la CMI está entre 50 y 100 mg/mL.Según esta escala *Staphylococcus aureus* presenta mediana sensibilidad frente al extracto etanólico al 70% *Colletia spinosissima* “Roque” ya que presentó una CMI de 12.50 mg/mL.

4.9.4.2 DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DE *Colletia spinosissima* "ROQUE"

Del ensayo estandarizado para hallar la concentración bactericida mínima por el método de sembrado en agar.

Aplicando la fórmula de estandarización, $F = \sqrt[n]{I}$, para hallar el factor de incremento F, basándonos en los resultados de la prueba piloto, se obtuvo un valor de $F= 1.104$. Con este valor se determinaron las concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70% para aplicar en el ensayo de CBM.

TABLA N°39: CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Colletia spinosissima* "ROQUE" PARA EL ENSAYO DE LA CMB

PROCEDIMIENTO	N° DE CONCENTRACIONES	RESULTADO (mg/mL)
Conc.minima	C1	25.00
C1* F	C2	27.60
C2* F	C3	30.48
C3* F	C4	33.65
C4* F	C5	37.15
C5* F	C6	41.01
C6* F	C7	45.29
C7* F	C8	50

Fuente: Datos experimentales del estudio.

La Tabla N°39, muestra concentraciones estándar de trabajo en creciente proporción geométrica respecto a las usadas para el ensayo piloto. Estas nuevas concentraciones fueron usadas para determinar la concentración bactericida mínima del extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* "Roque" frente a la cepa de estudio.

**TABLA N°40: NÚMERO DE COLONIAS DEL ENSAYO ESTÁNDAR DE LA CMB
DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Colletia spinosissima* “ROQUE”
FRENTE A *Staphylococcus aureus***

#	EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE ROQUE (mg/mL)	NÚMERO DE COLONIAS			
		Placa 01	Placa 02	Placa 03	Promedio
1	25.00	639	642	631	637.33
2	27.60	568	559	567	564.67
3	30.48	476	467	471	471.33
4	33.65	374	373	380	375.67
5	37.15	271	264	256	263.67
6	41.02	139	143	145	142.33
7	45.29	13	12	16	13.67
8	50	0	0	0	0

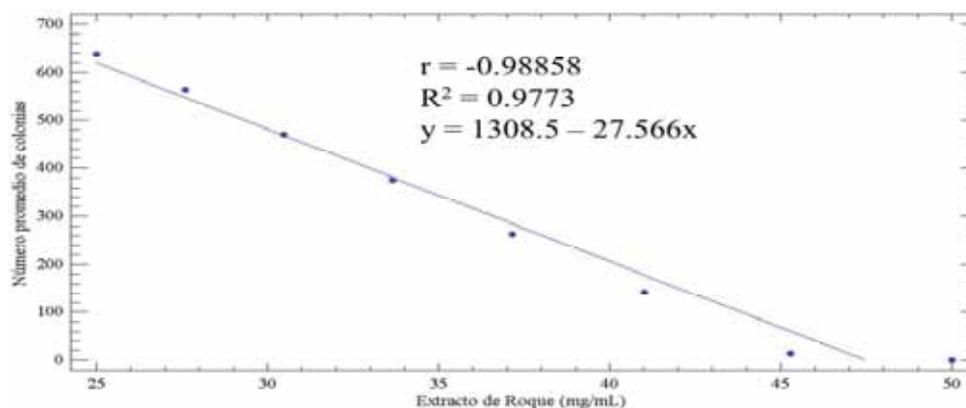
Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADO

La Tabla N°40, muestra los valores del conteo de colonias, tanto de manera individual, así como el promedio de estos. Los valores de las concentraciones del extracto etanólico al 70% de Roque junto al promedio de número de colonias se usaron para determinar la ecuación de regresión lineal para la determinación de la CMB teórico.

Podemos observar la ausencia de crecimiento bacteriano a una concentración de 50 mg/mL y desde la concentración 25.00 mg/mL hasta la concentración 45.29 mg/mL hubo presencia de crecimiento bacteriano, resultando que la concentración de 50 mg/mL fue la mayor concentración del extracto etanólico al 70% que elimina el 99.9 % de las bacterias.

**GRÁFICO N° 7: REGRESIÓN LINEAL DE LAS CONCENTRACIONES DE
EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE ROQUE VS LOS PROMEDIOS DEL
NÚMERO DE COLONIAS EN CULTIVOS DE *S. aureus***



Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN

El Gráfico N°7, muestra la línea de tendencia obtenida mediante regresión lineal relación entre las concentraciones del extracto etanólico al 70% de Roque versus los promedios del número de colonias en cultivos de *S. aureus*; es así que se obtiene el estadístico $R^2 = 0.9773$, el cual nos indica que el modelo ajustado explica el 97.73% de la variabilidad en las concentraciones del extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* Roque. Por lo que se concluye que existe una relación inversamente proporcional entre la concentración del extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” y su actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, mientras que el coeficiente de correlación $r = -0.98181$ (valor muy próximo a -1) muestra una correlación negativa fuerte entre las variables.

Asimismo, de acuerdo a la ecuación $y = 1308.5 - 27.566x$ para la línea de tendencia, podemos inferir el valor de CBM teórico del extracto etanólico al 70% de Roque frente a *S. aureus* asumiendo un valor de $y = 0$, procediendo de la siguiente manera:

$$y = 1308.5 - 27.566x \qquad x = \frac{1308.5}{27.566}$$

$$0 = 1308.5 - 27.566x$$

$$27.566x = 1308.5 \qquad x = 47.47 \text{ mg/mL}$$

Representando este resultado la CBM teórica del extracto etanólico al 70% de Roque frente a cepas de *S. aureus* ATCC 25923.

4.9.4.3 DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

4.9.4.3.1 RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

TABLA N°41: RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A *Staphylococcus aureus*

# PLACA	EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DEL ROQUE (mg/50µL)	DIÁMETROS DE HALO DE INHIBICIÓN (mm)			
		D ₁	D ₂	D ₃	P _D
1	12.50	9.23	9.14	8.43	8.93
2	16.82	8.50	9.25	10.18	9.31
3	22.64	10.07	10.27	10.47	10.27
4	30.48	11.58	10.61	11.36	11.18
5	41.02	11.73	12.69	12.33	12.25
6	55.20	14.05	14.72	14.45	14.41
7	74.30	14.18	16.20	14.96	15.11
8	100.00	19.29	18.55	18.00	18.61
9	Ciprofloxacino 5 µg	38.51	37.23	38.11	37.95
10	Clindamicina 2µg	22.15	23.02	22.97	22.71

Fuente: Datos experimentales del estudio.

DONDE:

D₁ = Diámetro 1

D₂ = Diámetro 2

D₃ = Diámetro 3

P_D = Diámetro promedio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADO.

En la tabla N°41, podemos observar los resultados de los diámetros de los halos de inhibición con las concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

En la tabla se muestran resultados que el extracto etanólico presenta un halo de inhibición mínimo de 8.93 mm en promedio a una concentración de 12.50 mg/50µL, presenta una actividad antibacteriana ligera; entre las concentraciones 41.02 mg/50µL y 74.30 mg/50µL del extracto etanólico presenta una actividad antibacteriana moderada; y en la concentración 100.00mg/50µL del extracto etanólico presenta una actividad antibacteriana marcada. **Según los criterios de Toda y Col. (71)**

TABLA N°42: HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS FÁRMACOS PATRÓN PARA *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

FÁRMACO	CONCENTRACIÓN	ZONA DE DIÁMETRO DE INTERPRETACIÓN CRÍTICA (mm)		
		Sensible	Intermedio	Resistente
Ciprofloxacino	5 ug	≥ 21	16-20	≤ 15
Clindamicina	2 ug	≥ 21	15-20	≤ 14

Fuente: Comité Nacional de Estándares de Laboratorio (NCCLS) 2017. (25)

La tabla N°42, nos muestra los halos de inhibición para los discos de sensibilidad de Ciprofloxacino 5 ug y Clindamicina 2ug aceptables de acuerdo al Comité Nacional de Estándares de Laboratorio (NCCLS). estos fármacos se utilizaron como patrón en la determinación de la actividad antibacteriana de extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima*, lo cual nos permite determinar si la cepa bacteriana es resistente, intermedio o sensible al antibiótico, estos datos nos ayudan a concluir los resultados de la tabla N° 42 ; en la cual podemos observar los halos de inhibición obtenidos para ciprofloxacino y amikacina que fueron de 37.95 y 22.71 respectivamente de acuerdo a estos resultados la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es sensible a los fármacos patrón utilizados.

El extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” presentó un halo de inhibición promedio máximo de 18.61 mm a una concentración de 100 mg/50uL siendo este valor no tan próximo al patrón ciprofloxacino y clindamicina, con estos resultados podemos concluir que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es de intermedia sensibilidad al extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” y también se encuentra dentro de los

parámetros establecidos por el NCCLS ,con lo cual podemos afirmar que el extracto presenta actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*.

La actividad antibacteriana de esta especie podría deberse a la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos y saponinas que se encontró en el análisis fitoquímico cualitativos y en la determinación cualitativa de saponinas, ya que se han reportado estudios sobre actividad antibacteriana atribuyendo la actividad a los metabolitos secundarios sobre todo de compuestos fenólicos flavonoides quinonas ,taninos y saponinas. Esto debido a que, los flavonoides por tener en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos penetran fácilmente a través de la membrana celular bacteriana, se combinan y precipitan las proteínas protoplasmáticas desnaturalizándolas y actuando como venenos protoplasmáticos **según Puupponen et al. 2016**. Por otro lado, las saponinas son un grupo de sustancias glicosídicas .Se cree que la toxicidad de las saponinas es debido a su capacidad de formar complejos con esteroides de las membranas celulares produciendo grandes poros en las mismas que alteran su permeabilidad y la célula se lisa, ocasionando la ruptura de las membranas bacterianas **según Díaz, 2016. (75)**

4.9.4.3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

TABLA N°43: RESULTADOS DESCRIPTIVOS PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE

Colletia spinosissima

Extracto etanólico del Roque (mg/50µL)	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Error estándar	Mínimo	Máximo
12.50	3	8.93	0.44	0.25	8.43	9.23
16.82	3	9.31	0.84	0.49	8.50	10.18
22.64	3	10.27	0.20	0.12	10.07	10.47
30.48	3	11.18	0.51	0.29	10.61	11.58
41.02	3	12.25	0.48	0.28	11.73	12.69
55.20	3	14.41	0.34	0.19	14.05	14.72
74.30	3	15.11	1.02	0.59	14.18	16.20
100.00	3	18.61	0.65	0.37	18.00	19.29
Ciprofloxacino 5 µg	3	37.95	0.65	0.38	37.23	38.51
Clindamicina 2 µg	3	22.71	0.49	0.28	22.15	23.02
Total	30	16.07	8.54	1.56	8.43	38.51

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

INTERPRETACIÓN

En la tabla N°43, se observan los resultados descriptivos de los datos reportados en la tabla N°41, donde la media del diámetro de mayor actividad fue de 18.61 mm (celda turquesa) a una concentración de extracto de 100 mg/50µL y la media del diámetro de menor actividad fue de 8.93 mm (celda amarilla) a una concentración de extracto de 12.50 mg/50µL. El menor error estándar de la media de diámetro de inhibición (celda verde) se dio a una concentración de 22.64 mg/50µL con 10.27 mm de diámetro (celda naranja). Se distingue que los diámetros entre los puntos mayor y menor son concentración-dependientes. Con respecto a los fármacos patrones ciprofloxacino 5 µg y clindamicina 2 µg, poseen un diámetro promedio de inhibición de 37.95 mm y 22.71 mm respectivamente.

TABLA N°44: ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus*

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2105.28	9	233.92	637.04	0.00
Intra grupos	7.34	20	0.37		
Total (Corr.)	2112.62	29			

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

DONDE:

Gl.= grados de libertad

F= distribución de Fisher

Sig.= significancia

Sig.= mayor a 0.05 no existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

Sig.= menor igual a 0.05 existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

INTERPRETACIÓN

La tabla N°44, muestra el análisis de la varianza de los resultados reportados en la tabla N°41; y de acuerdo a éste análisis se puede apreciar que se halló una diferencia estadísticamente significativa en las medias de los diámetros de inhibición de crecimiento bacteriano a favor del extracto etanólico al 70% de Roque, siendo el valor obtenido de significancia menor a 0.05 (Valor-P = 0.0000), por tanto se considera que las concentraciones agrupadas de extracto no tienen un efecto similar en la inhibición de crecimiento; o dicho de otra forma, cada grupo de concentraciones genera halos de inhibición diferentes.

TABLA N°45: PRUEBA POST HOC DE TUKEY PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

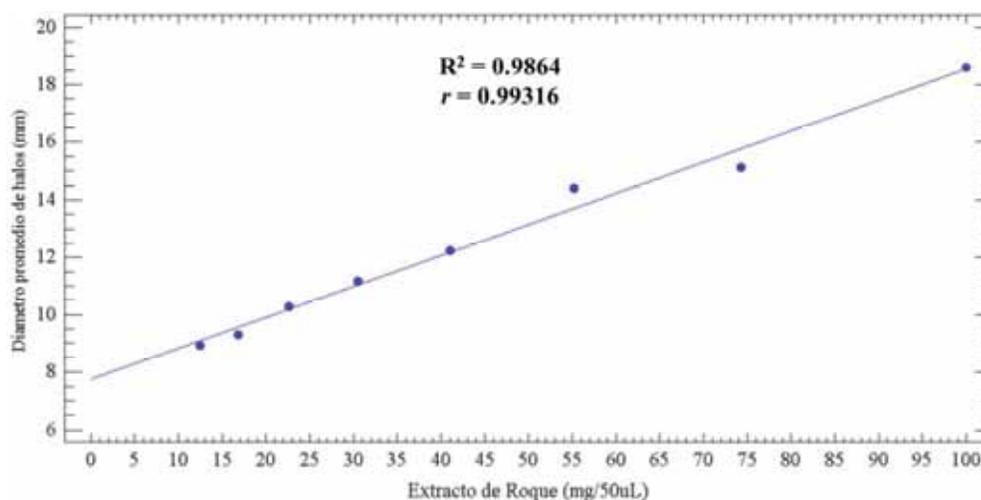
Extracto etanólico del Roque (mg/50µL)	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
12.50	3	8.93						
16.82	3	9.31						
22.64	3	10.27	10.27					
30.48	3		11.18	11.18				
41.02	3			12.25				
55.20	3				14.41			
74.30	3				15.11			
100.00	3					18.61		
Ciprofloxacino 5 µg	3						22.71	
Clindamicina 2 µg	3							37.95
Sig.		0.24	0.70	0.51	0.90	1.00	1.00	1.00

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

INTERPRETACIÓN

La tabla N°45, nos muestra en función a la prueba HSD de Tukey, las medias que pueden ser consideradas similares, existiendo 7 subgrupos. Así los valores de significancia mayores a 0.05 nos dicen que las medias de los halos de inhibición son similares entre sí, ya que las diferencias no son estadísticamente significativas. Además se puede inferir que ninguna concentración tiene una actividad comparable a los patrones ciprofloxacino 5 µg y clindamicina 2 µg.

GRÁFICO N°8: REGRESIÓN LINEAL DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE ROQUE VS LOS DIÁMETROS PROMEDIOS DE SUS HALOS DE INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE *S. aureus*



Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN

El Gráfico N°8, muestra la línea de tendencia obtenida mediante regresión lineal relación entre las concentraciones del extracto etanólico al 70% de Roque versus los promedios de las mediciones de los halos de inhibición en cultivos de *S. aureus*; es así que se obtiene el estadístico $R^2 = 0.9864$, el cual nos indica que el modelo ajustado explica el 98.64% de la variabilidad en los promedios de los halos de inhibición, mientras que el coeficiente de correlación $r = 0.99316$ (valor muy próximo a 1) muestra una correlación positiva fuerte entre las variables.

4.9.4.4 DE LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MÍNIMA (CMI) POR DILUCIÓN EN CALDO DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA”

Del ensayo estandarizado para hallar la CMI por dilución en caldo.

Aplicando la fórmula de estandarización, $F = \sqrt[3]{I}$, para hallar el factor de incremento F, basándonos en los resultados de la prueba piloto, se obtuvo un valor $F = 1.22$. Con este valor se determinaron las concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula” para aplicar en el ensayo de CIM por dilución en caldo

TABLA N°46: CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinales* “CALÉNDULA” PARA EL ENSAYO DEL CMI

PROCEDIMIENTO	N° DE CONCENTRACIONES	RESULTADO (mg/mL)
Conc. Mínima	C1	25.00
C1* F	C2	30.48
C2* F	C3	37.15
C3* F	C4	45.29
C4* F	C5	55.20
C5* F	C6	67.30
C6* F	C7	82.03
C7* F	C8	100.00

Fuente: Datos experimentales del Estudio

INTERPRETACION:

La Tabla N°46, muestra concentraciones de trabajo en creciente proporción geométrica respecto a las usadas para el ensayo piloto. Estas nuevas concentraciones fueron usadas para determinar la concentración inhibitoria mínima del extracto etanólico al 70 % de *Caléndula officinalis* “Caléndula” frente a la cepa de estudio, por el método de dilución en caldo.

TABLA N°47: RESULTADOS DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A *Staphylococcus aureus*

N° TUBOS	CONCENTRACIONES DEL EXTRACTO (mg/mL)	TURBIDEZ	PRESENCIA DE CRECIMIENTO BACTERIANO.
1	12.50	+	Crecimiento bacteriano
2	25.00	-	Ausencia
3	30.48	-	Ausencia
4	37.15	-	Ausencia
5	45.29	-	Ausencia
6	55.20	-	Ausencia
7	67.30	-	Ausencia
8	82.03	-	Ausencia
9	100.00	-	Ausencia

Fuente: Datos experimentales del estudio.

DONDE:

(+) =Turbio

(-) =Sin turbidez

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADO.

Los tubos fueron incubados a 37 °C durante 24 horas, al cabo de las cuales se obtuvo turbidez en el tubo 1(relacionado al crecimiento bacteriano).Hay translucidez desde el tubo 2 hasta el 9 (no hay crecimiento bacteriano apreciable), todo esto nos puede indicar que el valor de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se ubica en el tubo 2 a una concentración de 25.0 mg/mL.

Según **Avellana et al. 2015**, una cepa bacteriana es muy sensible cuando la sustancia evaluada presenta una CMI inferior a 12.5 mg/mL, de mediana sensibilidad 12.5 y 50 mg/mL y de baja sensibilidad cuando la CMI está entre 50 y 100 mg/mL.Según esta escala *Escherichia coli* es de mediana sensibilidad frente al extracto etanólico al 70% *Caléndula officinalis* “Caléndula” ya que presentó una CMI de 25.0 mg/mL.

Velazco G. 2018 Determinó la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico al 70 % de *Caléndula officinalis* frente a *Staphylococcus aureus* por el método de dilución en tubo, presentando un CMI de 30 mg/mL. Este resultado es superior a este estudio ya que el extracto etanólico de *Caléndula officinalis* presentó una CMI de 25 mg/mL. (16)

Roopashree TS.2017 evaluó la CMI del extracto etanólico de *Caléndula officinalis* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* por el método de dilución en tubo, reportando una CMI de 32 mg/mL. Este resultado es superior a este estudio ya que el extracto etanólico de *Caléndula officinalis* presentó una CMI de 25 mg/mL. (67)

4.9.4.5 DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB) DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA”

Del ensayo estandarizado para hallar la concentración bactericida mínima por el método de sembrado en agar.

Aplicando la fórmula de estandarización, $F = \sqrt[r]{I}$, para hallar el factor de incremento F, basándonos en los resultados de la prueba piloto, se obtuvo un valor de F=1.104. Con este valor se determinaron las concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula” para aplicar en el ensayo de CBM.

TABLA N°48: CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” PARA EL ENSAYO DE LA CMB

PROCEDIMIENTO	N° DE CONCENTRACIONES	RESULTADO (mg/mL)
Conc.min	C1	50.00
C1* F	C2	55.20
C2* F	C3	60.95
C3* F	C4	67.30
C4* F	C5	74.30
C5* F	C6	82.03
C6* F	C7	90.57
C7* F	C8	100.00

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN:

La Tabla N°48, muestra concentraciones estándar de trabajo en creciente proporción geométrica respecto a las usadas para el ensayo piloto. Estas nuevas concentraciones fueron usadas para determinar la concentración bactericida mínima del extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula” frente a la cepa de estudio.

