

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN
CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



Actividad antibacteriana de compuestos fenólicos
aislados de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma",
frente a *Escherichia coli* ATCC 35218 y
Staphylococcus aureus ATCC 25923, Ayacucho 2019.

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICA

PRESENTADO POR EL:

Bach. CUADROS LAGOS, Sandrin Deysi

Ayacucho-Perú

2019

A mi familia con todo el amor del mundo.

AGRADECIMIENTO

A mi *Alma mater*, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, forjadora de profesionales competentes y de calidad humana, al servicio de la sociedad a la Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica y a toda su plana docente por los conocimientos impartidos durante mi formación académica profesional. A mi Asesor Q.F. Hugo Luna Molero docente de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica por su apoyo y colaboración en el desarrollo del presente trabajo de investigación, materializado en este informe.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Antecedentes del estudio	5
2.2. <i>Ligaria cuneifolia</i> "Tullma"	10
2.3. Compuestos antimicrobianos de origen vegetal	11
2.4. Compuestos polifenólicos	12
2.5. Antimicrobiano	14
2.6. Ciprofloxacino	15
2.7. Vancomicina	17
2.8. Microorganismo patógeno	18
2.9. Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana	22
III. MATERIALES Y METODOS	25
3.1. Ubicación del trabajo de investigación	25
3.2. Tipo de investigación	25
3.3. Definición de la población y muestra	25
3.4. Procedimiento metodológico	25
3.5. Diseño experimental	31
3.6. Análisis de datos	32
IV. RESULTADOS	33
V. DISCUSIÓN	45
VI. CONCLUSIONES	51
VII. RECOMENDACIONES	53
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
IX. ANEXOS	61

ÍNDICE DE TABLAS		Página
Tabla 1	Clasificación científica de la tullma (<i>Ligaria cuneifolia</i>).	10
Tabla 2	Clasificación científica de la <i>Escherichia coli</i> .	19
Tabla 3	Antibióticos y diámetros críticos para Enterobacterias.	20
Tabla 4	Clasificación científica de la <i>Staphylococcus aureus</i> .	21
Tabla 5	Antibióticos y diámetros críticos para <i>Staphylococcus spp</i>	22
Tabla 6	Herramienta de recolección de datos de la investigación.	32
Tabla 7	Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma", Ayacucho 2019.	35
Tabla 8	Ensayos químicos de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma", Ayacucho 2019.	36
Tabla 9	Parámetros químicos y fisicoquímicos de los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma", Ayacucho 2019.	37
Tabla 10	Promedio de halos de inhibición (mm) de los compuestos fenólicos (FAE) aislado de la de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma" frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, Ayacucho 2019.	38
Tabla 11	Porcentaje de halos de inhibición (%) de los compuestos fenólicos, aislado de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma", frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218, y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, frente al estándar ciprofloxacino ug y vancomicina 30 µg, Ayacucho 2019.	39
Tabla 12	Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida de los compuestos fenólicos (FAE) aislado de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma" frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, Ayacucho 2019.	40

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Núcleo básico de un flavonoide	13
Figura 2	Formula de los flavonoides aislados de <i>Ligaria cuneifolia</i>	14
Figura 3	Variación de los halos de inhibición por efecto de las diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma", frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218, Ayacucho 2019.	41
Figura 4	Porcentaje de inhibición de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma" frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 en comparación con el ciprofloxacino 30 µg, Ayacucho 2019.	42
Figura 5	Variación de los halos de inhibición por efecto de las diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma" frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, Ayacucho 2019.	43
Figura 6	Porcentaje de inhibición de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma" frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 en comparación con la vancomicina 30 µg, Ayacucho 2019.	44

ÍNDICE DE ANEXOS

		Página
Anexo 1	Certificado de identificación botánico de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma”, Ayacucho 2019.	63
Anexo 2	Certificado de identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, Ayacucho 2019.	64
Anexo 3	Certificado de identificación de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218, Ayacucho 2019.	65
Anexo 4	Fotografía de las muestras de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma” en hospederos de níspero de la localidad de Huamanguilla, Ayacucho 2019.	66
Anexo 5	Flujograma de extracción de los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma”, Ayacucho 2019.	67
Anexo 6	Extracción e identificación cualitativa de los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma”, Ayacucho 2019.	68
Anexo 7	Reconocimiento de los principales metabolitos secundarios en el extracto etanólico y de la fracción de acetato de etilo aislado de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> . “tullma”, Ayacucho 2019.	69
Anexo 8	Compuestos fenólicos aislados por cromatografía en capa fina por espectrofotometría ultravioleta y medición del RF de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> , frente al estándar de quercetina, Ayacucho 2019.	70
Anexo 9	Curvas cromatográficas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma” en espectro Uv-vis, Ayacucho 2019.	71
Anexo 10	Proceso de determinación de halos de inhibición de los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma” ,Ayacucho 2019.	72