TABLA N°49: NUMERO DE COLONIAS DEL ENSAYO ESTÁNDAR DE LA CMB DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A *Staphylococcus aureus*

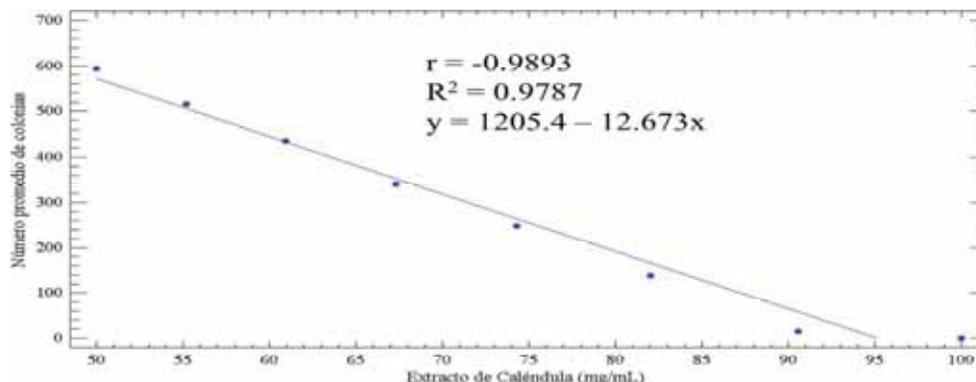
#	EXTRACTO ETANÓLICO DE CALÉNDULA (mg/mL)	NÚMERO DE COLONIAS			
		Placa 01	Placa 02	Placa 03	Promedio
1	50	595	588	601	594.67
2	55.20	521	510	516	515.67
3	60.95	439	435	432	435.33
4	67.30	335	342	345	340.67
5	74.30	242	249	254	248.33
6	82.03	142	141	133	138.67
7	90.57	16	18	12	15.33
8	100	0	0	0	0

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADO

La Tabla N°49, muestra los valores del conteo de colonias, tanto de manera individual, así como el promedio de estos. Los valores de las concentraciones de extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* junto al promedio de número de colonias se usaron para determinar la ecuación de regresión lineal para la determinación de la CMB teórico.

**GRÁFICO N° 9: REGRESIÓN LINEAL DE LAS CONCENTRACIONES DE
EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE CALÉNDULA VERSUS LOS
PROMEDIOS DEL NÚMERO DE COLONIAS EN CULTIVOS DE *Staphylococcus
aureus***



Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN

El Gráfico N°9, muestra la línea de tendencia obtenida mediante regresión lineal entre las concentraciones del extracto etanólico al 70% de Caléndula versus los promedios del número de colonias en cultivos de *S. aureus*; es así que se obtiene el estadístico $R^2 = 0.9787$, el cual nos indica que el modelo ajustado explica el 97.87% de la variabilidad en las concentraciones del extracto etanólico de *Caléndula officinalis* “Caléndula”. Por lo que se concluye que existe una relación inversamente proporcional entre la concentración del extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula” y su actividad antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, mientras que el coeficiente de correlación $r = -0.9893$ (valor muy próximo a -1) muestra una correlación negativa fuerte entre las variables.

Asimismo, de acuerdo a la ecuación $y = 1205.4 - 12.673x$ para la línea de tendencia, podemos inferir el valor de CBM teórico del extracto etanólico al 70% de Caléndula frente a *S. aureus* asumiendo un valor de $y = 0$, procediendo de la siguiente manera:

$$\begin{aligned}
 y &= 1205.4 - 12.673x & x &= \frac{1205.4}{12.673} \\
 0 &= 1205.4 - 12.673x & x &= 95.12 \text{ mg/mL} \\
 12.673x &= 1205.4
 \end{aligned}$$

Representando este resultado la CBM teórica del extracto etanólico al 70% de Caléndula frente a cepas de *S. aureus* ATCC® 25923.

4.9.4.6 DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

4.9.4.6.1 RESULTADOS DE LOS DIAMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE LAS FLORES DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

TABLA N°50: RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* FRENTE A *Staphylococcus aureus*

# PLACA	EXTRACTO ETANÓLICO DE CALÉNDULA (mg/50µL)	DIÁMETROS DE HALO DE INHIBICIÓN (mm)			
		D ₁	D ₂	D ₃	P _D
1	25.00	9.90	11.01	9.79	10.23
2	30.48	11.25	11.47	10.81	11.18
3	37.15	12.16	11.55	12.65	12.12
4	45.29	12.60	14.36	12.46	13.14
5	55.20	16.45	16.15	16.60	16.40
6	67.30	17.98	15.73	18.32	17.35
7	82.03	20.58	21.57	20.19	20.78
8	100.00	23.53	24.22	21.70	23.15
9	Ciprofloxacino 5 µg	36.51	37.23	37.11	36.95
10	Clindamicina 2 µg	22.32	23.13	22.57	22.67

Fuente: Datos experimentales del estudio.

DONDE:

D₁ = Diámetro 1

D₂ = Diámetro 2

D₃ = Diámetro 3

P_D = Diámetro promedio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADO

En la tabla N°50, podemos observar los resultados de los diámetros de los halos de inhibición con las concentraciones estandarizadas del extracto etanólico al 70 % de *Caléndula officinalis* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

En la tabla se muestran resultados que el extracto etanólico presenta un halo de inhibición mínimo de 10.23 mm en promedio a una concentración de 25.00 mg/50µL, presenta una actividad antibacteriana ligera; entre las concentraciones 37.15 mg/50µL y 45.29 mg/50µL del extracto etanólico presenta una actividad antibacteriana moderada; y a partir de la concentración 55.20 mg/50µL del extracto etanólico presenta una actividad antibacteriana marcada. **Según los criterios de Toda y Col. (71)**

TABLA N°51: HALOS DE INHIBICIÓN DE LOS FÁRMACOS PATRÓN PARA *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

FÁRMACO	CONCENTRACIÓN	ZONA DE DIÁMETRO DE INTERPRETACIÓN CRÍTICA (mm)		
		Sensible	Intermedio	Resistente
Ciprofloxacino	5 ug	≥ 21	16-20	≤ 15
Clindamicina	2 ug	≥ 21	15-20	≤ 14

Fuente: Comité Nacional de Estándares de Laboratorio (NCCLS) 2017. (25)

La tabla N°51, nos muestra los halos de inhibición para los discos de sensibilidad de Ciprofloxacino 5 ug y Clindamicina 2ug aceptables de acuerdo al Comité Nacional de Estándares de Laboratorio (NCCLS). estos fármacos se utilizaron como patrón en la determinación de la actividad antibacteriana de extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis*, lo cual nos permite determinar si la cepa bacteriana es resistente, intermedio o sensible al antibiótico, estos datos nos ayudan a concluir los resultados de la tabla N°50 ;en la cual podemos observar los halos de inhibición obtenidos para ciprofloxacino y amikacina que fueron de 36.95 y 22.67 respectivamente de acuerdo a estos resultados la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es sensible a los fármacos patrón utilizados.

El extracto etanólico al 70 % de *Caléndula officinalis* “Caléndula” presentó un halo de inhibición promedio máximo de 23.15 mm a una concentración de 100 mg/50uL siendo este valor próximo al patrón clindamicina con estos resultados podemos concluir que *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 es sensible al extracto etanólico al 70 % de *Caléndula officinalis* y también se encuentra dentro de los parámetros establecidos por el NCCLS ,con

lo cual podemos afirmar que el extracto presenta actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*.

Velazco G. 2018, determinó la actividad antibacteriana del extracto etanólico de las flores de *Caléndula officinalis* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis* por el método de difusión en disco obteniendo halos de inhibición promedio de 8.6 mm y 00 mm respectivamente. Estos resultados son inferiores respecto a esta investigación ya que el extracto etanólico al 70 % de *Caléndula officinalis* presento un halo de inhibición promedio de 23.15 mm. (16)

Meziou C, Roopashree TS, Farjana A 2014, mencionan que la *C. officinalis* es la especie que presenta el mayor número de reportes de evaluación de actividad antimicrobiana frente a cepas del género *Staphylococcus*, variando los resultados de un estudio a otro. Para esta especie, se tiene reportado halos de inhibición de 28 mm, 18 mm y 24 mm, para los extractos etanólico, metanólico y fenólico. (76) (77) (78)

Farjana A. 2014, determino la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Caléndula officinalis* frente a *Staphylococcus aureus* por el método de difusión en agar, presentó un halo de inhibición de 22 mm. Este resultado se aproxima a los resultados obtenidos en este estudio. (77)

Roopashree TS y Vora J 2017, evaluaron la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos y metanólicos respectivamente de *Caléndula officinalis* los cuales no reportaron sensibilidad frente a *S. aureus*. Estos resultados siendo contrarios a este estudio ya que el extracto etanólico de *Caléndula officinalis* presentó un halo de inhibición promedio máximo de 23.15 mm. (67) (79)

Leal M. 2014 demostró la eficacia antibacteriana in vitro de extracto etanólico al 70 % de *Caléndula officinalis* por el método de difusión en agar frente a *S. aureus* ATCC 25923, mostrando efecto bactericida en las diluciones de 1:1, 1:4 y 1:8 que interpreta como efecto bactericida de 100 %. (13)

Según estos resultados la actividad antibacteriana del extracto etanólico al 70 % de *Caléndula officinalis* podría deberse a la abundante cantidad de flavonoides y compuestos fenólicos presenciado en la marcha fitoquímica que además han sido reportados como uno de los principales metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana. Según **Cañizares T.2016**. (80)

4.9.4.6.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

TABLA N°52: RESULTADOS DESCRIPTIVOS PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

Extracto etanólico de <i>Caléndula</i> (mg/50µL)	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Error Estándar	Mínimo	Máximo
25.00	3	10.23	0.67	0.39	9.79	11.01
30.48	3	11.18	0.34	0.19	10.81	11.47
37.15	3	12.12	0.55	0.32	11.55	12.65
45.29	3	13.14	1.06	0.61	12.46	14.36
55.20	3	16.40	0.23	0.13	16.15	16.60
67.30	3	17.34	1.41	0.81	15.73	18.32
82.03	3	20.78	0.71	0.41	20.19	21.57
100.00	3	23.15	1.30	0.75	21.70	24.22
Ciprofloxacino 5 µg	3	36.95	0.39	0.22	36.51	37.23
Clindamicina 2 µg	3	22.67	0.41	0.24	22.32	23.13
Total	30	18.40	7.79	1.42	9.79	37.23

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

INTERPRETACIÓN

En la tabla N°52, se observan los resultados descriptivos de los resultados reportados en la tabla, donde la media del diámetro de mayor actividad fue de 23.15 mm (celda turquesa) a una concentración de extracto de 100 mg/50µL y la media del diámetro de menor actividad fue de 10.23 mm (celda amarilla) a una concentración de extracto de 25 mg/50µL. El menor error estándar de la media de diámetro de inhibición (celda verde) se dio a una concentración de 55.20 mg/50µL con 16.40 mm de diámetro (celda naranja). Se distingue que los diámetros entre los puntos mayor y menor son concentración-dependientes. Con respecto a los fármacos patrones Ciprofloxacino 5 µg y Amikacina 30 µg, poseen un diámetro promedio de inhibición de 36.95 mm y 22.67 mm respectivamente.

TABLA N°53: ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1745.05	9	193.90	296.04	0.00
Intra grupos	13.10	20	0.65		
Total (Corr.)	1758.15	29			

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

DONDE:

Gl.= Grados de libertad

F= Distribución de Fisher

Sig.= Significancia

Sig.= Mayor a 0.05 no existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

Sig.= Menor igual a 0.05 existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

INTERPRETACIÓN

La tabla N°53, muestra el análisis de la varianza de los resultados reportados en la tabla N°50; y de acuerdo a éste análisis se puede apreciar que se halló una diferencia estadísticamente significativa en las medias de los diámetros de inhibición de crecimiento bacteriano a favor del extracto etanólico de caléndula, siendo el valor obtenido de significancia menor a 0.05 (Valor-P = 0.00), por tanto se acepta la hipótesis de que las concentraciones agrupadas de extracto no tienen un efecto similar en la inhibición de crecimiento; o dicho de otra forma, cada grupo de concentraciones genera halos de inhibición diferentes.

TABLA N°54: PRUEBA POST HOC DE TUKEY PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

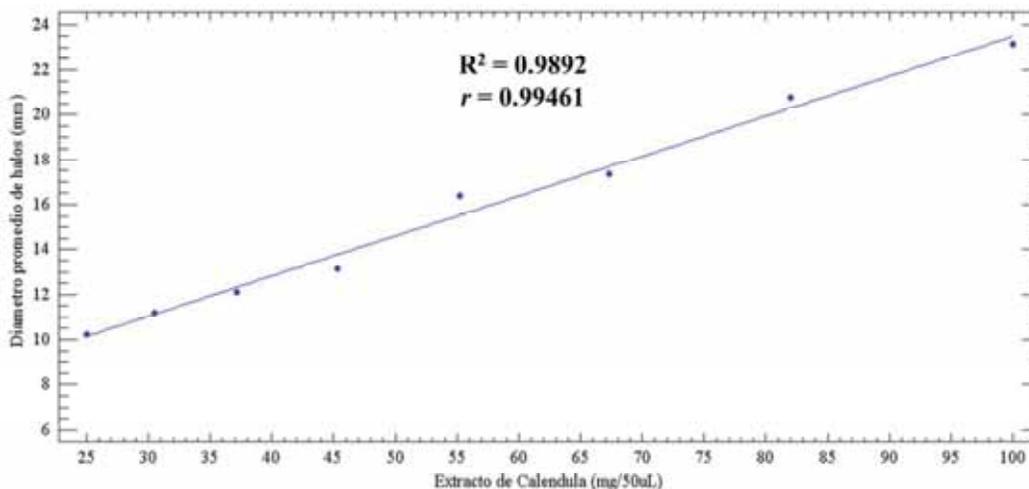
Extracto etanólico de Caléndula (mg/50µL)	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
25.00	3	10.23					
30.48	3	11.18	11.18				
37.15	3	12.12	12.12				
45.29	3		13.14				
55.20	3			16.40			
67.30	3			17.34			
82.03	3				20.78		
Clindamicina 2 µg	3				22.67	22.67	
100.00	3					23.15	
Ciprofloxacino 5 µg	3						36.95
Sig.		0.18	0.15	0.90	0.18	1.00	1.00

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

INTERPRETACIÓN

La tabla N°54, nos muestra en función a la prueba HSD de Tukey, las medias que pueden ser consideradas similares, existiendo 6 subgrupos. Así los valores de significancia mayores a 0.05 nos dicen que las medias de los halos de inhibición son similares entre sí, ya que las diferencias no son estadísticamente significativas. Además se puede inferir que la concentración de 82 mg/50µL y de 100.00 mg/50µL producen halos de inhibición promedios comparables al fármaco patrón Clindamicina 2 µg; no obstante, ninguna concentración tiene una actividad comparable al fármaco patrón Ciprofloxacino 5 µg.

GRÁFICO N° 10: REGRESIÓN LINEAL DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE CALÉNDULA VS LOS DIÁMETROS PROMEDIOS DE SUS HALOS DE INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923



Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN

El Gráfico N°10, muestra la línea de tendencia obtenida mediante regresión lineal relación entre las concentraciones del extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* versus los promedios de las mediciones de los halos de inhibición en cultivos de *S. aureus*; es así que se obtiene el estadístico $R^2 = 0.9892$, el cual nos indica que el modelo ajustado explica el 98.92% de la variabilidad en los promedios de los halos de inhibición, mientras que el coeficiente de correlación $r = 0.99461$ (valor muy próximo a 1) muestra una correlación positiva fuerte entre las variables.

4.9.5 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL JABÓN LÍQUIDO FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 35218

4.9.5.1 DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 35218

4.9.5.1.1 Concentraciones estandarizadas del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque”

TABLA N°55: CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Colletia spinosissima*

PROCEDIMIENTO	N° DE CONCENTRACIONES	RESULTADO (%)
Conc. Mínima	C1	1.00
C1* F	C2	1.17
C2* F	C3	1.37
C3* F	C4	1.60
C4* F	C5	1.87
C5* F	C6	2.19
C6* F	C7	2.56
C7* F	C8	3.00

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN

La Tabla N°55, muestra concentraciones estándar de trabajo en creciente proporción geométrica respecto a las usadas para el ensayo piloto. Estas nuevas concentraciones fueron usadas para determinar los halos de inhibición del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” frente a la cepa de estudio.

TABLA N°56: RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A CEPAS DE *E. coli* ATCC 35218

# Placa	Jabón líquido elaborado con Extracto etanólico al 70% de <i>Colletia spinosissima</i> “Roque” (%)	Diámetros de halo de inhibición (mm)			
		D ₁	D ₂	D ₃	P _D
1	1.00	23.46	23.20	22.54	23.07
2	1.17	23.92	24.49	24.12	24.18
3	1.37	23.99	25.21	24.96	24.72
4	1.60	25.91	25.41	25.66	25.66
5	1.87	26.49	26.23	27.02	26.58
6	2.19	28.60	27.77	26.93	27.77
7	2.56	28.67	29.84	28.96	29.16
8	3.00	31.93	31.62	32.12	31.89
9	Jabón líquido patrón	36.23	35.78	36.20	36.07
10	Jabón líquido control	12.42	13.98	11.59	12.66

Fuente: Datos experimentales del estudio.

DONDE:

D₁ = Diámetro 1

D₂ = Diámetro 2

D₃ = Diámetro 3

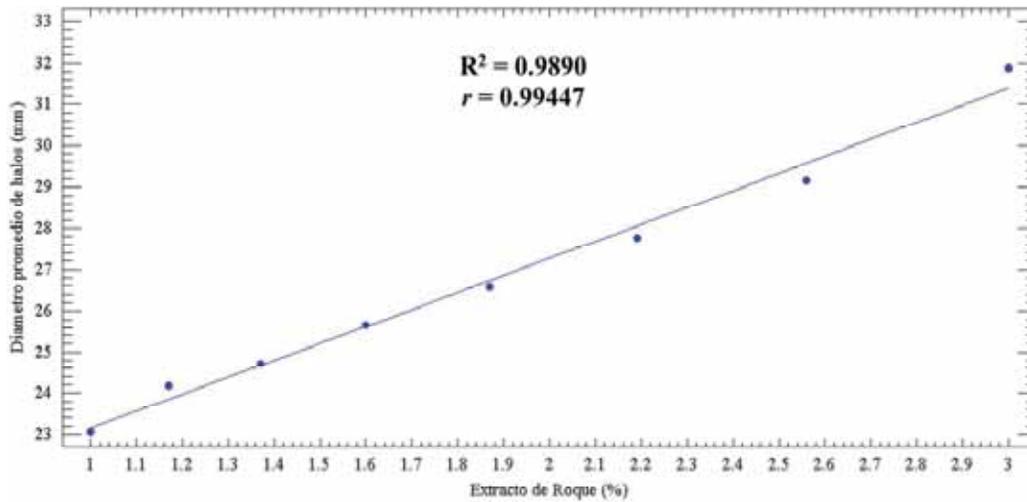
P_D = Diámetro promedio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En la tabla N°56, podemos observar los resultados de los diámetros de los halos de inhibición del efecto antibacteriano de la formulación de jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque”, del jabón líquido patrón y el jabón líquido control (sin extracto) frente a cepas de *E. coli* ATCC 35218.

GRÁFICO N°11: REGRESIÓN LINEAL DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE ROQUE EN JABÓN LÍQUIDO

ANTIBACTERIAL VS LOS DIÁMETROS PROMEDIOS DE SUS HALOS DE INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE *E. coli*



Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN

El Gráfico N°11, muestra la línea de tendencia obtenida mediante regresión lineal relación entre las concentraciones del extracto etanólico de Roque en jabón líquido antibacterial versus los promedios de las mediciones de los halos de inhibición en cultivos de *E. coli*; es así que se obtiene el estadístico $R^2 = 0.9890$, el cual nos indica que el modelo ajustado explica el 98.90% de la variabilidad en los promedios de los halos de inhibición, mientras que el coeficiente de correlación $r = 0.99447$ (valor muy próximo a 1) muestra una correlación positiva fuerte entre las variables.

4.9.5.1.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A CEPAS DE *E. coli* ATCC 35218

TABLA N°57: RESULTADOS DESCRIPTIVOS PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Colletia spinosissima* “ROQUE”.FRENTE A CEPAS DE *E. coli* ATCC 35218

Extracto etanólico del Roque (%)	Recuento	Promedio	Desviación estándar	Error estándar	Mínimo	Máximo
1.00	3	23.07	0.47	0.27	22.54	23.46
1.17	3	24.18	0.29	0.17	23.92	24.49
1.37	3	24.72	0.64	0.37	23.99	25.21
1.60	3	25.66	0.25	0.14	25.41	25.91
1.87	3	26.58	0.40	0.23	26.23	27.02
2.19	3	27.77	0.84	0.48	26.93	28.60
2.56	3	29.16	0.61	0.35	28.67	29.84
3.00	3	31.89	0.25	0.15	31.62	32.12
Jabón líquido patrón	3	36.07	0.25	0.15	35.78	36.23
Jabón líquido control	3	12.66	1.21	0.70	11.59	13.98
Total	30	26.17	5.96	1.09	11.59	36.23

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

INTERPRETACIÓN

En la tabla N°57, se observan los resultados descriptivos de los datos reportados en la tabla N°56, donde la media del diámetro de mayor actividad fue de 31.89 mm (celda turquesa) a una concentración de extracto del 3% y la media del diámetro de menor actividad fue de 23.07 mm (celda amarilla) a una concentración de extracto del 1%. El menor error estándar de la media de diámetro de inhibición (celda verde) se dio a una concentración de 1.60% con 25.66 mm de diámetro (celda naranja). Se distingue que los diámetros entre los puntos mayor y menor son concentración-dependientes. Con respecto al jabón usado como patrón y el jabón líquido sin extracto añadido (Blanco), poseen un diámetro promedio de inhibición de 36.07 mm y 12.66 mm respectivamente.

TABLA N°58: ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A CEPAS DE *E. coli* ATCC 35218

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1023.00	9	113.60	314.09	0.00
Intra grupos	7.23	20	0.36		
Total (Corr.)	1030.00	29			

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

DONDE:

Gl.= Grados de libertad

F= Distribución de Fisher

Sig.= Significancia

Sig.= Mayor a 0.05 no existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

Sig.= Menor igual a 0.05 existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

INTERPRETACIÓN

La tabla N°58, muestra el análisis de la varianza de los resultados reportados en la tabla N°56 ; y de acuerdo a éste análisis se puede apreciar que se halló una diferencia estadísticamente significativa en las medias de los diámetros de inhibición de crecimiento bacteriano a favor del extracto etanólico al 70% de Roque en jabón líquido antibacterial, siendo el valor obtenido de significancia menor a 0.05 (Valor-P = 0.00), por tanto se considera que las concentraciones agrupadas de extracto no tienen un efecto similar en la inhibición de crecimiento; o dicho de otra forma, cada grupo de concentraciones genera halos de inhibición diferentes.

TABLA N°59: PRUEBA POST HOC DE TUKEY PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A CEPAS DE *E. coli* ATCC 35218

Jabón líquido elaborado con extracto etanólico de Roque (%)			Subconjunto para alfa = 0.05							
			N	1	2	3	4	5	6	7
Jabón líquido sin extracto	3	12.66								
1.00	3	23.07								
1.17	3	24.18	24.18							
1.37	3	24.72	24.72							
1.60	3		25.66	25.66						
1.87	3			26.58	26.58					
2.19	3				27.77	27.77				
2.56	3					29.16				
3.00	3							31.89		
Jabón líquido patrón	3									36.07
Sig.		1.00	0.07	0.12	0.68	0.36	0.19	1.00	1.00	

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

INTERPRETACIÓN

La tabla N°59, nos muestra en función a la prueba HSD de Tukey, las medias que pueden ser consideradas similares, existiendo 8 subgrupos. Así los valores de significancia mayores a 0.05 de cada subgrupo nos dicen que las medias de los halos de inhibición son similares entre sí, ya que las diferencias no son estadísticamente significativas. Además se puede inferir que ninguna concentración tiene una actividad comparable con el jabón usado como patrón.

4.9.5.1.2 Concentraciones estandarizadas del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de *Calendula officinalis* “Caléndula”

TABLA N°60: CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Calendula officinalis*

PROCEDIMIENTO	N° DE CONCENTRACIONES	RESULTADO (%)
Conc.minima	C1	1.00
C1* F	C2	1.32
C2* F	C3	1.74
C3* F	C4	2.30
C4* F	C5	3.04
C5* F	C6	4.01
C6* F	C7	5.30
C7* F	C8	7.00

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN

La Tabla N°60, muestra concentraciones estándar de trabajo en creciente proporción geométrica respecto a las usadas para el ensayo piloto. Estas nuevas concentraciones fueron usadas para determinar los halos de inhibición del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de *Calendula officinalis* “Caléndula” frente a la cepa de estudio.

TABLA N°61: RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A CEPAS DE *E. coli* ATCC 35218

# Placa	Jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de Caléndula (%)	Diámetros de halo de inhibición (mm)			
		D ₁	D ₂	D ₃	P _D
1	1.00	19.55	18.63	20.29	19.49
2	1.32	19.75	18.98	19.94	19.56
3	1.74	21.13	18.32	20.73	20.06
4	2.30	21.82	23.10	19.68	21.53
5	3.04	21.44	21.67	25.36	22.82
6	4.01	26.02	26.00	27.79	26.60
7	5.30	28.73	27.60	28.17	28.17
8	7.00	33.61	29.13	32.01	31.58
9	Jabón líquido patrón	36.45	35.01	36.15	35.87
10	Jabón líquido sin extracto	13.39	12.56	12.11	12.69

Fuente: Datos experimentales del estudio.

DONDE:

D₁ = Diámetro 1

D₂ = Diámetro 2

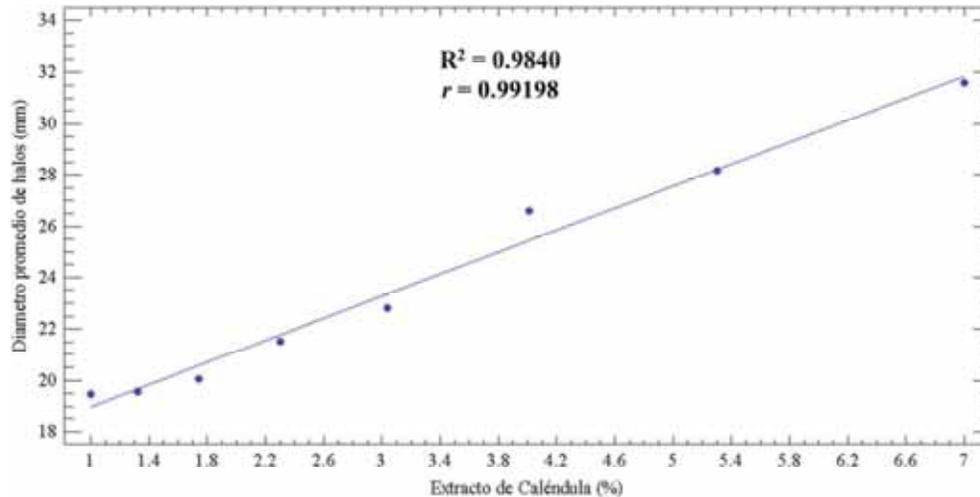
D₃ = Diámetro 3

P_D = Diámetro promedio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

En la tabla N°61, podemos observar los resultados de los diámetros de los halos de inhibición del efecto antibacteriano de la formulación de jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula”, del jabón líquido patrón y el jabón líquido control (sin extracto), frente a cepas de *E. coli* ATCC 35218.

GRÁFICO N°12: REGRESIÓN LINEAL DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE CALÉNDULA EN JABÓN LÍQUIDO ANTIBACTERIAL VS LOS DIÁMETROS PROMEDIOS DE SUS HALOS DE INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE *E. coli*



Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN

El Gráfico N°12, muestra la línea de tendencia obtenida mediante regresión lineal relación entre las concentraciones del extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* de jabón líquido antibacterial versus los promedios de las mediciones de los halos de inhibición en cultivos de *E. coli*; es así que se obtiene el estadístico $R^2 = 0.9840$, el cual nos indica que el modelo ajustado explica el 98.40% de la variabilidad en los promedios de los halos de inhibición, mientras que el coeficiente de correlación $r = 0.99198$ (valor muy próximo a 1) muestra una correlación positiva fuerte entre las variables.

4.9.5.1.2.1 ANALISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A CEPAS DE *E. coli* ATCC 35218

TABLA N°62: RESULTADOS DESCRIPTIVOS PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A CEPAS *E. coli* ATCC 35218

Extracto etanólico de Caléndula (%)	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Error estándar	Mínimo	Máximo
1.00	3	19.49	0.83	0.48	18.63	20.29
1.32	3	19.56	0.51	0.29	18.98	19.94
1.74	3	20.06	1.52	0.88	18.32	21.13
2.30	3	21.53	1.73	1.00	19.68	23.10
3.04	3	22.82	2.20	1.27	21.44	25.36
4.01	3	26.60	1.03	0.59	26.00	27.79
5.30	3	28.17	0.57	0.33	27.60	28.73
7.00	3	31.58	2.27	1.31	29.13	33.61
Jabón líquido patrón	3	35.87	0.76	0.44	35.01	36.45
Jabón líquido sin extracto	3	12.69	0.65	0.37	12.11	13.39
Total	30	23.84	6.64	1.21	12.11	36.45

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

INTERPRETACIÓN

En la tabla N°62, se observan los resultados descriptivos de los datos reportados en la tabla N°61, donde la media del diámetro de mayor actividad fue de 31.58 mm (celda turquesa) a una concentración de extracto del 7% y la media del diámetro de menor actividad fue de 19.49 mm (celda amarilla) a una concentración de extracto del 1%. El menor error estándar de la media de diámetro de inhibición (celda verde) se dio a una concentración de 1.32% con 19.56 mm de diámetro (celda naranja). Se distingue que los diámetros entre los puntos mayor y menor son concentración-dependientes. Con respecto al jabón usado como patrón y el jabón líquido sin extracto añadido (Blanco), poseen un diámetro promedio de inhibición de 35.87 mm y 12.69 mm respectivamente.

TABLA N°63: ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A CEPAS DE *E. coli* ATCC 35218

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1240.04	9	137.78	74.02	0.00
Intra grupos	37.23	20	1.86		
Total (Corr.)	1277.26	29			

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

DONDE:

Gl.= Grados de libertad

F= Distribución de Fisher

Sig.= Significancia

Sig.= Mayor a 0.05 no existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

Sig.= Menor igual a 0.05 existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

INTERPRETACIÓN

La tabla N°63, muestra el análisis de la varianza de los resultados reportados en la tabla N°61 ; y de acuerdo a éste análisis se puede apreciar que se halló una diferencia estadísticamente significativa en las medias de los diámetros de inhibición de crecimiento bacteriano a favor del extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* en jabón líquido antibacterial, siendo el valor obtenido de significancia menor a 0.05 (Valor-P = 0.00), por tanto se considera que las concentraciones agrupadas de extracto no tienen un efecto similar en la inhibición de crecimiento; o dicho de otra forma, cada grupo de concentraciones genera halos de inhibición diferentes.

TABLA N°64: PRUEBA POST HOC DE TUKEY PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A CEPAS DE *E. coli* ATCC 35218

Jabón líquido elaborado con extracto etanólico de Caléndula (%)	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Jabón líquido sin extracto	3	12.69					
1.00	3		19.49				
1.32	3		19.56				
1.74	3		20.06				
2.30	3		21.53				
3.04	3		22.82	22.82			
4.01	3			26.60	26.60		
5.30	3				28.17	28.17	
7.00	3					31.58	
Jabón líquido patrón	3						35.87
Sig.		1.00	0.14	0.07	0.91	0.13	1.00

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

INTERPRETACIÓN

La tabla N°64, nos muestra en función a la prueba HSD de Tukey, las medias que pueden ser consideradas similares, existiendo 6 subgrupos. Así los valores de significancia mayores a 0.05 de cada subgrupo nos dicen que las medias de los halos de inhibición son similares entre sí, ya que las diferencias no son estadísticamente significativas. Además se puede inferir que ninguna concentración tiene una actividad comparable con el jabón usado como patrón.

4.9.6 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL JABÓN LÍQUIDO FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

4.9.6.1 DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA CON LAS CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

4.9.6.1.1 Concentraciones estandarizadas del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque”

TABLA N°65: CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Colletia spinosissima*

PROCEDIMIENTO	N° DE CONCENTRACIONES	RESULTADO (%)
Conc.minima	C1	1.00
C1* F	C2	1.26
C2* F	C3	1.58
C3* F	C4	1.99
C4* F	C5	2.51
C5* F	C6	3.16
C6* F	C7	3.97
C7* F	C8	5.00

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN

La Tabla N°65, muestra concentraciones estándar de trabajo en creciente proporción geométrica respecto a las usadas para el ensayo piloto. Estas nuevas concentraciones fueron usadas para determinar los halos de inhibición del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” frente a la cepa de estudio.

TABLA N°66: RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

# Placa	Jabón líquido elaborado con extracto etanólico del Roque (%)	Diámetros de halo de inhibición (mm)			
		D ₁	D ₂	D ₃	P _D
1	1.00	14.56	14.44	14.89	14.63
2	1.26	15.59	15.90	15.52	15.67
3	1.58	16.31	15.88	16.24	16.14
4	1.99	18.52	16.73	16.90	17.38
5	2.51	18.64	17.03	18.50	18.06
6	3.16	20.37	19.02	18.51	19.30
7	3.97	21.47	20.98	22.92	21.79
8	5.00	24.26	21.74	24.94	23.65
9	Jabón líquido patrón	27.23	28.43	27.13	27.60
10	Jabón líquido control (sin extracto)	12.10	11.20	13.22	12.17

Fuente: Datos experimentales del estudio.

DONDE:

D₁ = Diámetro 1

D₂ = Diámetro 2

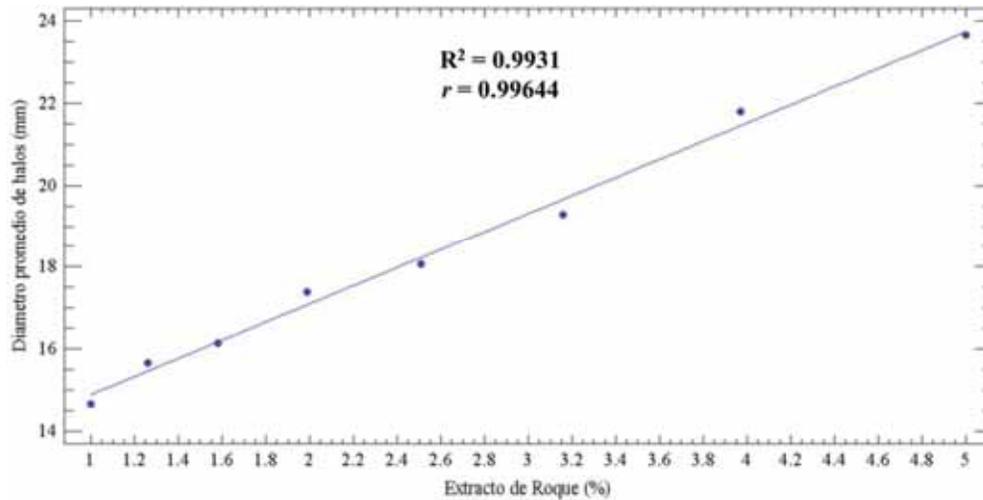
D₃ = Diámetro 3

P_D = Diámetro promedio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

En la tabla N°66, podemos observar los resultados de los diámetros de los halos de inhibición del efecto antibacteriano de la formulación de jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque”, del jabón líquido patrón y el jabón líquido control (sin extracto) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923.

GRÁFICO N° 13: REGRESIÓN LINEAL DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE ROQUE EN JABÓN LÍQUIDO ANTIBACTERIAL VS LOS DIÁMETROS PROMEDIOS DE SUS HALOS DE INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE *S. aureus*



Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN

El Gráfico N°13, muestra la línea de tendencia obtenida mediante regresión lineal relación entre las concentraciones del extracto etanólico al 70% de Roque en jabón líquido antibacteriano versus los promedios de las mediciones de los halos de inhibición en cultivos de *S. aureus*; es así que se obtiene el estadístico $R^2 = 0.9931$, el cual nos indica que el modelo ajustado explica el 99.31% de la variabilidad en los promedios de los halos de inhibición, mientras que el coeficiente de correlación $r = 0.99644$ (valor muy próximo a 1) muestra una correlación positiva fuerte entre las variables.

4.9.6.1.1.1 ANALISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

TABLA N°67: RESULTADOS DESCRIPTIVOS PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Extracto etanólico del Roque (%)	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Error estándar	Mínimo	Máximo
1.00	3	14.63	0.20	0.11	14.54	14.89
1.26	3	15.67	0.20	0.12	15.52	15.90
1.58	3	16.14	0.23	0.13	15.88	16.31
1.99	3	17.38	0.99	0.57	16.73	18.52
2.51	3	18.06	0.89	0.51	17.03	18.64
3.16	3	19.30	0.96	0.55	18.51	20.37
3.97	3	21.79	1.01	0.58	20.98	22.92
5.00	3	23.65	1.69	0.97	21.74	24.94
Jabón líquido patrón	3	27.60	0.72	0.42	27.13	28.43
Jabón líquido sin extracto	3	12.17	1.01	0.58	11.20	13.22
Total	30	18.64	4.50	0.82	11.2	28.43

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

INTERPRETACIÓN

En la tabla N°67, se observan los resultados descriptivos de los datos reportados en la tabla N°66, donde la media del diámetro de mayor actividad fue de 23.65 mm (celda turquesa) a una concentración de extracto del 5% y la media del diámetro de menor actividad fue de 14.63 mm (celda amarilla) a una concentración de extracto del 1%. El menor error estándar de la media de diámetro de inhibición (celda verde) se dio a una concentración de 1% con 14.66 mm de diámetro (celda amarilla). Se distingue que los diámetros entre los puntos mayor y menor son concentración-dependientes. Con respecto al jabón usado como patrón y el jabón líquido sin extracto añadido (Blanco), poseen un diámetro promedio de inhibición de 27.60 mm y 12.17 mm respectivamente.

TABLA N°68: ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	570.80	9	63.42	77.01	0.00
Intra grupos	16.47	20	0.82		
Total (Corr.)	587.20	29			

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

DONDE:

Gl.= Grados de libertad

F= Distribución de Fisher

Sig.= Significancia

Sig.= Mayor a 0.05 no existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

Sig.= Menor igual a 0.05 existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

INTERPRETACIÓN

La tabla N°68, muestra el análisis de la varianza de los resultados reportados en la tabla N°66; y de acuerdo a éste análisis se puede apreciar que se halló una diferencia estadísticamente significativa en las medias de los diámetros de inhibición de crecimiento bacteriano a favor del extracto etanólico al 70% de Roque en jabón líquido antibacterial, siendo el valor obtenido de significancia menor a 0.05 (Valor-P = 0.00), por tanto se considera que las concentraciones agrupadas de extracto no tienen un efecto similar en la inhibición de crecimiento; o dicho de otra forma, cada grupo de concentraciones genera halos de inhibición diferentes.

TABLA N°69: PRUEBA POST HOC DE TUKEY PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

Jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% del Roque (%)	N	Subconjunto para alfa = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Jabón líquido sin extracto	3	12.17						
1.00	3	14.63	14.63					
1.26	3		15.67	15.67				
1.58	3		16.14	16.14				
1.99	3			17.38	17.38			
2.51	3			18.06	18.06			
3.16	3				19.30	19.30		
3.97	3					21.79	21.79	
5.00	3						23.65	
Jabón líquido patrón	3							27.60
Sig.		0.08	0.58	0.09	0.29	0.07	0.32	1.00

Fuente: Datos estadísticos del estudio.

INTERPRETACIÓN

La tabla N°69, nos muestra en función a la prueba HSD de Tukey, las medias que pueden ser consideradas similares, existiendo 5 subgrupos. Así los valores de significancia mayores a 0.05 de cada subgrupo nos dicen que las medias de los halos de inhibición son similares entre sí, ya que las diferencias no son estadísticamente significativas. Además se puede inferir que ninguna concentración tiene una actividad comparable con el jabón usado como patrón.