Anexo 11	Determinación de halos de inhibición de los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma” de las 5 dosis frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, Ayacucho 2019.	73
Anexo 12	Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria al 15% de los compuestos fenólicos las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma” frente a <i>Escherichia Coli</i> ATCC 35218, Ayacucho 2019.	74
Anexo 13	Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria al 15% de los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, Ayacucho 2019.	75
Anexo 14	Determinación de la concentración Mínima Bactericida al 15% de los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma” frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 y <i>staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, Ayacucho 2019.	76
Anexo 15	Análisis de prueba de normalidad de los halos de inhibición de a las diferentes dosis de los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma”, frente al estándar ciprofloxacino 30 ug, Ayacucho 2019.	77
Anexo 16	Análisis de prueba de normalidad de los halos de inhibición de a las diferentes dosis de los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma”, frente al estándar vancomicina 30 ug, Ayacucho 2019.	78
Anexo 17	Resultados del análisis de varianza de los halos de inhibición de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma”, frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218, Ayacucho 2019.	79
Anexo 18	Resultados del análisis de varianza de los halos de inhibición de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> “tullma” frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, Ayacucho 2019.	80

Anexo 19	Medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos por la prueba de Tukey, de los halos de inhibición por efecto de las diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma", frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218, Ayacucho 2019.	81
Anexo 20	Medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos por la prueba de Tukey, de los halos de inhibición por efecto de las diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma", frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923, Ayacucho 2019.	82
Anexo 21	Matriz de consistencia, Ayacucho 2019	83

RESUMEN

El presente estudio se realizó con el objetivo principal, de determinar la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos aislado de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" frente a *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, el cual se llevó acabo en el laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación de Bioquímica Clínica y Molecular, de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, en los meses de marzo a julio del 2019. El tipo de investigación fue básica experimental. Para la obtención de los extractos, las hojas fueron colectadas en el distrito de Huamanguilla, departamento de Ayacucho; las cuales fueron sometidas a un proceso de extracción hidroalcohólica, desengrasado con éter de petróleo y extracción de los fenoles con acetato de etilo. Los compuestos fenólicos fueron aislados por cromatografía en capa fina por espectrofotometría ultravioleta. El extracto contiene: fenoles y flavonoides. Se empleó el método de difusión de discos de Kirby Bauer para determinar sensibilidad o resistencia de las bacterias frente a los extractos y el método de dilución en caldo para determinar CIM y CBM; las cuales fueron ensayadas a concentraciones de 1 %; 2,5 %; 5 %; 10 y 15 %, como control se utilizó la vancomicina para *S. aureus* y ciprofloxacino para *E. coli*; Los resultados muestran dentro de los parámetros fisicoquímicos: porcentaje de humedad igual a 11,62 %, cenizas igual a 4,5 %, pH 4. La inhibición frente a *E. coli* fue de 69,5 % de inhibición al 15 %; cuya CMI de 4,688 mg/ml y CMB de 9,375 mg/ml. En el caso de *S. aureus* fue de 99,25 % al 15 % cuya CMI fue de 2,344 mg/ml y CMB de 4,688 mg/ml. Se concluye que los compuestos fenólicos aislado de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" tiene actividad antibacteriana frente a las cepas en estudio.

Palabras clave: actividad antibacteriana, *Ligaria cuneifolia*, compuestos fenólicos, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*.

I. INTRODUCCIÓN

Según la OMS, entre las principales amenazas para la salud, tenemos el aumento de patógenos resistentes a los medicamentos; entre las más frecuentes se encuentran: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, etc¹. Estas bacterias son un problema a nivel mundial ya que han evolucionado a un ritmo tan acelerado; ante la adquisición de resistencia por parte de éstos; ésta resistencia puede atribuirse a diversas causas como el uso incorrecto de los antibióticos por desconocimiento del agente causal de la infección, especialmente debido a la múltiple propaganda comercial que favorece el que se ingiera un determinado antibiótico².

De igual modo las enfermedades infecciosas causadas por estos patógenos en mención; se comportan como uno de los mayores problemas de salud a nivel mundial, provocando una gran morbilidad y alcanzando millones de afectados cada año; el incremento de viajes, cambios demográficos y resistencia antimicrobiana; contribuyen significativamente a este problema³. Así mismo en el perfil de salud pública, la resistencia bacteriana es un tema de importancia; pues dada la presencia en patógenos relacionados con enfermedades prevalentes, como son, la enfermedad diarreica aguda (EDA), las infecciones respiratorias agudas (IRA) y las infecciones intrahospitalarias, le dan un carácter de problema prioritario por la alta resistencia de uso y abuso de los fármacos, por lo que es necesario la búsqueda de nuevos principios activos con actividad antimicrobiana⁴. La OMS, muestra que en las Américas hay una elevada resistencia de *E. coli* a las cefalosporinas de tercera generación y a las fluroquinolonas, dos clases importantes y muy utilizadas de fármacos antibacterianos. En el caso de las infecciones por *S. aureus* el 90% de los casos son resistentes a la metilina, lo cual significa que el tratamiento con los antibióticos habituales ya no funciona¹. En vista a lo antes mencionado se ha desplegado un gran interés por parte de los investigadores tanto en el desarrollo tecnológico de la industria farmacéutica, así

como en estudiar sustancias naturales que posean algunas propiedades farmacológicas con efecto antimicrobiano⁴.

Por consiguiente, las posibles soluciones fundamentales, para hacer frente a estos problemas; consisten en contribuir fomentando la innovación, la investigación y desarrollo de nuevos medicamentos, nuevos antibióticos que permitan a los profesionales sanitarios tener ventaja ante la resistencia emergente⁵.

Las plantas son una alternativa actual para buscar nuevos agentes terapéuticos y el desarrollo de medicamentos, no solo cuando los constituyentes de las plantas se usan directamente como agentes terapéuticos sino también como material base para la síntesis de los medicamentos o como modelos para compuestos farmacológicamente activos⁶.

Se ha informado que las plantas que poseen compuestos con reconocidas capacidades antibacterianas, es debido a la presencia de compuestos fenólicos, éstas son sustancias biológicamente activas. Existen numerosas evidencias, epidemiológicas, estudios *in vitro*, estudios en modelos animales e intervenciones en humanos, que indican que estos compuestos proporcionan un beneficio al organismo en contra de diversas enfermedades. Los compuestos extraídos de las plantas que poseen actividad antibacteriana generalmente son compuestos fenólicos y polifenoles en las que se encuentran quinonas, flavonoides, taninos⁷.

Por lo antes mencionado es el punto de partida de este trabajo de tesis; ya que de entre tantas especies vegetales que nos ofrece la medicina tradicional para solucionar el problema en mención, la *Ligaria cuneifolia* "tullma", es una especie poco estudiada en el ámbito de investigación⁸.

Por ello partiendo de estas premisas el objetivo general del presente trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma", frente a *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 mediante la prueba de sensibilidad antimicrobiana. Los objetivos específicos son:

- Identificar los principales metabolitos secundarios presentes en la fracción de acetato de etilo de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma"
- Determinar los parámetros fisicoquímicos de los compuestos fenólicos de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma".
- Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos fenólicos de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma".

- Determinar la concentración mínima bactericida (CBM) de los compuestos fenólicos de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma".

Esperamos que el presente trabajo de tesis contribuya al conocimiento de las propiedades farmacológicas de *Ligaria cuneifolia* "tullma", que sirva de referencia para otros estudios de mayor precisión y, sobre todo, sirva como evidencia científica para estudios preclínicos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