4.9.6.1.2 Concentraciones estandarizadas del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula”

TABLA N°70: CONCENTRACIONES ESTANDARIZADAS DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Caléndula officinalis*

PROCEDIMIENTO	N° DE CONCENTRACIONES	RESULTADO (%)
Conc. Mínima	C1	1.00
C1* F	C2	1.26
C2* F	C3	1.58
C3* F	C4	1.99
C4* F	C5	2.51
C5* F	C6	3.16
C6* F	C7	3.97
C7* F	C8	5.00

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN

La Tabla N°70, muestra concentraciones estándar de trabajo en creciente proporción geométrica respecto a las usadas para el ensayo piloto. Estas nuevas concentraciones fueron usadas para determinar los halos de inhibición del jabón líquido elaborado con extracto al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula” frente a la cepa de estudio.

TABLA N°71: RESULTADOS DE LOS DIÁMETROS DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EL EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923.

# Placa	Jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de Caléndula (%)	Diámetros de halo de inhibición (mm)			
		D ₁	D ₂	D ₃	P _D
1	1.00	14.92	16.26	15.37	15.52
2	1.26	16.52	16.21	14.05	15.59
3	1.58	17.05	15.76	15.92	16.24
4	1.99	15.89	18.42	17.58	17.30
5	2.51	17.39	17.75	18.82	17.99
6	3.16	19.32	19.42	20.11	19.62
7	3.97	20.01	20.22	22.30	20.84
8	5.00	20.83	22.70	24.03	22.52
9	Jabón líquido patrón	27.54	27.78	28.04	27.79
10	Jabón líquido control(sin extracto)	12.38	12.01	12.90	12.43

Fuente: Datos experimentales del estudio.

DONDE:

D₁ = Diámetro 1

D₂ = Diámetro 2

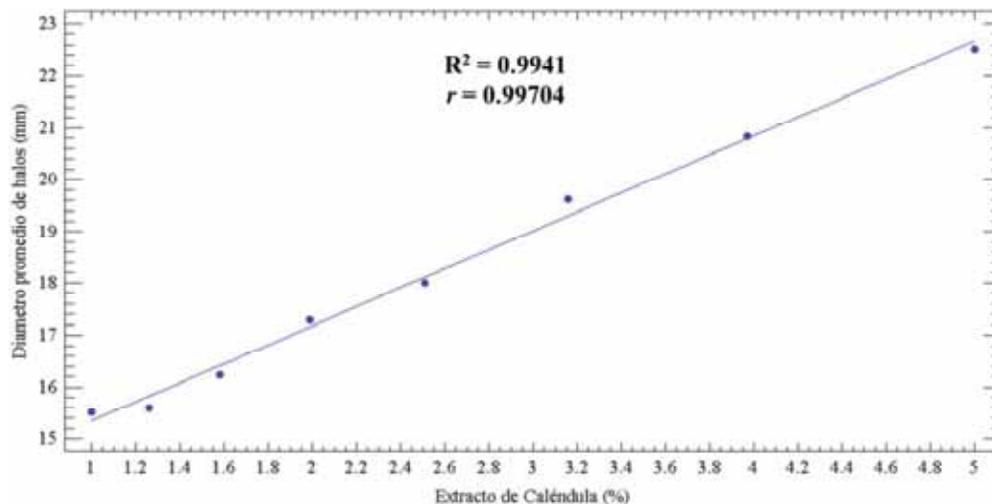
D₃ = Diámetro 3

P_D = Diámetro promedio

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

En la tabla N°71, podemos observar los resultados de los diámetros de los halos de inhibición del efecto antibacteriano de la formulación de jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula”, del jabón líquido patrón y el jabón líquido control (sin extracto) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923.

GRÁFICO N°14: REGRESIÓN LINEAL DE LAS CONCENTRACIONES DE EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE CALÉNDULA EN JABÓN LÍQUIDO ANTIBACTERIAL VS LOS DIÁMETROS PROMEDIOS DE SUS HALOS DE INHIBICIÓN EN CULTIVOS DE *S. aureus*



Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN

El Gráfico N°14, muestra la línea de tendencia obtenida mediante regresión lineal relación entre las concentraciones del extracto etanólico de al 70% *Caléndula officinalis* en jabón líquido antibacteriano versus los promedios de las mediciones de los halos de inhibición en cultivos de *S. aureus*; es así que se obtiene el estadístico $R^2 = 0.9941$, el cual nos indica que el modelo ajustado explica el 99.41% de la variabilidad en los promedios de los halos de inhibición, mientras que el coeficiente de correlación $r = 0.99704$ (valor muy próximo a 1) muestra una correlación positiva fuerte entre las variables.

4.9.6.1.2.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

TABLA N°72: RESULTADOS DESCRIPTIVOS PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A CEPAS *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

Extracto etanólico de Caléndula (%)	Recuento	Promedio	Desviación Estándar	Error estándar	Mínimo	Máximo
1.00	3	15.52	0.68	0.39	14.92	16.26
1.26	3	15.59	1.35	0.78	14.05	16.52
1.58	3	16.24	0.70	0.41	15.76	17.05
1.99	3	17.30	1.29	0.74	15.89	18.42
2.51	3	17.99	0.74	0.43	17.39	18.82
3.16	3	19.62	0.43	0.25	19.32	20.11
3.97	3	20.84	1.27	0.73	20.01	22.30
5.00	3	22.52	1.61	0.93	20.83	24.03
Jabón líquido patrón	3	27.79	0.25	0.14	27.54	28.04
Jabón líquido sin extracto	3	12.43	0.45	0.26	12.01	12.90
Total	30	18.58	4.27	0.78	12.01	28.04

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

INTERPRETACIÓN

En la tabla N°72, se observan los resultados descriptivos de los datos reportados en la tabla N°71, donde la media del diámetro de mayor actividad fue de 22.52 mm (celda turquesa) a una concentración de extracto del 5% y la media del diámetro de menor actividad fue de 15.52 mm (celda amarilla) a una concentración de extracto del 1%. El menor error estándar de la media de diámetro de inhibición (celda verde) se dio a una concentración de 1.00% con 15.52 mm de diámetro (celda amarilla). Se distingue que los diámetros entre los puntos mayor y menor son concentración-dependientes. Con respecto al jabón usado como patrón y el jabón líquido sin extracto añadido (Blanco), poseen un diámetro promedio de inhibición de 27.79 mm y 12.43 mm respectivamente.

TABLA N°73: ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	510.21	9	56.69	58.94	0.00
Intra grupos	19.24	20	0.96		
Total (Corr.)	529.44	29			

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

DONDE:

Gl.= Grados de libertad

F= Distribución de Fisher

Sig.= Significancia

Sig.= Mayor a 0.05 no existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

Sig.= Menor igual a 0.05 existe diferencia significativa entre los halos de inhibición.

INTERPRETACIÓN

La tabla N°73, muestra el análisis de la varianza de los resultados reportados en la tabla N°71; y de acuerdo a éste análisis se puede apreciar que se halló una diferencia estadísticamente significativa en las medias de los diámetros de inhibición de crecimiento bacteriano a favor del extracto etanólico al 70% de Caléndula en jabón líquido antibacterial, siendo el valor obtenido de significancia menor a 0.05 (Valor-P = 0.00), por tanto se considera que las concentraciones agrupadas de extracto no tienen un efecto similar en la inhibición de crecimiento; o dicho de otra forma, cada grupo de concentraciones genera halos de inhibición diferentes.

TABLA N°74: PRUEBA POST HOC DE TUKEY PARA EL ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923

Jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de Caléndula (%)	N	Subconjunto para alfa = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
Jabón líquido sin extracto	3	12.43					
1.00	3	15.52					
1.26	3	15.59					
1.58	3	16.24					
1.99	3	17.30	17.30				
2.51	3	17.99	17.99				
3.16	3		19.62	19.62			
3.97	3				20.84	20.84	
5.00	3					22.52	
Jabón líquido patrón	3						27.79
Sig.		1.00	0.12	0.17	0.86	0.55	1.00

Fuente: Datos estadísticos del Estudio.

INTERPRETACIÓN

La tabla N°74, nos muestra en función a la prueba HSD de Tukey, las medias que pueden ser consideradas similares, existiendo 6 subgrupos. Así los valores de significancia mayores a 0.05 de cada subgrupo nos dicen que las medias de los halos de inhibición son similares entre sí, ya que las diferencias no son estadísticamente significativas. Además se puede inferir que ninguna concentración tiene una actividad comparable con el jabón usado como patrón.

4.10 FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DE JABÓN LÍQUIDO ANTIBACTERIAL CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 %

4.10.1 FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DE JABÓN LÍQUIDO ANTIBACTERIAL CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” AL 3 % DE CONCENTRACIÓN

CUADRO N° 2: CONTROL DE CALIDAD DE LAS 4 FORMULACIONES REALIZADAS PARA OBTENER EL JABÓN LÍQUIDO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Colletia spinosissima* AL 3 % DE CONCENTRACIÓN FINAL.

PRUEBAS	F1	F2	F3	F4
Viscosidad(cps)	1564	1890	2100	2680
pH	7.5	5.3	4.8	5.8
Densidad (g/mL)	1.021	1.033	1.015	1.045
Color	Verde Fuerte	Verde Oscuro	Verde limón	Verde limón
Olor	Fuerte a Roque	Fuerte a Roque	Roque agradable	Roque agradable
Formación de espuma	++++	++++	++++	++++
Facilidad de incorporación de insumos	Mala	Mala	Regular	Buena
Homogeneidad	No homogénea	No homogénea	Homogénea	Homogénea
Formación de precipitado	Precipita	Precipita	No precipita	No precipita

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN

El Cuadro N°2, muestra la evaluación de la formulación de jabon líquido con extracto etanólico al 70 % de *Colletia spinosissima* al 3 % de concentración final, se eligio esta concentración teniendo en cuenta el CMI y presentar mayor halo de inhibición frente a cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Se elaboraron 4 formulaciones al 3% de concentración, evaluando características fisicoquímicas y organolépticas aceptándose la F4, por presentar características óptimas

como: pH 5.8, viscosidad 2680 cps, Densidad 1.045g/mL, siendo homogénea y no precipitar. Según Ruzica, J.T. et al 2017. mencionan el que pH de la piel oscila entre 5-6; un pH ácido entre 4 - 4.5 mantiene el sistema microbiológico residente adherido a la piel, un pH menos ácido promueve el crecimiento bacteriano especialmente bacterias gram negativas y *propionibacterium sp.* y un pH alcalino entre 8-9 promueve la dispersión de las bacterias de la piel. [84]

4.10.2 FORMULACIÓN Y ELABORACIÓN DE JABÓN LÍQUIDO ANTIBACTERIAL CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” AL 5 % DE CONCENTRACIÓN

CUADRO N° 3: CONTROL DE CALIDAD DE LAS 3 FORMULACIONES REALIZADAS PARA OBTENER EL JABÓN LÍQUIDO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* AL 5 % DE CONCENTRACIÓN FINAL

PRUEBAS	F1	F2	F3
Viscosidad(cps)	1564	2230	2550
Ph	5.6	6.8	5,7
Densidad(g/ml)	1.041	1.043	1.050
Color	Anaranjado claro	Anaranjado claro	Anaranjado claro límpido
Olor	Fuerte a Caléndula	Fuerte a Caléndula	Caléndula agradable
Formación de espuma	+++	+++	+++
Facilidad de incorporación de insumos	Buena	Buena	Buena
Homogeneidad	Homogénea	Homogénea	Homogénea
Formación de precipitado	Precipita	No precipita	No precipita

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN

El Cuadro N°3, muestra la evaluación de la formulación de jabón líquido con extracto etanólico al 70 % de *Caléndula officinalis* al 5 % de concentración final, se eligió esta

concentración teniendo en cuenta el CMI y presentar mayor halo de inhibición frente a cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Se elaboraron 3 formulaciones al 5% de concentración, evaluando características fisicoquímicas y organolépticas aceptándose la F3, por presentar características óptimas como: pH 5.7, viscosidad 2550 cps, Densidad 1.050g/mL, siendo homogénea y no precipitar. Según Ruzica, J.T. et al 2017. Mencionan el que pH de la piel oscila entre 5-6; un pH ácido entre 4 - 4.5 mantiene el sistema microbiano residente adherido a la piel, un pH menos ácido promueve el crecimiento bacteriano especialmente bacterias gram negativas y *propionibacterium sp.* y un pH alcalino entre 8-9 promueve la dispersión de las bacterias de la piel. (81)

4.10.3 ESTUDIO DE ESTABILIDAD PRELIMINAR DE LA FORMULACIÓN DE JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Colletia spinisissima* “ROQUE” AL 3% DE CONCENTRACIÓN
TABLA N°75: REPORTE DE LA ESTABILIDAD PRELIMINAR FISICOQUÍMICA DE LA FORMULACIÓN DE JABÓN LÍQUIDO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Colleta spinosissima*

TIEMPO (DIAS)	pH			VISCOSIDAD(cps)		
	40 °C	4°C	25°C	40 °C	4°C	25°C
0	6.5	6.5	6.5	2680	2680	2680
3	6.48	6.51	6.52	2565	2439	2587
7	6.5	6.55	6.62	2574	2410	2543
10	6.51	6.53	6.58	2430	2275	2675
15	6.52	6.53	6.5	2415	2270	2678

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

La Tabla N°75, nos muestra los resultados del análisis de estabilidad preliminar fisicoquímico durante un periodo de 15 días, que según el cuadro de especificaciones indicado a continuación, la formulación de jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” se encuentra estable en las condiciones de 40°, 4° y 25°C.

CUADRO N° 4: ESPECIFICACIONES FISICOQUÍMICAS DE ESTUDIO DE ESTABILIDAD PRELIMINAR DE PRODUCTOS COSMÉTICOS

ESPECIFICACIONES	
Límite inferior pH	5
Límite superior pH	7
Límite inferior viscosidad	1000 cps
Límite superior viscosidad	5000 cps

Fuente: Sanitaria ANDVS. Serie Calidad en Cosméticos. ANVISA. 2005 mayo; 1.(64)

TABLA 76: REPORTE DE LA ESTABILIDAD PRELIMINAR ORGANOLÉPTICA DE LA FORMULACIÓN DEL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” AL 3% DE CONCENTRACIÓN

TIEMPO (días)	4°C			40°C			20-25°C		
	Aspecto	Color	Olor	Aspecto	Color	Olor	Aspecto	Color	Olor
0	Líquido viscoso	Verde limón	Característico a Roque	Líquido viscoso	Verde limón	Característico a Roque	Líquido viscoso	Verde limón	Característico a Roque
3	Líquido viscoso	Verde limón	Característico a Roque	Líquido viscoso	Verde limón	Característico a Roque	Líquido viscoso	Verde limón	Característico a Roque
7	Líquido viscoso	Verde limón	Característico a Roque	Líquido viscoso	Verde limón	Característico a Roque	Líquido viscoso	Verde limón	Característico a Roque
10	Líquido viscoso	Verde limón	Característico a Roque	Líquido viscoso	Verde limón	Característico a Roque	Líquido viscoso	Verde limón	Característico a Roque
15	Líquido viscoso	Verde limón	Característico a Roque	Líquido viscoso	Verde limón	Característico a Roque	Líquido viscoso	Verde limón	Característico a Roque

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

En la Tabla N°76, se observan los resultados de la estabilidad organoléptica de la formulación de jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” durante 15 días, estos nos indican que el aspecto líquido viscoso, color verde limón y olor propio del Roque son estables a una temperatura de 4°C, 40°C y 20-25°C.

4.10.4 ESTUDIO DE ESTABILIDAD PRELIMINAR DE LA FORMULACIÓN DE JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” AL 5% DE CONCENTRACIÓN

TABLA N°77: REPORTE DE LA ESTABILIDAD PRELIMINAR FISICOQUÍMICA DE LA FORMULACIÓN DE JABÓN LÍQUIDO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula officinalis*

TIEMPO (DIAS)	Ph			VISCOSIDAD(cps)		
	40 °C	4°C	25°C	40 °C	4°C	25°C
0	6.3	6.3	6.3	2550	2550	2550
3	6.44	6.21	6.34	2532	2463	2555
7	6.52	6.33	6.38	2510	2415	2534
10	6.50	6.25	6.5	2436	2253	2532
15	6.4	6.42	6.35	2430	2250	2556

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

La Tabla N°77, nos muestra los resultados del análisis de estabilidad preliminar fisicoquímico durante un periodo de 15 días, que según el cuadro de especificaciones indicado a continuación, la formulación de jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula” se encuentra estable en las condiciones de 40°, 4° y 25°C.

CUADRO N° 5: ESPECIFICACIONES FISICOQUÍMICAS DE ESTUDIO DE ESTABILIDAD PRELIMINAR DE PRODUCTOS COSMÉTICOS.

Especificaciones	
Límite inferior Ph	5
Límite superior Ph	7
Límite inferior viscosidad	1000 cps
Límite superior viscosidad	5000 cps

Fuente: Sanitaria ANDES. Serie Calidad en Cosmeticos. ANVISA. 2005 mayo; 1. (64)

**TABLA N°78: REPORTE DE LA ESTABILIDAD PRELIMINAR
ORGANOLÉPTICA DE LA FORMULACIÓN DE JABÓN LÍQUIDO
ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE *Caléndula
officinalis* “CALÉNDULA” AL 5% DE CONCENTRACIÓN.**

TIEMPO (días)	4°C			40°C			20-25°C		
	Aspecto	Color	Olor	Aspecto	Color	Olor	Aspecto	Color	Olor
0	Líquido viscoso	Anaranjado claro	Característico a Caléndula	Líquido viscoso	Anaranjado claro	Característico a Caléndula	Líquido viscoso	Anaranjado claro	Característico a Caléndula
3	Líquido viscoso	Anaranjado claro	Característico a Caléndula	Líquido viscoso	Anaranjado claro	Característico a Caléndula	Líquido viscoso	Anaranjado claro	Característico a Caléndula
7	Líquido viscoso	Anaranjado claro	Característico a Caléndula	Líquido viscoso	Anaranjado claro	Característico a Caléndula	Líquido viscoso	Anaranjado claro	Característico a Caléndula
10	Líquido viscoso	Anaranjado claro	Característico a Caléndula	Líquido viscoso	Anaranjado claro	Característico a Caléndula	Líquido viscoso	Anaranjado claro	Característico a Caléndula
15	Líquido viscoso	Anaranjado claro	Característico a Caléndula	Líquido viscoso	Anaranjado claro	Característico a Caléndula	Líquido viscoso	Anaranjado claro	Característico a Caléndula

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

En la Tabla N°78, se observan los resultados de la estabilidad organoléptica de la formulación de jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de *Caléndula officinalis* “Caléndula” durante 15 días, estos nos indican que el aspecto líquido viscoso, color anaranjado claro y olor propio de la Caléndula son estables a una temperatura de 4°C, 40°C y 20- 25°C.

4.10.5 CONTROL DE CALIDAD MICROBIOLÓGICO DE LOS JABONES LÍQUIDOS ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICOS AL 70 %.
CUADRO N° 6: EXÁMEN MICROBIOLÓGICO REALIZADO AL JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70% DE *Colletia spinosissima* “ROQUE” Y *Caléndula officinalis* “CALÉNDULA” ANTES Y DESPUÉS DE LA PRUEBA DE ESTABILIDAD PRELIMINAR.

JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE <i>Colletia spinosissima</i> “ROQUE”				
TIPO DE PRUEBA	RESULTDO	RESULTADO FINAL		
	INICIAL	25°C	4°C	40°
Recuento de aerobios de mesófilos viables	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/ mL	< 10 UFC/ mL	< 10 UFC/ mL
Recuento de hongos y levaduras	< 10 UFC/ mL	< 10 UFC/ mL	< 10 UFC/ mL	< 10 UFC/ mL
Recuento de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Recuento de <i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
JABÓN LÍQUIDO ELABORADO CON EXTRACTO ETANÓLICO AL 70 % DE <i>Caléndula officinalis</i> “CALÉNDULA”				
TIPO DE PRUEBA	RESULTDO	RESULTADO FINAL		
	INICIAL	25°C	4°C	40°C
Recuento de aerobios de mesófilos viables	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL
Recuento de hongos y levaduras	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL	< 10 UFC/mL
Recuento de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Recuento de <i>Escherichia coli</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia

Fuente: Datos experimentales del estudio.

INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

El cuadro N°6, muestra los resultados del control de calidad microbiológico, realizado los jabones líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* y *Colletia spinosissima*, los cuales indican que se encuentra dentro de los límites establecidos por la Comisión de la Comunidad Andina (Cuadro N°7). (82) Estos resultados evidencian la correcta elaboración del producto y asegura la calidad del mismo. Según la Guía ANVISA, 2008 la evaluación microbiológica permite verificar si la elección del sistema conservante es adecuada, o si la incidencia de interacciones entre los componentes de la formulación podrá afectar la eficacia. (64)

Según los resultados obtenidos en el control microbiológico de jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* se aprecia la ausencia de microorganismos, esto posiblemente a la presencia de saponinas triterpénicas teniendo sinergismo con flavonoides y compuestos fenólicos, habiendo estudios que le confieren esta actividad antibacteriana a estos metabolitos secundarios, además siendo las saponinas responsables de la propiedad detergente a la formulación.

En cuanto al jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* se aprecia la ausencia de microorganismos, siendo los posibles responsables los compuestos fenólicos y flavonoides encontrados en mayor cantidad, habiendo estudios que confirma este sinergismo.

CUADRO N° 7: ESPECIFICACIONES DE CONTROL MICROBIOLÓGICO

Especificaciones	
Evaluación microbiológica	Límites
Recuento de aerobios de mesófilos viables	Máximo 1000 UFC/g
Recuento de hongos y levaduras	Máximo 100 UFC/g
Recuento de <i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausentes
Recuento de <i>Staphylococcus aureus</i>	Ausentes
Recuento de <i>Escherichia coli</i>	Ausentes

Fuente: Adaptado de la Comunidad Andina. (82)

CONCLUSIONES

1. Se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” y de su formulación de jabón líquido antibacterial a partir de los extractos etanólicos frente *Staphylococcus aureus* cepa ATCC 25923 y *Escherichia coli* cepa ATCC 35218.
2. Se obtuvieron los extractos etanólico al 70% de los tallos de *Colletia spinosissima* “Roque” y las flores de *Caléndula officinalis* “Caléndula”, los cuales tuvieron un porcentaje de rendimiento de 14.62 % y 14.53 % respectivamente.
En la prueba de solubilidad los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” son totalmente miscibles en solventes polares y parcialmente miscibles en solventes de mediana polaridad e insolubles en solventes apolares.
En el análisis fitoquímico cualitativo se determinó que el extracto etanólico al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” presenta abundante cantidad de flavonoides, compuestos fenólicos, saponinas esteroidales y quinonas. El extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula” presenta abundante cantidad de flavonoides, compuestos fenólicos y quinonas.
3. Se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218, obteniéndose un halo máximo de inhibición de 25.24 mm a una concentración de 100mg/50uL, frente a los fármacos patrón ciprofloxacino y amikacina que fueron 35.82 mm y 29.98 mm respectivamente.
Se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico al 70 % de *Caléndula officinalis* “Caléndula” frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218, obteniéndose un halo máximo de inhibición de 16.24 mm a una concentración de 100mg/50uL, frente a los fármacos patrón ciprofloxacino y amikacina que fueron 35.66 mm y 30.11 mm respectivamente.
4. Se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, obteniéndose un halo máximo de inhibición de 18.61mm, a una

concentración de 100mg/50uL, frente a los fármacos patrón ciprofloxacino y clindamicina que fueron 37.95 mm y 22.71 mm, respectivamente.

Se determinó la actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico al 70 % de *Caléndula officinalis* “Caléndula” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, obteniéndose un halo máximo de inhibición de 23.15 mm, a una concentración de 100 mg/50uL, frente a los fármacos patrón ciprofloxacino y clindamicina que fueron 36.95 mm y 22.67 mm, respectivamente.

5. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” frente a cepas *Escherichia coli* ATCC 35218 los cuales fueron 6.25 mg/mL y 25.00 mg/mL, respectivamente.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” frente a cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 los cuales fueron 12.50 mg/mL y 25.00mg/mL, respectivamente.

6. Se determinó la concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Calendula officinalis* “Caléndula” frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 35218 los cuales fueron 50.00 mg/mL y 100 mg/mL, respectivamente.

Se determinó la concentración mínima bactericida (CMB) de los extractos etanólicos al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 los cuales fueron 50.00 mg/mL y 100 mg/mL, respectivamente.

7. Se elaboró diferentes formulaciones, observándose características fisicoquímicas: viscosidad, densidad, pH, formación de espuma, facilidad de incorporación de insumos, formación de precipitado y homogeneidad y organolépticas: color, olor. De acuerdo a éstas pruebas se determinó que la F4 al 3 % de concentración de extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” y la F3 al 5 % de concentración de extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula” cumplen con las características mínimas requeridas.

8. Se determinó la actividad antibacteriana del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” por el método de pozos escavados frente a cepas *Escherichia coli* ATCC 35218 el cual presenta sensibilidad con halos de inhibición de 31.89 mm

y 31.58 mm en promedio, respectivamente, frente al jabón líquido patrón con un halo de inhibición de 35.97 mm en promedio.

Se determinó la actividad antibacteriana del jabón líquido elaborado con extracto etanólico al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” por el método de pozos excavados frente a cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 el cual presenta sensibilidad con halos de inhibición de 23.65 mm y 22.5 mm en promedio, respectivamente, frente al jabón líquido patrón con un halo de inhibición de 27.69 mm en promedio.

9. Mediante el control de calidad se estableció que el jabón líquido cumple con las especificaciones planteadas.
10. En la prueba de estabilidad preliminar, no presentaron ningún tipo de alteración en sus características organolépticas, fisicoquímicas y microbiológicas. Determinándose que los jabones líquidos elaborados al 3 % de concentración con extracto etanólico al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y al 5% de concentración con extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula” son productos estables.

SUGERENCIAS

A las autoridades universitarias:

- Continuar con la implementación de los laboratorios universitarios así como también destinar recursos de infraestructura e incentivos económicos necesarios para la sostenibilidad de estos laboratorios.

A los docentes:

- Fomentar el estudio y la investigación de las plantas medicinales en nuestra región sobre las propiedades terapéuticas poco estudiadas.
- Incentivar a la publicación científica de trabajos de investigación en revistas científicas web. De trabajos de tesis realizados por los alumnos de la carrera profesional de Farmacia y Bioquímica.

A los investigadores:

- Continuar con el estudio de la actividad antibacteriana de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” frente a otras cepas bacterianas estándares, usando modelos experimentales.
- Realizar el estudio sobre propiedades farmacológicas (antimicótico y antidiarreico) de *Colletia spinosissima* “Roque” y (diaforetica, antimicótico diurético y antihelmítico) *Caléndula officinalis* “Caléndula” usando modelos experimentales desarrollados y validados.
- Desarrollar un estudio de cuantificación de los metabolitos secundarios que presenta *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” en nuestra Región.
- Plantear y formular nuevos productos cosméticos que contengan poca cantidad de insumos sintéticos, aprovechando la megadiversidad de flora de nuestra Región.
- Realizar estudios de toxicidad de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula”, con el fin de comprobar su inocuidad a largo plazo.
- Continuar con el estudio de actividad antibacteriana de jabón líquido elaborado a base de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” aplicado en un estudio experimental *in vivo*, y posterior comercialización en el mercado por posentar ventajas frente a otros jabones comerciales.
- Plantear otras formas farmacéuticas a base de extracto etanólico de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula”
- Realizar el estudio de efecto antibacteriano de extracto etanólico de *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula” con cepas aisladas.
- No realizar formulaciones de jabón líquido a base de extracto etanólico de *Colletia spinosissima* “Roque” superiores al 13 % de concentración por presentar sobresaturación.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto de Ecología y plantas Ieplam. Manejo racional de plantas medicinales del Perú. 1994.
2. Li Pereyra Elena. Estado de arte del sector de plantas medicinales en Perú. Informe realizado como parte de la consultoría prestada para realizar un estudio sobre el estado situacional del sector de plantas medicinales en Perú dentro del proyecto. "el futuro de las plantas medicinales del altiplano y los valles centrales de los andes" Perú 2006
3. Fretes. F. USAID. Plantas medicinales y aromáticas una alternativa de producción comercial. Mayo 2010. Disponible en:
https://www.usaid.gov/sites/default/files/documents/1862/plantas_medicinales.pdf
4. Soria, R. Estudio Farmacobotánico de *Oenothera multicaulis* R&P. Tesis de Maestría en Recursos Vegetales y Terapéuticos - Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú 1988
5. Rado JBE. Etnobotánica del Distrito de Ocongate-Quispicanchi-Cusco. [Tesis]. Cusco. Universidad Nacional De San Antonio Abad del Cusco, Ciencias Biológicas; 2011
6. Rodríguez GAC. "Implementación de una Intervención Educativa sobre el adecuado lavado de manos como una estrategia para la prevención de enfermedades infecciosas (IRA y EDA) en escolares de primaria de San Andrés Tianguistengo, Actopan, Hidalgo. Cuernavaca: Instituto Nacional de Salud Pública, Salud pública ; 2016. Report No.: ISN
7. Sisema MMM. "Proyecto sobre la Iniciativa de lavado de manos como estrategia para la disminución de Enfermedades Diarreicas agudas y las infecciones respiratorias en la Escuela de Educación Básica Fiscal Boyacá de la Parroquia de San Gerardo Cantón Guano. Provincia Chimborazo. Riobamba: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Salud Pública; 2013. Report No.: INS
8. Andina C. Grupo de Expertos Gubernamentales para la Armonización de Legislaciones Sanitarias. Informe de Reunión. Lima: Comunidad Andina, Secretaría General; Colombia .2018
9. Dirección General de Medicamentos IyD. [Internet]. Digemid verifica retiro de jabones que superan límites permitidos de triclosán y triclocarbán. Noticia. Lima: Ministerio de Salud; [Citado el 12 de Octubre del 2018].
10. Centro Tecnológico Aina. Tendencias en productos de cosmética [Internet]. [Citado Julio 2017]
11. Herrera MSB. Efecto protector del champú conteniendo extracto etanólico de corteza y brotes tiernos de *Colletia spinosissima* J. Gmelin (Tacsana) sobre la irritación inducida en pieles de ratas. [Tesis]. Lima. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica 2017.
12. Interiano RCI, Servellón PIY. Obtención de un colorante natural a partir de las hojas de *Pteridium aquilinum* (helecho común) para su aplicación en. [Tesis]. El Salvador. Universidad de El Salvador. Química y Farmacia; 2008

13. Leal M. Eficacia antibacteriana de extractos de plantas: aplicación clínica en mastitis bovina. Artículo científico, 17(1): 179-187, Bogotá, Colombia, enero-junio, 2014
14. Ayala ADC. Efecto antibacteriano del aceite esencial de margarita (*Clendula officinalis*) y jengibre (*Zingiber officinale*) vs. clorhexidina al 2% sobre cepas de porphyromona gingivalis: estudio in vitro. [Tesis]. Facultad de Odontología. Universidad Central del Ecuador, Quito, Octubre 2016
15. Delgadillo SJ, García JA. Estudio comparativo de los extractos de la *Caléndula officinalis* y el *Cymbopogon citratus* en la actividad antibiótica del *Staphylococcus aureus*. [Tesis]. 2001
16. Velazco, G., W., J. Evaluación del potencial antimicrobiano de extractos de plantas frente a microorganismos asociados a conjuntivitis bacterianas. [Tesis] Universidad de la Salle. Departamento de Ciencias Básicas. Bogotá, 2018
17. Granados D. Evaluación in vitro del efecto antimicrobiano del extracto etanólico de Caléndula (*calendula officinalis*) sobre las principales cepas de bacterias causantes de otitis canina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. [Tesis]. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, marzo de 2015
18. Madrid AMA, Mahecha DLC. Efecto de la *Calendula officinalis* en la proliferación del fibroblasto gingival humano. [Tesis]. Bogota: Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Odontología; 2010 julio-diciembre
19. Figueroa MDP, Díaz GL. Obtencion de saponinas del cormo de Gladiolo (*Gladiolus communis* Linnaeus) mediante extracción por solventes orgánicos. [Tesis]. Lima : Universidad Nacional del Callao , Facultad de Ingeniería Química; 2016.
20. Achahuanco C. Miriam, Aragón P. Patricia. Actividad Antibacteriana in vivo de los extractos Etanólicos y glicólicos de las hojas de la especie vegetal flouencia polycephala M.O. Dillon (Pauca) sobre cepas ATCC de staphylococcus aureus y Propionibacterium acnés, y su relación con la Actividad antioxidante. Cusco-Perú 2015
21. Rosell Cáceres G. Determinación del contenido total de polifenolesflavoniodes y actividad antioxidante y antibacteriana in vitro del extracto etanólico al 70% de *Thymus vulgaris* L. "Tomillo" frente a *Staphylococcus aureus* Cepa ATCC 25923. Universidad Nacional San Antonio Abab del Cusco, Perú 2014
22. Huaman E, Yeny Oroche S, Yaneth. Determinación de la actividad antibacteriana in vitro de los extractos etanólicos y clorofórmicos de *Oenothera rosea* "yawar chonq'a" y *Geranium sessiliflorum* "Ojotillo" frente a *Staphylococcus aureus* cepa atcc y *Escherichia coli* cepa atcc y determinación de la toxicidad aguda por vía oral" Universidad Nacional San Antonio Abab del Cusco, Perú 2016
23. MCNS H. Flora del Valle de Lerma. [Internet] Aportes Botánicos de Salta. 2012 Junio; 1(13).
Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/55304417.pdf>.
24. Agudelo LCY. Aprovechamiento Agroindustrial de la caléndula (*Calendula officinalis*) mediante la producción de un gel desinflamatorio a partir de celulosa. [Tesis]. Santiago: Universidad De San Buenaventura , Facultad de ingeniería; 2011
25. Ministerio de Salud del Perú. [Internet] Manual de Procedimientos para la Prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el Método de Disco Difusión. INS, Lima 2017.

- Disponible en:
<http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>.
26. Ramirez V Ajvhddk. Plantas medicinales que se comercializan en Colombia. Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas. 2014; 16(6).
 27. Pazmiño PJS. Analisis de los metodos de extraccion de la flor de calendula(*Calendula officinalis*) para productos agroindustriales. Tesis de maestria. , Facultad de Ingenieria y Ciencias aplicadas; 2018. Report No.: ISSN.
 28. Dominguez M. Efecto de la aplicacion del extracto hidroalcoholico de flores de calendula (*Callendula officinalis*) en la estabilizacion del color y vida util en pulpa de frutas. Tesis de maestria. Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Ciencia y Tecnologia de alimentos; 2012.
 29. Ryan KJ, Ray G. Microbiología médica. quinta ed. Kenneth R, editor. Mexico: John C. Sherris, md, frcpath; 2010.
 30. Revisión de los mecanismos de patogenicidad y la fisiopatología de la infección estafilocócica "staphylococcus aureus". 2002; 22(2).
 31. Erazo, M. Producción de jabones y detergentes. 1999
 32. Jwetz, Melnick & Adelbertg. Microbiología médica 27ed. Mexico. 2016.
 33. Goodman & Gimal A. Las bases farmacológicas de la terapéutica, 11ava ed. Mexico: Medica Panamericana; 2010
 34. Rang HP, Flower RJ. Farmacología. octava ed. Dale Ry, editor. España; 2016
 35. Pedrique de Aulacio M. Reproduccion y Crecimiento microbiano. Proyecto de Investigacion, Facultad de Farmacia y Bioquimica; 2008
 36. Picazo JJ. [internet] Metodos Basicos para el estudio de Sensibilidad a los Antimicrobianos. In Picazo J,J, editor..; 2010. p. 54.
Disponible en:
<http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>.
 37. Arevalo PA, Bravo SCY. Estudio Comparativo de Agentes humectantes en una formulacion de jabon liquido. [Tesis]. Cuenca: Universidad Politecnica Salesiana, Facultad de Farmacia y Bioquimica; 2018.
 38. Cajigas de Acosta BE. Manual de Cosmeticos. Manual. Bogota: Ministerio de Salud y Proteccion Social, Minsalud; 2015.
 39. Molano C, Revilla R. Formulacion de Crema Humectante Artesanal a base de Extracto de Sabila. [Tesis]. Maracaibo: Universidad Rafael Urdaneta, Facultad de Ingenieria; 2017
 40. Guerrero GCE. Diseño de una planta de Fabricacion de Jabon a partir de Aceites Vegetales usados. [Tesis]. Almeria: Universidad de Almeria, Facultad de Ciencias Experimentales y Escuela Politecnica Superior; 2014.
 41. Abut & Leda. el libro de jabones. Buenos aires: Albatros, 1ª ed. 2014.

42. Vanegas, A. Jabones y Detergentes. Definiciones Generales. En A. Vanegas, (Norma Técnica Colombiana).2014
43. George, R. Liquid Toilet Soaps in the United Kingdom. Happi.1993
44. Macachor,A. & Rivas,R.Influence of calamansi and virgin coconut oli as active reagents on tha acceptability of liquid hand wash.Academia Journal of Biotechnology.2016.
45. Mardones, M.&Juanto,S.Laboratorio:Medida de viscosidad.2017
46. Shinde,P.Tatiya,A.& Surana,S.Formulation development and evaluation of herval antidandruff shampoo.International Journal of Research in Cosmetic Science.2015.
47. Dixit,A. Pandey,P. & Mahajan,R. Alcohol based hand sanitizers: Assurance and apprehensions revisited.Research Journal of Pharmaceutical,Biological and Chemical Sciences.2015
48. Meza,K.&Vargas,G.evaluacion de la actividad antibacteriana in vitro del aceite esencial de Hierba luisa.Obtenida de Universidad Policnica Salesiana.2017
49. Menendez,A. Parra, V. Dominguez,C. Martinez,O. Actividad cicatrizante y ensayos de irritacion de la crema de Calendula officinalis al 1 %. Latin American Jornal of Pharmacy.2016
50. Guia de estabilidad de productos cosmeticos.Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria,Brasilia-Brasil,ANVISA, 2004
51. Gomez Anton. M. Síntesis de detergentes. En “Detergentes”. Universidad Nacional a Distancia. Madrid, España; 1996
52. Fontan CJ. [Internet] Las saponinas y la Botanica. Informe de Investigacion. Madrid: Instituto Español de Fisiologia y Bioquimica; 2014.
 Disponible en:
[http://www.rjb.csic.es/jardinbotanico/ficheros/documentos/pdf/anales/1958/Anales_15\(1\)_501_521.pdf](http://www.rjb.csic.es/jardinbotanico/ficheros/documentos/pdf/anales/1958/Anales_15(1)_501_521.pdf)
53. Flores T, Huaman HGT. Estudio Comparativo de Tres Metodologias Cuantitativas de Extraccion de Saponinas de la Melisa officinalis “Toronjil”. UNMS. 2013; 16(2).
54. Castañeda C, Manrique M, Ibañez V,L. Estudio Fitoquimico y Farmacologico de Plantas con Efecto Hipoglucemiante. [Tesis]. Lima. Instituto de Investigacion de San Martin de Porres, Facultad de Medicina Humana; 2010.
55. Hernández GAC, Hermosilla CVJ. Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala. [Tesis]. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala , Departamento de Ciencias Quimicas y Farmacia; 2014.
56. Bruneton J. Farmacognosia. Segunda ed. Paris: ACRIBIA S.A; 1993.
57. Lock OU.Métodos en el Estudio de Productos Naturales. tercera ed.:Investigacion fitoquimica; 2017.