Maderuelo et al⁹, en el 2015 en un estudio titulado actividades antibacterianas de extractos de hojas de *Ligaria cuneifolia* y *Jodina rhombifolia* contra bacterias fitopatógenas. En la cual se prepararon seis extractos vegetales a partir de éstas plantas. En este trabajo, utilizaron métodos de bioautografía y microdilución para demostrar la actividad antibacteriana de las muestras sobre 7 cepas fitopatógenas; en la cual se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CIMs) y concentraciones bactericidas mínimas (CBMs) de las muestras. Así mismo se realizó el aislamiento e identificación de compuestos activos antibacterianos, se llevó a cabo para el extracto metanólico de *Ligaria cuneifolia* (LCME); estos compuestos activos fueron identificados como mono flavonoles, diglicósidos y ácido gálico; también se evaluó la actividad antibacteriana de los compuestos purificados. Finalmente concluyeron que los extractos metanólicos y acuosos de *Ligaria cuneifolia* si presentan actividad inhibitoria sobre bacterias fitopatógenas, con CIMs de 2,5 a 156 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para el extracto metanólico y 5 mg/mL^{-1} para el extracto acuoso; sin embargo ninguno de los tres extractos de *J. rhombifolia* mostraron actividad antibacteriana significativa sobre las cepas fitopatógenas, solamente el extracto metanólico de *Ligaria cuneifolia* presentó actividad bactericida sobre las cepas fitopatógenas con CBMs de 78 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$; y exhibió actividad inhibitoria significativa ($p < 0,05$) frente a las cepas clínicas de referencia como *Escherichia coli* con CIM de 156 mg/mL^{-1} , en el caso de *Staphylococcus aureus* con CIM de 78 mg/mL^{-1} y CBM de 312 mg/mL^{-1} . Por lo expuesto, los compuestos aislados de *Ligaria cuneifolia* poseen actividad inhibitoria sobre cepas fitopatógenas, estos podrían utilizarse como una fuente eficaz de metabolitos contra las enfermedades bacterianas en vegetales.

Soberón et al,¹⁰ en el 2009 realizaron un estudio titulado la identificación y purificación de fenoles de *Tripodanthus acutifolius*, en este estudio emplearon

métodos bioautográficos como ensayos de selección para purificar sustancias bioactivas; en los procedimientos de purificación incluyeron cromatografía en columna sephadex LH-20 y HPLC de fase inversa mientras que la identificación se logró mediante métodos espectroscópicos (UV-Vis, MS, RMN y polarimetría) y ensayos cromatográficos (cromatografía en papel y HPLC). Para demostrar la actividad antibacteriana se realizó mediante microdilución, recuento de colonias y ensayos fotométricos, para ello purificaron e identificaron cuatro glico flavonoides como rutina, nicotiflorina, hiperosido e isoquercitrina y un inusual glicósido fenilbutanoide (tripodantósido). En estas muestras estudiadas se encontró tripodantósido a $6,59 \pm 0,82$ g por 100 g de hojas secas, concluyendo que los flavonoides presentan efecto bactericida en una concentración de 4mg/ml^{-1} contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, mientras que el tripodantósido son cuatro veces más activo que esos compuestos, con una concentración bactericida mínima de $1,024 \text{mg/ml}^{-1}$ contra estas cepas.

Kolling et al¹¹, en el 2010 mediante un estudio titulado estudios microbiológicos y cuantitativos de los extractos de *Ligaria cuneifolia* y *Jodina rhombifolia*; este estudio fue realizado con la finalidad de encontrar el control biológico de bacterias fitopatógenos, se realizaron ensayos *in vitro* para determinar la actividad antibacteriana de los extractos metanólicos, diclorometanico, e infusión de *Ligaria cuneifolia* y *Jodina rhombifolia*; el efecto de dichos extractos se comprobó por pruebas de microdilución y macrodilucion. Concluyendo que los extractos metanólicos y la infusión de *Ligaria cuneifolia* inhibieron significativamente el crecimiento de las bacterias utilizadas. Por ello los resultados obtenidos sugieren que los extractos *Ligaria cuneifolia* y *Jodina rhombifolia* presentan metabolitos con actividad antibacteriana sobre cepas fitopatógenos.

Ricco et al ¹², en el 2018 en el trabajo de investigación titulado análisis de polifenoles e iniciación de cultivos *in vitro* de *Ligaria cuneifolia*; en ello señalan que, la planta en mención es una hemiparásita sudamericana que produce polifenoles con actividad hipolipemiente, citostática, inmunomoduladora, antioxidante y antimicrobiana. El objetivo de este estudio fue determinar el perfil de polifenoles de ejemplares silvestres en distintos órganos y extractos; así como las condiciones más adecuadas para iniciar sus cultivos *in vitro*. Para el estudio fitoquímico realizaron cromatografías en capa delgada de tipo monodimensional, observándose así la presencia de flavonoides, derivados hidroxicinámicos y proantocianidinas en los extractos de hojas, tallos primarios, tallos secundarios y

flores. En cuanto al análisis cuantitativo obtuvieron altos valores de flavonoides en hojas de 2,14 mg/eq de rutina por gramo de material seco en hojas y de proantocianidinas 7,52 mg/eq de catequina por gramo de material seco en flores. Concluyendo que estos compuestos son responsables de las actividades biológicas mencionadas.

Ferrero et al,¹³ en el 2009 en un estudio titulado efecto sobre parámetros hemorreológicos y secreción biliar de la fracción metanólica de *Ligaria cuneifolia* “muérdago criollo. En la cual el tratamiento se realizó en ratas con el extracto crudo de *Ligaria cuneifolia*, por vía intraperitoneal la cual produjo incremento de la viscosidad sanguínea, así también disminución del colesterol plasmático y aumento de la excreción biliar. En este trabajo analizaron el efecto de la fracción metanólica del extracto crudo de *L. cuneifolia* sobre las propiedades hemorreológicas en condiciones *ex vivo* e *in vitro* y sobre la excreción biliar; para los estudios *ex vivo* se emplearon ratas wistar machos adultos; en la cual a un lote se suministró concentraciones crecientes de la fracción metanólica del extracto crudo de *L. cuneifolia* y 1-vinil-2-pirrolidona; al otro lote sólo se suministró 1-vinil-2-pirrolidona. Para los estudios *in vitro*, utilizaron muestras de sangre obtenidas por punción cardíaca de la cual se fraccionaron en tres alícuotas iguales, que fueron incubadas durante 30 minutos a 37 °C con solución fisiológica, 1-vinil-2-pirrolidona y fracción metanólica del extracto crudo de *Ligaria cuneifolia*; de esta manera se demostró un efecto directo del 1-vinil-2-pirrolidona (PVP) y de la fracción metanólica del extracto crudo de *L. cuneifolia*, sobre la membrana eritrocitaria en las que produjo un cambio de forma de discocito a esferoestomatocito. Así mismo, se observó una disminución de la deformabilidad eritrocitaria que evidenció una interacción del PVP y de la fracción metanólica con la membrana globular. Concluyendo que el cambio de discocito a estomatocito y la rigidez eritrocitaria producen aumento de la viscosidad sanguínea y el descenso de colesterol plasmático, esto se debería al aumento de la excreción biliar de colesterol y de sales biliares, que conducen al aumento del flujo biliar observado.

Varela et al,¹⁴ en el 2008 en un estudio titulado el “muérdago criollo”, *Ligaria cuneifolia* desde el uso popular hacia el estudio de los efectos farmacológicos; cuya planta presenta una amplia distribución en la República Argentina. En su estudio señalan que el empleo de esta planta en la medicina popular como sustituto del muérdago europeo (*Viscum album*) está basado en su presunta acción sobre la presión arterial. Los estudios anatómicos mostraron que el

elemento característico, es la presencia de esclereidas cristalíferas en hojas y tallos y la presencia de epidermis cuticular en el tallo, así también realizaron análisis de los polifenoles mostrando que el único flavonol detectado fue la quercetina libre y glicosilada. En la mayoría de los ejemplares analizados se detectó la presencia de tiramina, cuya concentración no fue superior a los 10 mg%, pero en los ejemplares que parasitan a *Geoffroea decorticans*, los niveles de tiramina pueden superar los 360 mg%. Así también los componentes proteicos de los extractos analizados por electroforesis; presentaron un patrón de distribución diferente del muérdago europeo, pero las proteínas presentan epitopes comunes con las proteínas del *Viscum album*. En conclusión, este estudio ha permitido establecer los efectos biológicos sobre el sistema cardiovascular y la acción citostática e inmunomoduladora.

Giménez et al,¹⁵ en 2012 en el artículo titulado Caracterización multivariable de “muérdago criollo”, *Ligaria cuneifolia* de acuerdo a su composición mineral; realizaron la caracterización de los principales componentes en muestras de *Ligaria cuneifolia* recolectadas en tres zonas de la región noreste de Argentina, durante dos períodos de muestreo. En este trabajo los autores proponen un modelo matemático para la búsqueda de asociaciones entre el contenido mineral y otros factores como el origen geográfico o el periodo de muestreo. El monitoreo de las concentraciones de los elementos minerales se realizó con el fin de utilizarlo como método para el reconocimiento de patrones que es una herramienta prometedora en la caracterización y/o estandarización de fitofármacos. Finalmente se pudieron detectar cantidades medibles de Al, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Na, P, Sr y Zn que fueron detectadas en muestras fitomedicinales de *L. cuneifolia*; utilizando métodos de espectroscopía de emisión óptica de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES), esta metodología ha permitido realizar determinaciones confiables del contenido mineral en el control de calidad farmacéutica de plantas medicinales.