58. Amaguaña Rojas j, Churuchumbi Rojas ef. Estandarización fitoquímica del extracto de *Caléndula officinalis* "Calendula"[tesis] . Quito Universidad Politécnica Salesiana sede Quito, Facultad de ingeniería en biotecnología de los recursos naturales; 2018.
59. Agroecosystems TaS. Use of plant secondary metabolites to reduce ruminal methanogenesis. Redalyc.com. 2014 noviembre; 17(3): p. 171.
60. Capasso, F. & Grandolini, G. Fitoterapia. segunda ed.; 1996
61. DIGESA. norma sanitaria sobre criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos bebidas de consumo humano. cusco; 1999.
62. Agurto ST. Manual de técnicas en microbiología. Investigación científica. 1989; 3(12).
63. Torres RML. Control microbiológico de materias primas y productos farmacéuticos no esteriles. 2009 setiembre.
64. Sanitaria Andv. Serie Calidad en Cosméticos. ANVISA. 2005 mayo; 1.
65. Lic. Mena VL, Dra. Tamargo SB, MSc. Salas O, Dr. Plaza PLE, MSc.. Determinación de saponinas y otros metabolitos secundarios en extractos acuosos de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo). Scielo. 2015 enero-marzo; 20(1)
66. Deacon JW. Antibiograma de discos. 1993.
67. Roopashree TS, Dang R, Shobha RRH, Narendra C. Antibacterial activity of antipsoriatic herbs: *Cassia tora*, *Momordica charantia* and *Calendula officinalis*. Int J Appl Res Nat Prod. PMC. 2017; 1(3).
68. Sarmiento Poi. Evaluación de la cinética de extracción del aceite esencial de *Calendula officinalis* l. mediante hidroddestilación y calentamiento óhmico asistido por hidroddestilación.. tesis. colombia: Escuela de Ciencias Básicas Tecnología e Ingeniería; 2016.
69. Lastra VH, Piquet GR. *Calendula officinalis*. Scielo. 2016 setiembre-diciembre; 33(3).
70. Clark DP, Martinko JM, Madigan MT, Dunlap PV. Brock. Biología de los microorganismos 12ed. 12th ed. Brock , editor.: Pearson; 2014
71. Contino Y, Aguero F. Estudio de la eficacia del cikron v, fitofarmaco obtenido de la corteza del mangle rojo. La habana-cuba. cuba.; 2009
72. Ramírez CA, Isaza MG, Pérez J. Estudio fitoquímico preliminar y evaluación de la actividad antibacteriana del *Solanum Dolichosepalum* Bitter (Frutillo). Revista Cubana de Plantas Medicinales. 2017; 22(1).
73. Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. Int. J. Antimicrob Agents. Pubmed. 2015; 26(5).
74. Soto VMR, Soto VK. Metabolitos secundarios y efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroetanólico de las flores de *Cantua buxifolia* Juss. ex Lam. (Polemoniaceae) "Flor Sagrada de los Incas". Arnaldoa. 2014 enero-junio; 21(1).
75. Díaz LN. Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Revista de Estudios Transdisciplinarios. 2016; 1(2).

76. E E, Roopashree TS. Antimicrobial activity of *Calendula officinalis* petal extracts against fungi, as well as Gram-negative and Gram-positive clinical pathogens. *Complement Ther Clin Pract*. 2012. Scielo. 2012 Enero-Marzo; 18(3): p. 6.
77. Farjana A M,N, S. K. Antimicrobial activity of medicinal plant leaf extracts against pathogenic bacteria. *Asian Pacific J Trop Dis*. 2014; 4(14).
78. N. Meziou- Chebouti Amnbfzbanma. Antimicrobial Activity of Phenolic Extracts of Flowers *Calendula Officinalis* Cultivated in Algeria. 14th SGEM GeoConference Water Resour For Mar Ocean Ecosyst B 3. ; 2014. Report No.: ISBN
79. Vora J Samh. Antibacterial and antioxidant strategies for acne. 2017 October;; p. 1-5.
80. Tolosa E, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. ; 2016. Report No.: ISSN
81. Ruzica J.T. Sanja,K.Suzana,L.H. Branka,M. Skin Barrier and Dry Skin in the Mature Patient.2017.
82. Andina C. Adiciones a la resolución 797 – límites de contenido microbiológico de productos cosméticos. 2011 junio.

ANEXOS

ANEXO N° 1: DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE HUMEDAD.

<i>Colletia spinosissima</i> “Roque”					
N°	DE DETERMINACIONES	PESO DE LA MUESTRA FRESCA	PESO DE LA MUESTRA SECA	%DE HUMEDAD	PROMEDIO DEL %DE HUMEDAD
1					
2					
3					

Fuente: Bruneton, J. Farmacognosia general. Plantas medicinales, Paris 1993.

<i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula”					
N°	DE DETERMINACIONES	PESO DE LA MUESTRA FRESCA	PESO DE LA MUESTRA SECA	%DE HUMEDAD	PROMEDIO DEL %DE HUMEDAD
1					
2					
3					

Fuente: Bruneton, J. Farmacognosia general. Plantas medicinales, Paris 1993.

ANEXO N° 2: PORCENTAJE DE EXTRACCIÓN.

	PESO DE LA MUESTRA FRESCA	PESO DE LA MUESTRA SECA	% DE EXTRACCIÓN	PROMEDIO DEL % DE EXTRACCIÓN
<i>Colletia spinosissima</i> “Roque”				
<i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula”				

Fuente: Bruneton, J. Farmacognosia general. Plantas medicinales, Paris 1993.

ANEXO N° 3: PRUEBAS DE SOLUBILIDAD.

SOLVENTE	<i>Colletia spinosissima</i> “Roque”	<i>Caléndula officinalis</i> “Caléndula”
Agua destilada		
Solución salina		
Metanol		
Etanol 40%		
Etanol 70%		
Etanol 96%		
Acetona		
Acetato de etilo		
Cloroformo		
Hexano		
Éter de petróleo		

LEYENDA:

- Muy soluble: + + +
- Soluble: + +
- Poco soluble: +
- Insoluble: -

Fuente: Bruneton, J. Farmacognosia general. Plantas medicinales, Paris 1993.

ANEXO N° 4: PRUEBAS DE ANALISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Colletia spinosissima* “Roque” y *Caléndula officinalis* “Caléndula”.

1) Compuestos Fenólicos

A 0.5 ml de extracto agregar de 1, 2 gotas de cloruro férrico al 1% la presencia de precipitado o coloración de azules o verdosa indican prueba positiva para compuestos fenólicos

2) Alcaloides

Reacción de dragendorff: a 0.4 ml de solución acida agregar 2 o 3 gotas del reactivo de dragendorff, la formación de un precipitado naranja o marrón indica la presencia de alcaloides.

3) Lactonas:

Prueba de hidroxamato férrico: a 0.5 ml de la solución clorofórmica con 0.5 mg de muestra sólida agregar 0.5 ml de clorhidrato de hidroxalamina 0.5 N en etanol más 0.1 ml de KOH 2N, enfriar y acidular con 3 gotas de HCL 0.5 N luego se adiciona 3 gotas de cloruro férrico al 1 %, si se observa una coloración violácea es reacción positiva.

4) Quinona:

Reacción de bortrager: a 0.5 ml del extracto agregar 5 ml de KOH al 5 %, filtrar si es necesario, enfriar y acidular, luego extraer con benceno, a la fase del benceno separada agregar 0.5 ml de hidróxido de amonio. La coloración rojo en la fase de amoniaco indica presencia de naftoquinona y antraquinonas.

5) Flavonoides:

Reacción de shinoda: a 9.5 ml del extracto agregar unas limaduras de magnesio de 2 a 3 gotas de HCl concentrado, coloración rojiza o amarillentas indican prueba positiva.

6) Taninos:

0.5 ml de extracto agregar de 3 a 5 gotas de la solución de gelatina-Na Cl al 1%, la formación de un precipitado indica reacción positiva.

7) Saponinas

Prueba de la espuma: A un tubo de ensayo que contenga 2 ml de extracto, diluir 5 veces su volumen en agua y agitar vigorosamente por 30 segundos, la formación de espuma persistente por 30 minutos indica prueba positiva.

8) Glucósidos

A 200 mg de extracto se le agrega 2 ml de HCl a 1 % reflujar por minutos, enfriar y neutralizar con NaOH 1 1 % la formación de un precipitado rojo indica prueba positiva.

Fuente: O. LOCK DE FUGAZ, investigación fitoquímica, métodos en el estudio de productos naturales 2da edición, Pontificia Universidad Católica del Perú, Lima-Perú, fondo editorial, 1994

ANÁLISIS FITOQUÍMICO CUALITATIVO

TIPO DE PRUEBA	<i>Colletia spinosissima</i> "Roque"	<i>Caléndula officinalis</i> "Caléndula"
	Extracto etanólico	Extracto etanólico
Alcaloides		
Rvo Wagner		
Rvo Gragendorf		
Lactonas		
Quinonas		
Compuestos Fenólicos		
Flavonoides		
Taninos		
Saponoides		
Glucósidos		
Núcleos Esteroides		

- LEYENDA:
- Abundante cantidad +++
- Regular cantidad ++
- Poca cantidad +
- Ausencia -

Fuente: Bruneton, J. Farmacognosia general. Plantas medicinales, Paris 1993.

ANEXO N° 5: CRITERIOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA ATENDIENDO AL HALO DE INHIBICIÓN.

Para definir el tipo de actividad antimicrobiana, se utilizaron los criterios expuestos por Toda y col.

Actividad	Halo de Inhibición (mm)
Marcada	≥ 16
Moderada	$16 < \text{halo} < 12$
Ligera	$12 < \text{halo} < 8$
No actividad	< 8

Donde:

- Halo de inhibición ≥ 16 : significa una actividad antimicrobiana marcada.
- Halo de inhibición $16 < \text{halo} < 12$: significa una actividad antimicrobiana marcada.
- Halo de inhibición $12 < \text{halo} < 8$: significa una actividad antimicrobiana ligera.
- Halo de inhibición < 8 : significa ausencia de actividad antimicrobiana.

Fuente: Toda M, Kubo Y. Antibacterial and bactericide activity of tea extracts and catechins against methicillin resistant *Saphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 1994.

**ANEXO N° 6: FICHA DE MEDICIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN DE LAS
CEPAS BACTERIANAS.**

Lugar.....
.....

Temperatura
ambiente.....
.....

Temperatura de incubadora.....Fecha...../...../.....

Hora.....Cepa ATCC.....

N°	CONCENTRACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO	DIAMETRO DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN (mm) CEPA ATCC			
		I	II	III	PROMEDIO
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

Observaciones:

.....
.....
.....

Responsable:

.....

Fuente: Elaborado en base a Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana.INS.2017.

ANEXO N° 7: FICHA DE RECOLECCIÓN Y SECADO DE LAS ESPECIES VEGETALES.

FECHA	
NOMBRE DE LA PLANTA	
LUGAR DE RECOLECCIÓN	
NOMBRE DE RECOLECTOR (A)	
NOMBRE DE INFORMANTE	

RECOLECCIÓN

	DESCRIPCIÓN	OBSERVACIONES
CARACTERÍSTICAS DE LA PLANTA		
PARTE DE LA PLANTA A RECOLECTAR		
CANTIDAD A RECOLECTAR		

SECADO

	DESCRIPCIÓN	OBSERVACIONES
FECHA DE INICIO DE SECADO		
LUGAR DE SECADO		

Fuente: Elaborado en base a Generalidades de farmacobotánica 1989.

ANEXO Nº 8: ANÁLISIS ORGANOLÉPTICO

DEFECTO	CATEGORIA DEL DEFECTO			
	Crítico	Mayor	Menor	Sin defecto
Sedimento o precipitado				
No homogeneidad				
Color característico				
Turbidez en la solución				
Olor extraño o desagradable				
Fluidez inadecuada en el envase				
Envase con contenido disminuido				

Leyenda:

Crítico: son la causa de que el producto no sea útil para cumplir sus funciones. Puede producir situaciones arriesgadas o inseguras para los individuos que utilicen el producto.

Mayor: Reduce de forma notoria la utilidad del producto, para cumplir sus funciones.

Menor: No reduce sensiblemente la utilidad del producto y no tiene un efecto apreciable sobre la funcionalidad del producto.

*Se tomó como referencia la Norma UNE 66-020-73

Vila J. Tecnología Farmacéutica. Vol. II. Síntesis., editor. Madrid, España.; 2001

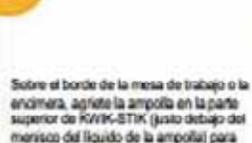
ANEXO N° 9: INSTRUCCIONES PARA LA ACTIVACIÓN DE LAS CEPAS ATCC ±
KWIK_STIK

KWIKSTIK™

INSTRUCCIONES CON ILUSTRACIONES

- 

Deje que la bolsa de KWIK-STIK sin abrir se adapte a la temperatura ambiente. Abra la bolsa rasgando a la altura de la muesca y quite la unidad de KWIK-STIK.
- 

Retire la porción de la etiqueta de tirar y rasgar y colóquese a la placa de cultivo principal o al registro de CC. No desarme el dispositivo durante la hidratación.
- 

Sobre el borde de la mesa de trabajo o la encimera, agnate la ampolla en la parte superior de KWIK-STIK (justo debajo del menisco del líquido de la ampolla) para liberar el líquido hidratante.
- 

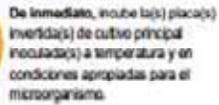
Manténgalo vertical y golpee suavemente sobre una superficie dura para facilitar el flujo del líquido por el mango hasta la parte interior de la unidad que contiene el gránulo.
- 

Apretela la parte interior de la unidad para que el gránulo se disuelva en el líquido hasta lograr una suspensión homogénea.
- 

De inmediato, sature el hisopo abundantemente con el material hidratado y transféralo al medio con agar correspondiente o utilícelo según el procedimiento operativo estándar del laboratorio.
- 

Inocule la placa de cultivo principal girando con suavidad el hisopo sobre un tercio de la placa.
- 

Por medio de un asa esterilizada, haga estrias para facilitar el aislamiento de la colonia.
- 

Descarte el KWIK-STIK de forma apropiada para desechos de riesgo biológico.
- 

De inmediato, incube la(s) placa(s) invertida(s) de cultivo principal inoculada(s) a temperatura y en condiciones apropiadas para el microorganismo.

Para ver el método de cultivo regrese a la página del producto en www.microbiologics.com.

Fuente: https://www.microbiologics.com/core/media/media.nl?id=530&c=915960&h=fe0261b9ecb4cb8f6a9c&_xt=.pdf

ANEXO N° 10: IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LAS ESPECIES VEGETALES EN ESTUDIO

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

- | | | |
|---|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • APARTADO POSTAL
N°921 - Cusco - Perú • FAX: 238156 - 238173 - 222512 • RECTORADO
Calle Tigré N° 127
Teléfonos: 222271 - 224891 - 224181 | <ul style="list-style-type: none"> • CIUDAD UNIVERSITARIA
Av. de la Cultura N° 733
Teléfonos: 228661 - 222512 - 232370 - 232375 - 232226 • LOCAL CENTRAL
Plaza de Armas s/n
Teléfonos: 227571 - 225721 - 224015 | <ul style="list-style-type: none"> • MUSEO E INSTITUTO DE ARQUEOLOGÍA
Cuesta del Almirante N° 103 - Teléfono 237380 • CENTRO AGRONÓMICO K'AYRA
San Jerónimo s/n Cusco - Teléfonos: 271409 - 271453 • COLEGIO "FORTUNATO L. HERRERA"
Av. de la Cultura N° 721
"Estadio Universitario" - Teléfono: 227192 |
|---|---|--|

HERBARIO VARGAS (CUZ)

CERTIFICADO DE DETERMINACION TAXONÓMICA N° 017-2019-HVC-FCB-UNSAAC

La directora del Herbario Vargas (CUZ)-Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC), deja constancia que: las señoritas **Fiordaliz Medina Cardoso** con código de matrícula N° 113605 y **Nayshia Santillam Palomino** con código de matrícula N° 122362 Bachilleres de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, han presentado a la Dirección del Herbario Vargas CUZ dos muestras vegetales herborizadas para su determinación taxonómica (expediente N°002781), para el proyecto de tesis intitulado "Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos de "Roque" (*Colletia spinosissima*) y "Calendula" (*Calendula officinalis*) frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y formulación de un jabón líquido antibacterial". La que al ser diagnosticada por el M. Sc. Isau Huamtupa Chuquimaco, utilizando claves dicotómicas, consulta con bibliografía especializada, y comparación con muestras del Herbario, concuerdan con la clasificación del grupo del Sistema Filogenético de las Angiospermas (Angiosperm Phylogeny Group-APG IV, 2016).

N°	FAMILIA	ESPECIES
1	Rhamnaceae	<i>Colletia spinosissima</i> J.F. Gmel
2	Asteraceae	<i>Calendula officinalis</i> L.

Se le expide la presente certificación a petición formal de las interesadas para los fines que vieran por conveniente.

Cusco, 26 de Julio del 2019


 Blga. María Luisa Ochoa Cámara
 Directora del Herbario Vargas (CUZ)



ÍNDICE FOTOGRÁFICO



Foto N°1: Se observa la recolección de los tallos de *Colletia spinosissima* “Roque” en el Distrito de Ocongate, en la localidad de Ccolcca, a una altitud de 3942 msnm, provincia de Quispicanchis, ubicada al sur de este departamento Cusco en los meses de Enero y Febrero.



Foto N° 2: Se observa la recolección de las flores de *Calendula officinalis* “Caléndula” en el Distrito de Ocongate, en la localidad de Ccolcca a una altitud de 3788 msnm provincia de Quispicanchis, ubicada al sur de este departamento Cusco en los meses de enero y febrero.



Foto N°3: Una vez obtenidas la muestra vegetal se procedió a la selección, limpieza y secado de los mejores ejemplares de los tallos de la especie vegetal *Colletia spinosissima* “Roque” por un periodo de 15 días en un lugar limpio, con sombra y temperatura ambiente.



Foto N°4: Una vez obtenidas las muestra vegetale se procedió a la selección, limpieza y secado de los mejores ejemplares de las flores de la especie vegetal *Calendula officinalis* “Caléndula por un periodo de 15 días en un lugar limpio, con sombra y temperatura ambiente.

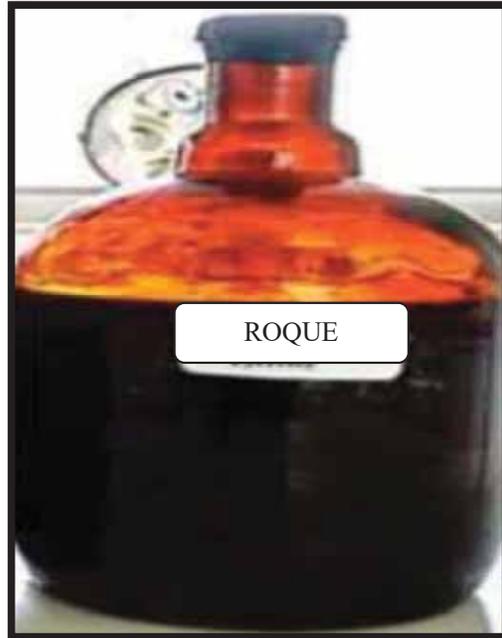


Foto N° 5: Una vez obtenida la muestra seca de los tallos de *Colletia spinosissima* “Roque” se procedió a molerla con un molino de granos previamente desinfectado, luego se tamizó la muestra para obtener la finura adecuada y se traspasó a frasco de color ámbar con tapa hermética y se sometió a maceración con alcohol de 70°, se agitó diariamente por un periodo de 15 días a temperatura ambiente.

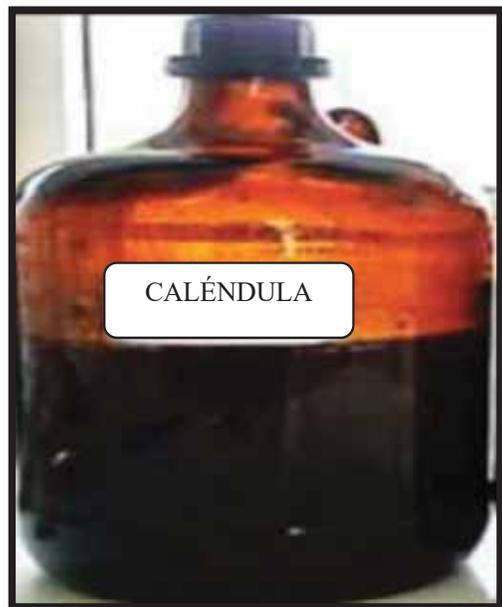


Foto N° 6: Una vez obtenida la muestra seca de las flores de *Caléndula officinalis* “Caléndula” se procedió a molerla con un molino de granos previamente desinfectado, luego se tamizó la muestra para obtener la finura adecuada y se traspasó a frasco de color ámbar con tapa hermética y se sometió a maceración con alcohol de 70°, se agitó diariamente por un periodo de 15 días a temperatura ambiente.



Foto N °7: Se observa la filtración del macerado etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque”, el producto filtrado se traspasó a un envase de boca ancha.



Foto N °8: Se observa la filtración del macerado etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula”, el producto filtrado se traspasó a un vaso de precipitado.



Foto N°9: Se observa lo siguiente;

En el vaso A: El filtrado proveniente de la maceración al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” se sometió a evaporación en Baño María a una temperatura de 40°C hasta obtener el extracto seco.