Roque,¹⁶ en el 2017 realizó un estudio titulado frecuencia de *Escherichia coli* diarreogénicas aisladas de niños en un hospital pediátrico en Lima. En la cual se colectaron 70 muestras de heces diarreicas de niños con síntomas clínicos de diarrea aguda del Hospital de Emergencias Pediátricas, durante los meses junio a diciembre del 2015; el aislamiento e identificación bioquímica se realizó por coprocultivos y pruebas bioquímicas convencionales, la identificación de *Escherichia coli enteropatógena* (EPEC) se realizó por serotificación utilizando

antisueros polivalentes y monovalentes para los antígenos somáticos O. Para ello la determinación del antígeno somático "O" se realizó mediante la técnica de aglutinación en placa; en la cual se aislaron 50 cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas equivalente a 71,4% de las cuales 36 (72%) fueron del serotipo enteropatógeno (EPEC) siendo los siguientes serogrupos más frecuentes O119 (22,2%), O158 (16,7%), O142 (11,1%), O127 (8,3%), O55 (19,4%), O86 (8,30%), O125 (13,9%) y el 28,6% no evidenciaron la presencia de *E. coli* diarreogénicas. Harris et al,¹⁷ en el 2002 en un estudio titulado una introducción a *Staphylococcus aureus* y técnicas para identificar y cuantificar las adhesinas de *S. aureus* en relación con la adhesión a biomateriales. En ello señalan que el *s. aureus* es un microorganismo sumamente resistente a la metilina (MRSA) y otros antibióticos que antes eran eficaces contra el tratamiento de las infecciones; desde el punto de vista genómico, indican que la resistencia se produce por selección natural a través de mutaciones producidas al azar; sin embargo, también se pueden inducir artificialmente mediante la aplicación de una presión selectiva a una población, como sería el abuso o la utilización de antibióticos; así mismo, este microorganismo tiene características genéticas que le han permitido convertirse en una de las bacterias más importantes en la clínica y en las enfermedades transmitidas por alimentos; en este trabajo se mencionan también algunas características principales para el aislamiento y el estudio del patógeno, utilizando procedimientos microbiológicos. Finalmente, se hace referencia a la situación del patógeno tanto en México como a nivel mundial; en conclusión, el *Staphylococcus aureus* es una bacteria que tiene un amplio grado de diseminación, ya que pertenece a la flora comensal del cuerpo humano, ubicándose principalmente en fosas nasales, Por ello, los portadores juegan un papel esencial en la transmisión del patógeno. En este aspecto, es importante identificar de manera correcta la presencia del microorganismo en los alimentos contaminados y en el desarrollo de la bacteria en diversas infecciones clínicas. Para esto, se utilizan distintos medios de detección, basados en el metabolismo de la bacteria, así como en la producción de las toxinas estafilocócicas.

Pillaca¹⁸, en el 2008 en una tesis titulada efecto cicatrizante del extracto hidroalcohólico de las flores y hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma", determinó que el extracto hidroalcohólico de las flores y hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma", presenta efecto cicatrizante; en la cual el tamizaje fitoquímico reporta la presencia de azúcares, taninos, fenoles, flavonoides, Cardenólidos, aminoácidos, lactonas y

cumarinas; tanto en hojas como en flores; en las flores se hallaron pequeñas cantidades de alcaloides. Para este estudio se utilizó ratones de un peso aproximado de 20 a 24g; para determinar el efecto cicatrizante se usó el método de test de cicatrización descrito por Howes; los ratones fueron clasificados en 5 grupos de tratamiento: gel (blanco), Cicatrim (estándar), extracto hidroalcohólico de hojas al 1%, flores al 1% y hojas – flores al 1%; los cuales fueron gelificadas para su administración. En conclusión, el extracto hidroalcohólico de hojas- flores al 1% tuvo mejor efecto cicatrizante que el Cicatrim, y el extracto hidroalcohólico de hojas al 1% y extracto hidroalcohólico flores al 1%.