En el vaso B: El filtrado proveniente de la maceración al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula” se sometió a evaporación en Baño María a una temperatura de 40°C hasta obtener el extracto seco.

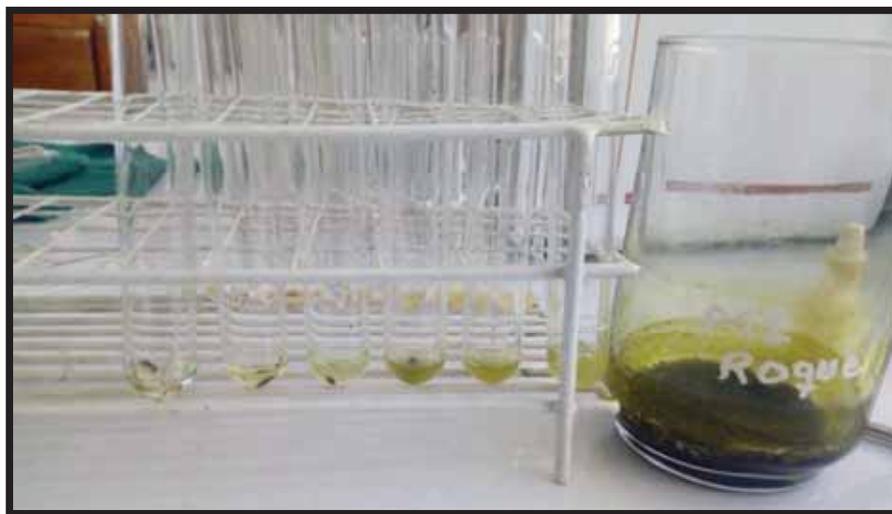


Foto N°10: Para la prueba de solubilidad se pesó 100 mg del extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque”, y se agregó disolventes de mayor a menor polaridad, resultando: Es muy soluble en solventes polares agua destilada, etanol al 40%, soluble en etanol 70%, poco soluble en etanol 96% y acetona e insoluble en acetato de etilo, cloroformo y hexano. Esto indica que en el proceso de extracción se obtuvieron metabolitos polares y se deduce que el extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” presenta naturaleza polar.



Foto N° 11: Para la prueba de solubilidad se pesó 100 mg del extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula”, y se agregó disolventes de mayor a menor polaridad, resultando: Es muy soluble en solventes polares etanol al 40% y etanol 70%, soluble en agua destilada y metanol y poco soluble en etanol 96% e insoluble en acetona, acetato de etilo, cloroformo y hexano. Lo que indica que en el proceso de extracción se obtuvieron metabolitos polares y se deduce que el extracto etanólico al 70% *Caléndula officinalis* “Caléndula” presenta naturaleza polar



Foto N° 12: En esta fotografía se observa el análisis fitoquímico realizado para determinar los metabolitos secundarios para la especie vegetal *Colletia spinosissima* “Roque”, en el cual el extracto etanólico al 70% tiene abundante cantidad de flavonoides, compuestos fenólicos, quinonas, glicósidos, y saponinas esteroidales; presenta en regular cantidad taninos, azúcares reductores, lactonas y aminoácidos; poca cantidad de alcaloides.



Foto N° 13: En esta fotografía se observa el análisis fitoquímico realizado para determinar los metabolitos secundarios para la especie vegetal *Caléndula officinalis* “Caléndula”, en el cual el extracto etanólico al 70% tiene abundante cantidad de flavonoides, compuestos fenólicos, quinonas y azúcares reductores; presenta en regular cantidad taninos, glicósidos y alcaloides; poca cantidad de lactonas, aminoácidos y saponinas.

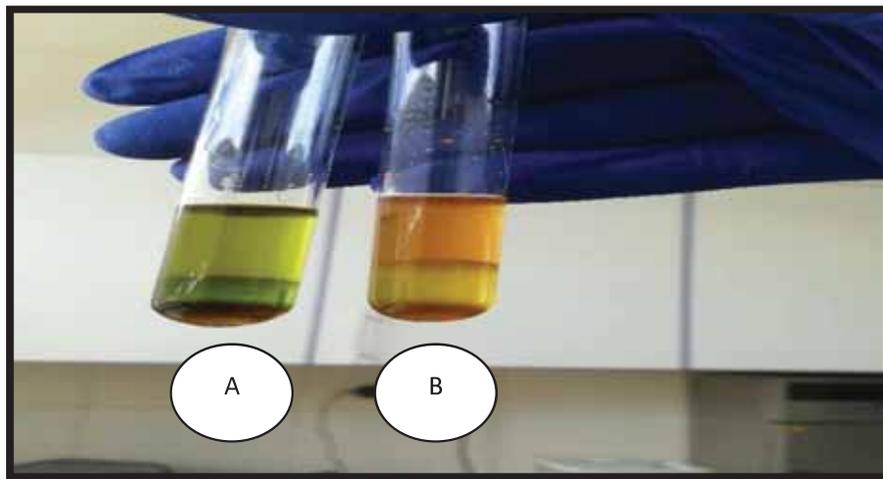


Foto N 14: En esta fotografía se observa:

En el tubo A: Se tomó una pequeña cantidad de extracto etanólico y se añadió 2 ml de anhídrido acético, 2 ml de cloroformo y se enfrió a 0 °C. Se añadió 2 gotas de ácido sulfúrico. La aparición de coloración azulada que pasa a anaranjado para luego volverse verde, indica que la reacción es positiva para *Colletia spinosissima* “Roque”.

En el tubo B: Se tomó una pequeña cantidad de extracto etanólico y se añadió 2 ml de anhídrido acético, 2 ml de cloroformo y se enfrió a 0 °C. Se añadió 2 gotas de ácido sulfúrico. La aparición de coloración azulada que pasa a anaranjado para luego volverse verde, indica que la reacción es positiva para *Caléndula officinalis* “Caléndula”.

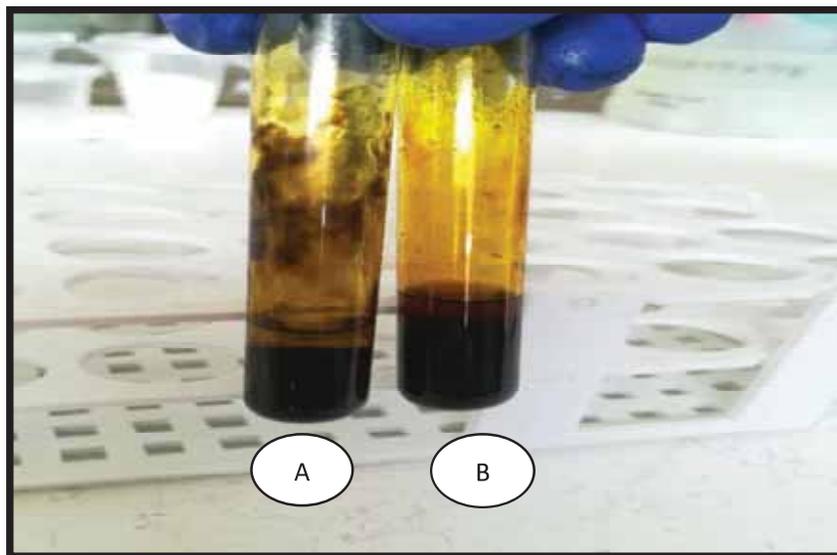


Foto N 15: En esta fotografía se observa:

En el tubo A: Se tomó una pequeña cantidad del extracto etanólico al 70 % de *Colletia spinosissima* “Roque” y se le añadió 2 ml de cloroformo y 2 ml de ácido sulfúrico. Resultando una coloración anaranjada lo que indica reacción positiva.

En el tubo B: Se tomó una pequeña cantidad del extracto etanólico al 70 % de *Caléndula officinalis* “Caléndula. Resultando una coloración anaranjada lo que indica reacción positiva.

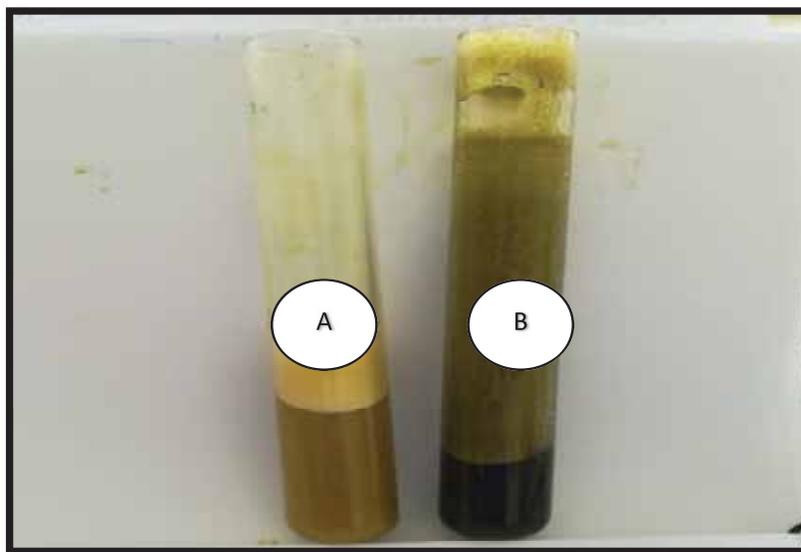


Foto N 16: En esta fotografía se observa:

En el tubo A: Al agitar la solución de la muestra (extracto etanólico al 70%) de *Caléndula officinalis* “Caléndula”, se forma una espuma estable como la obtenida al agitar la solución acuosa de un jabón, resultando positiva para saponinas

En el tubo B: Al agitar la solución de la muestra (extracto etanólico al 70%) de *Colletia spinosissima* “Roque”, se forma una espuma estable como la obtenida al agitar la solución acuosa de un jabón, resultando positiva para saponinas.

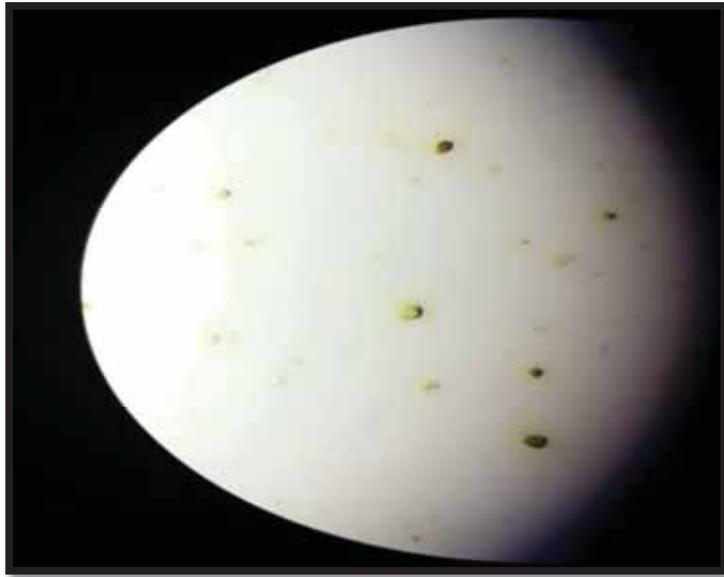


Foto N° 17: A una solución salina diluida se añade el extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque”, en el cual se observa la ruptura de la membrana del eritrocito esto debido a que las saponinas interactúan con los esteroides de la membrana eritrocitaria liberando la hemoglobina. Resultando la prueba positiva.

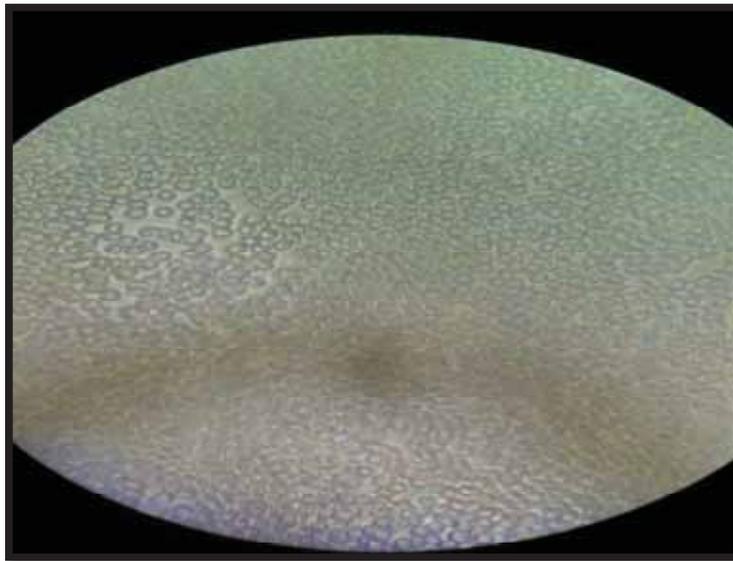


Foto N° 18: A una solución salina diluida se añade el extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula”, en el cual no se observa la ruptura de la membrana del eritrocito. Resultando la prueba negativa.

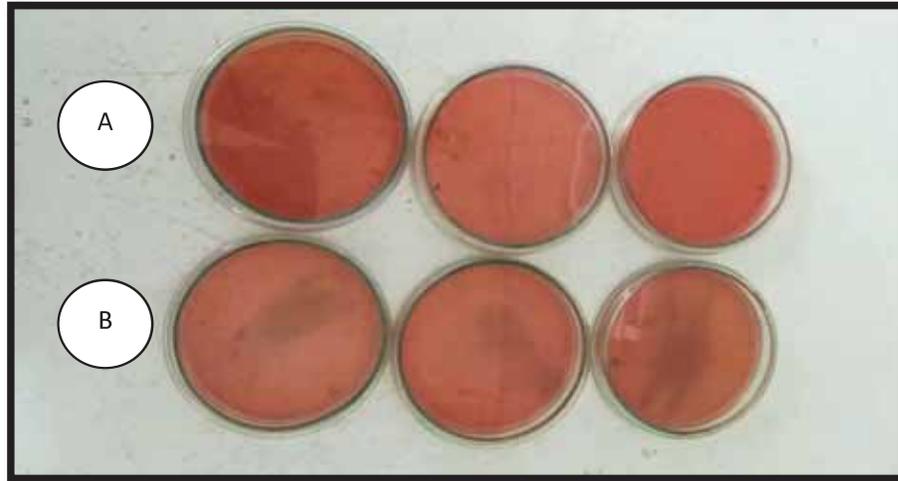


Foto N° 19: En la fotografía podemos observar que:

Placa A: El análisis microbiológico, el cual se pesó 10 gr del extracto seco etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque”; se sembró en Agar Salmonella-Shigella (SS), se incubó a una temperatura de 37° por 24 hrs, Resultando negativo, debido a la ausencia de colonias para shiguella.

Placa B: El análisis microbiológico, el cual se pesó 10 gr del extracto seco etanólico al 70% de *Calendula officinalis* “Caléndula”; se sembró en Agar Salmonella-shigella (SS), se incubó a una temperatura de 37° por 24 hrs, Resultando negativo, debido a la ausencia de colonias para shiguella.

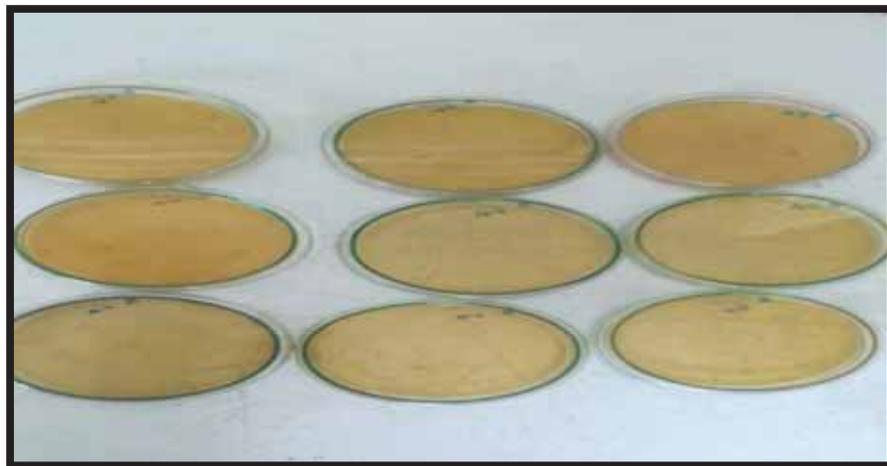


Foto N° 20: En la fotografía podemos observar el análisis microbiológico, el cual se pesó 10 gr del extracto seco etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque”; se sembró en agar Mc Conkey, se incubó a una temperatura de 37° por 24 hrs, Resultando negativo, debido a la ausencia de colonias para coliformes fecales.

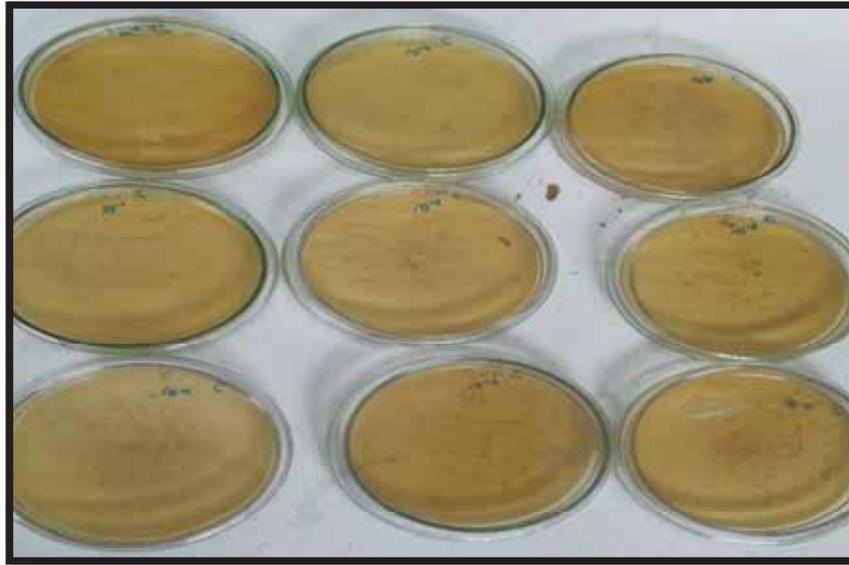


Foto N° 21: En la fotografía podemos observar el análisis microbiológico, el cual se pesó 10 gr del extracto seco etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula”; se sembró en agar Mc Conkey se incubó a una temperatura de 37° por 24 hrs, Resultando negativo, debido a la ausencia de colonias para Coliformes fecales.

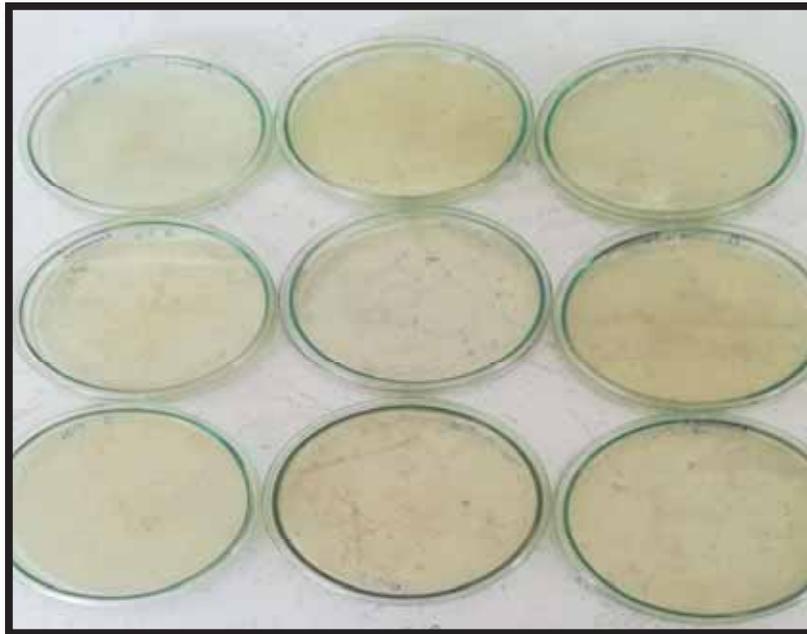


Foto N° 22: En la fotografía podemos observar el análisis microbiológico, el cual se pesó 10 gr del extracto seco etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque”; se sembró en agar Sabouraud, se incubó a una temperatura de 37° por 24 hrs, Resultando negativo, debido a la ausencia de colonias para aerobios, mesófilos y hongos y levaduras.

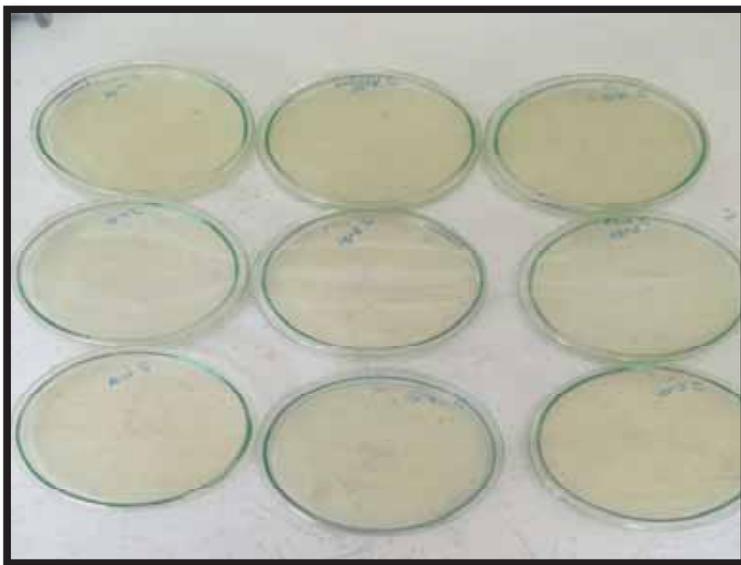


Foto N° 23: En la fotografía podemos observar el análisis microbiológico, el cual se pesó 10 gr del extraco seco etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula”; se sembró en agar Sabouraud, se incubó a una temperatura de 37° por 24 hrs, Resultando negativo, debido a la ausencia de colonias para aerobios, mesófilos y hongos y levaduras



Foto N° 24: En esta fotografía se observan a las cepas patrón que se utilizaron en el análisis microbiológico. En la izquierda se observa *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y en la derecha se observa a *Escherichia coli* ATCC 35218



Foto N° 25: En esta fotografía se observan la activación de las cepas liofilizadas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 35218 en medio de Agar Trypticase Soja.

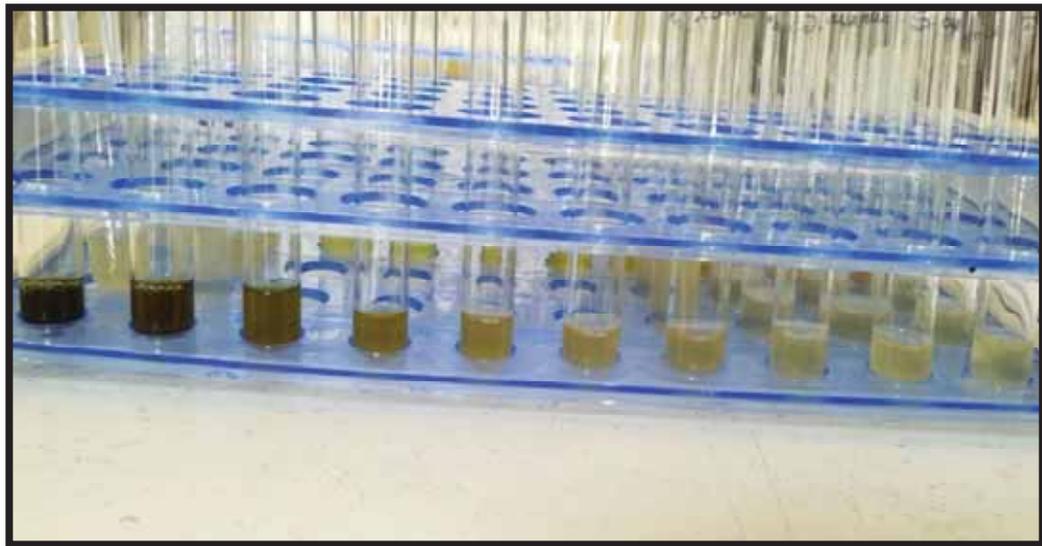


Foto N° 26: En esta fotografía, después de la incubación, la ausencia de crecimiento detectada por la falta de turbidez (comparándola con el control positivo y control negativo) en el tubo con la menor concentración de extracto, se designó como la CMI, para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 35218 por el método de dilución en caldo de *Colletia spinosissima* “Roque”.

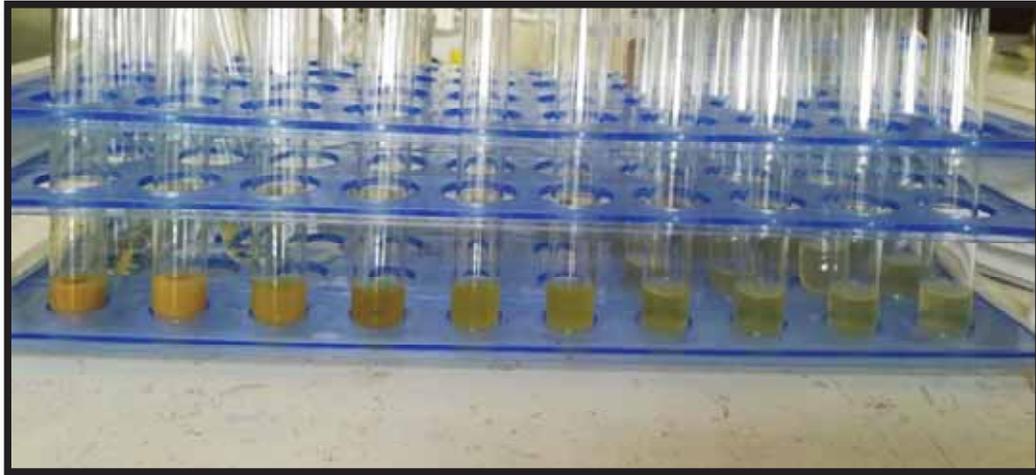


Foto N° 27: En esta fotografía, después de la incubación, la ausencia de crecimiento, detectada por la falta de turbidez (comparándola con el control positivo y control negativo) en el tubo con la menor concentración de extracto, se designó como la CMI, para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 35218 por el método de dilución en caldo de *Caléndula officinalis* “Caléndula”.

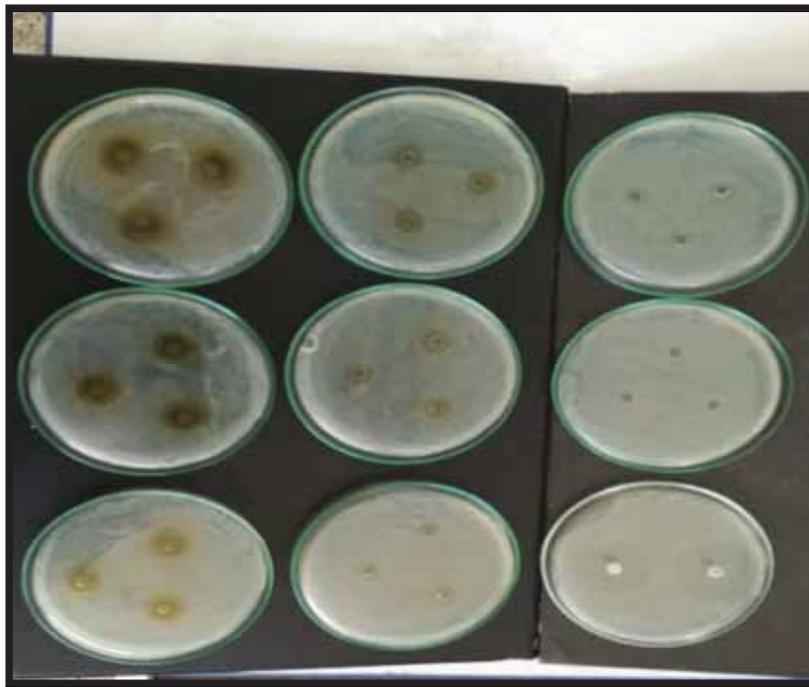


Foto N° 28: En la fotografía se observa los diferentes halos de inhibición del extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” formados para *Escherichia coli* ATCC 3528 después de la incubación, desde la placa 1 hasta la 12, por triplicado, seguidamente se hace la medición de los diámetros de los halos, para así comparar con el patrón correspondiente.

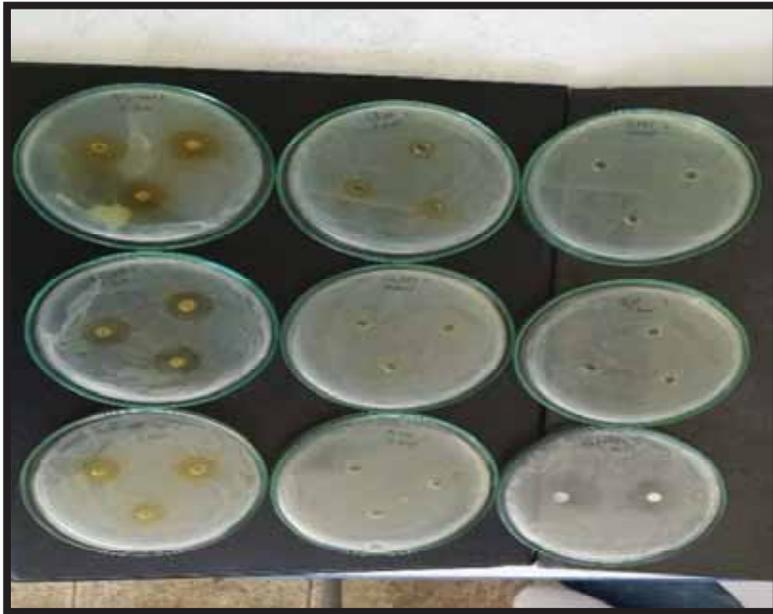


Foto N° 29: En la fotografía se observa los diferentes halos de inhibición del extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” formados para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 después de la incubación, desde la placa 1 hasta la 12, por triplicado, seguidamente se hace la medición de los diámetros de los halos, para así comparar con el patrón correspondiente.



Foto N° 30: En la fotografía se observa los diferentes halos de inhibición del extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula” formados para *Escherichia coli* ATCC 3528 después de la incubación, desde la placa 1 hasta la 12, por triplicado, seguidamente se hace la medición de los diámetros de los halos, para así comparar con el patrón correspondiente

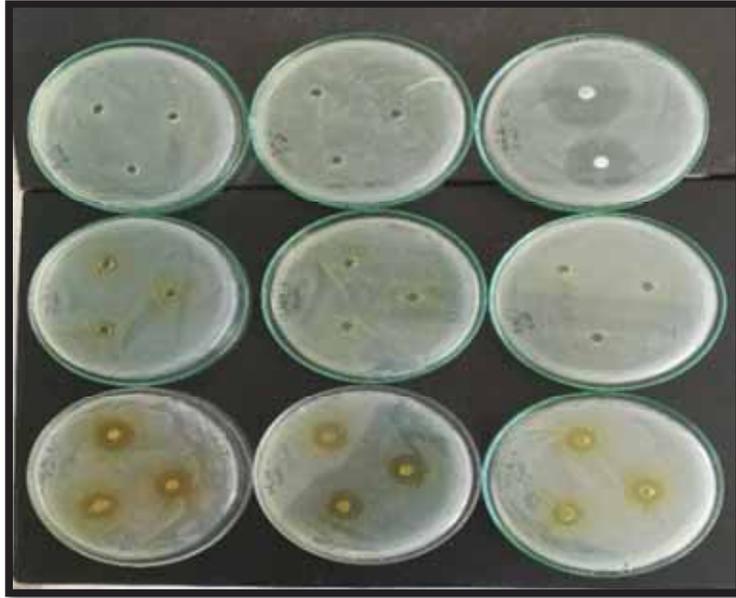


Foto N° 31: En la fotografía se observa los diferentes halos de inhibición del extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula” formados para *Escherichia coli* ATCC 3528 después de la incubación, desde la placa 1 hasta la 12, por triplicado, seguidamente se hace la medición de los diámetros de los halos, para así comparar con el patrón correspondiente



Foto N°32: En la fotografía se observa la elaboración del jabón líquido, en el cual se pesó el extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque” y se llevó a una forma farmacéutica (jabón líquido), con diferentes concentraciones: 1%, 3%,5%,7%,9%,11%, 13%.

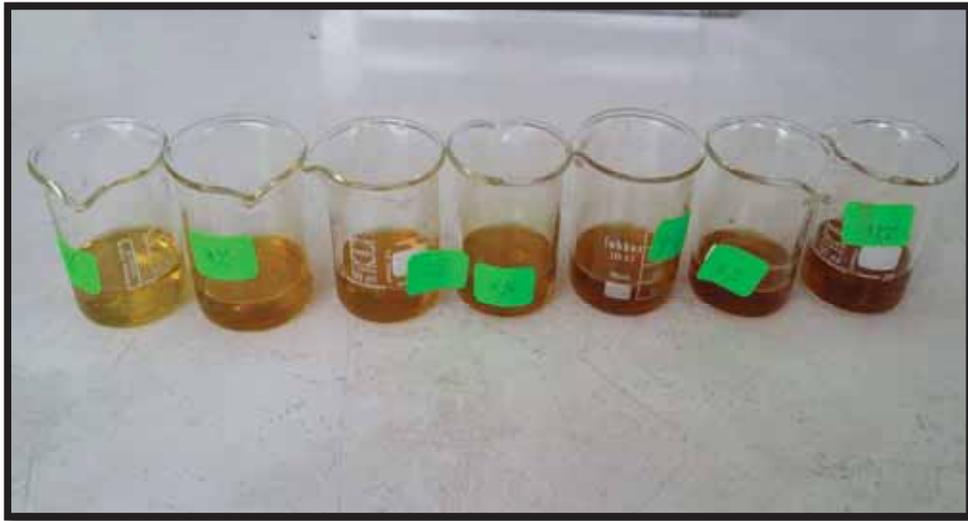


Foto N°33: En la fotografía se observa la elaboración del jabón líquido, en el cual se pesó el extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula” y se llevó a una forma farmacéutica (jabón líquido), con diferentes concentraciones: 1%, 3%, 5%, 7%, 9%, 11%, 13%.



Foto N° 34: En la fotografía se observa:

Placa A: la ausencia de colonias de *Escherichia coli*, mediante el análisis microbiológico, en el cual después de las diluciones realizadas en placas petri por triplicado, se mezcló el inóculo con el medio (Agar Mac Conkey), se incubó y se calculó el número de colonias de *Escherichia coli*, resultando así negativo para el jabón con extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque”.

Placa B: la ausencia de colonias de *Escherichia coli*, mediante el análisis microbiológico, en el cual después de las diluciones realizadas en placas petri por triplicado, se mezcló el inóculo con el medio (Agar Mac Conkey), se incubó y se calculó el número de colonias de *Escherichia coli*, resultando así negativo para el jabón con extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula”.

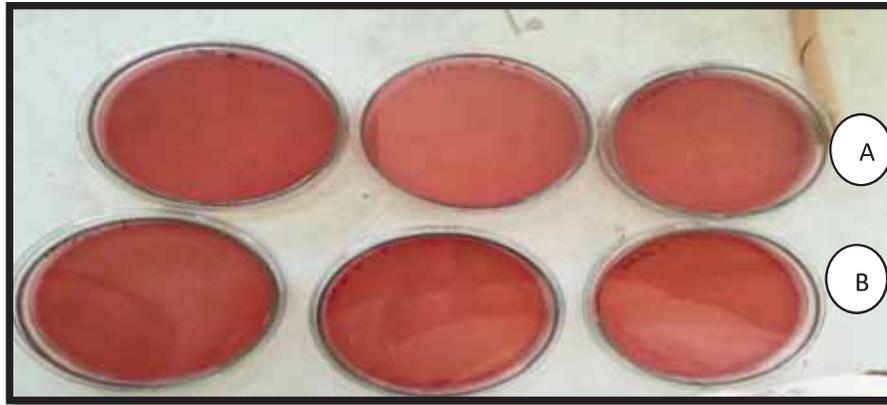


Foto N° 35: En la fotografía se observa:

Placa A: la ausencia de colonias de *Staphylococcus aureus*, mediante el análisis microbiológico, en el cual después de las diluciones realizadas en placas petri por triplicado, se mezcló el inóculo con el medio (Agar Manitol), se incubó y se calculó el número de colonias de *Staphylococcus aureus*, resultando así negativo para el jabón con extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque”

Placa B: la ausencia de colonias de *Staphylococcus aureus*, mediante el análisis microbiológico, en el cual después de las diluciones realizadas en placas petri por triplicado, se mezcló el inóculo con el medio (Agar Manitol), se incubó y se calculó el número de colonias de *Staphylococcus aureus*, resultando así negativo para el jabón con extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula”

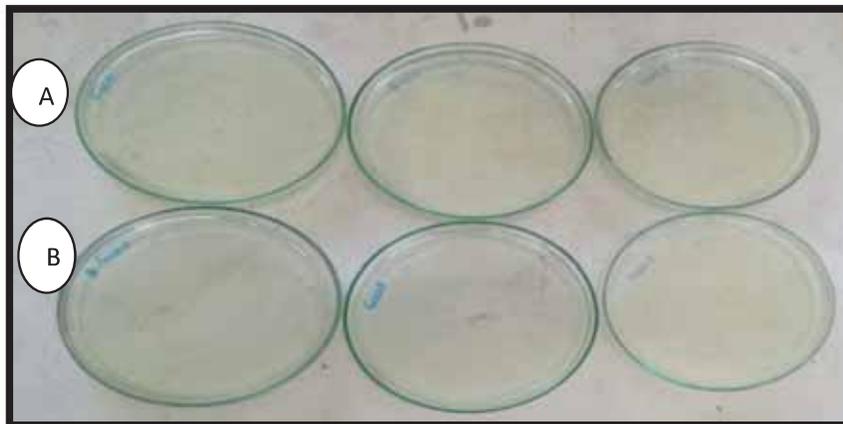


Foto N° 36: En la fotografía se observa:

Placa A: la ausencia de hongos, mediante el análisis microbiológico, en el cual después de las diluciones realizadas en placas petri por triplicado, se mezcló el inóculo con el medio (agar Sabouraud), se incubó y se calculó el número de hongos por gramo de muestra, resultando así negativo para el jabón con extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque”

Placa B: la ausencia de aerobios hongos, mediante el análisis microbiológico, en el cual después de las diluciones realizadas en placas petri por triplicado, se mezcló el inóculo con el medio (agar Sabouraud), se incubó y se calculó el número de hongos por gramo de muestra, resultando así negativo para el jabón con extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula”

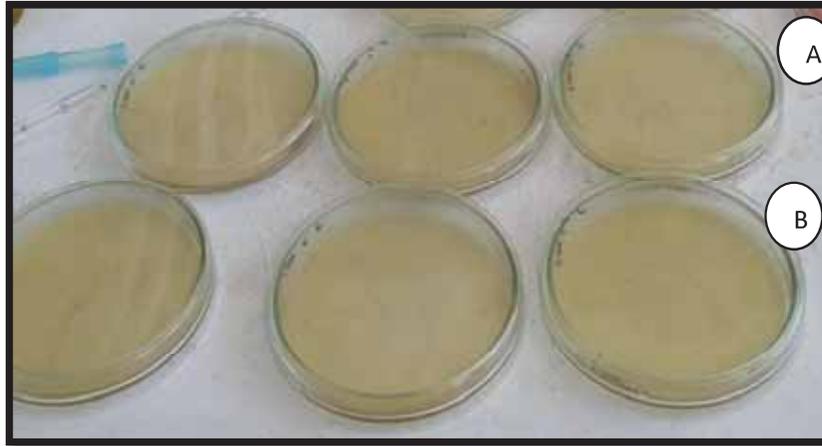


Foto N° 37: En la fotografía se observa:

Placa A: la ausencia de aerobios mesófilos, mediante el análisis microbiológico, en el cual después de las diluciones realizadas en placas petri por triplicado, se mezcló el inóculo con el medio (agar caso), se incubó y se calculó el número de microorganismos aerobios mesófilos por gramo de muestra (ufc/gr/ml), resultando así negativo para el jabón con extracto etanólico al 70% de *Colletia spinosissima* “Roque”.

Placa B: la ausencia de aerobios mesófilos, mediante el análisis microbiológico, en el cual después de las diluciones realizadas en placas petri por triplicado, se mezcló el inóculo con el medio (agar caso), se incubó y se calculó el número de microorganismos aerobios mesófilos por gramo de muestra (ufc/gr/ml), resultando así negativo para el jabón con extracto etanólico al 70% de *Caléndula officinalis* “Caléndula”.