2.2. *Ligaria cuneifolia* “Tullma”

2.2.1. Clasificación taxonómica

Tabla 1. Clasificación científica de la tullma (*Ligaria cuneifolia*)

Categoría taxonómica	Clasificación
DIVISION:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE:	MAGNOLIOPSIDA
SUBCLASE:	ROSIDAE
ORDEN:	SANTALES
FAMILIA:	LORANTHACEAE
GENERO:	<i>Ligaria</i>
ESPECIE:	<i>Ligaria cuneifolia</i> (R. & P.) Tiegh
SINONIMIA:	<i>viscum album</i> (R. & P.) Tiegh
N.V.	“Tullma”

Fuente: Descripción realizada por bióloga Aucasime Medina Laura-2019 (anexo 2)

2.2.2. Generalidades

Ligaria cuneifolia (R. et P.) Tiegh (Loranthaceae) es una especie vegetal hemiparásita semileñosa con una amplia distribución en Sudamérica (Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Perú y Uruguay). Se la denomina vulgarmente “liga”, “liguilla” o “muérdago criollo” (Varela y col., 2000) refiriéndose su uso en medicina tradicional como hipotensor, antimicrobiano, hipolipemiente, antioxidante, citostática e inmunomoduladora. Al igual que otras especies de la familia Loranthaceae, *Ligaria cuneifolia* se caracteriza por la producción de altos niveles de polifenoles, especialmente flavonoides del grupo de los flavonoles, quienes podrían ser responsables de sus actividades farmacológicas.¹⁹

2.2.3. Descripción botánica.

Las loranthaceas presentan 70 géneros con 940 especies se encuentra en Perú, Bolivia, Argentina, Chile, Brasil y Uruguay. Es una planta oriunda del Perú es muy

poco conocida en el campo de la experimentación, lo que la caracteriza es que crece aprovechando la vitalidad de otras plantas (parásita), ubicándose en sus ramas más robustas, algunas presentan las características de ser arbustivas.²¹ *Ligaria cuneifolia* "tullma" es una planta arbustiva, glabra y desprovista de raíces aéreas; las ramas son rugoso estriadas, subcomprimidas cuando son jóvenes, gruesas y cilíndricas cuando son adultas. Las hojas se disponen en forma alterna, lineares, oblongas, lanceoladas o linear espatuladas; miden entre 15 y 65 mm de largo por 4 a 15 mm de ancho; son carnosas, de superficie rugosa y sus nervaduras no son visibles. Las flores se disponen en racimos uniflorales; presentan escamas basales (profilos) de forma aovada, de 1 mm de largo; la cúpula subfloral es ciatiforme, triangular y tridentada.⁸ Las flores son hexámeras y su pigmentación varía desde el color rojo, en los ejemplares que crecen en la región central y occidental del país, los tépalos son linear espatulados y pueden soldarse en un tubo en su mitad inferior. Los estambres se disponen alternados, son desiguales e insertos a los tépalos hasta la mitad de su longitud; la región basal de los estambres queda libre formando una lígula. El fruto es una baya globosa, negruzca y está coronada por el cálculo tubuloso. Las semillas son endospermadas y germinan a principios de noviembre.¹⁹

2.2.4. Distribución geográfica.

Ligaria cuneifolia es una especie sudamericana que se encuentra en Perú, Bolivia, Argentina, Chile, Brasil y Uruguay; en la Argentina presenta una gran dispersión; se extiende desde Salta y Jujuy en el norte hasta la Pampa en el Sur, y desde entre Ríos y al noreste de Buenos Aires hasta la precordillera andina.²⁰

2.3. Compuestos antimicrobianos de origen vegetal

Un antimicrobiano es toda sustancia que, en bajas concentraciones, es capaz de actuar sobre los microorganismos, inhibiendo su crecimiento o destruyéndolos, sin provocar toxicidad. Las sustancias que solo detienen el crecimiento y multiplicación de microorganismos son conocidas como microbiostáticos (bacteriostáticos/fungistáticos), y las que los eliminan definitivamente son conocidas como microbicidas (bactericidas/fungicidas).²⁵ Estas sustancias pueden ser de origen microbiano, animal o vegetal. Las primeras incluyen compuestos producidos por microorganismos, las de origen animal incluyen proteínas enzimas líticas tales como lisozima, hidrolasas tales como lipasas o proteasas y polisacáridos como el quitosán, y las de origen vegetal incluyen compuestos como polifenoles provenientes de cortezas, tallos, hojas, flores,

ácidos orgánicos presentes en frutos y fitoalexinas producidas en plantas.²¹ Los antimicrobianos de origen vegetal provienen de plantas superiores, estos se encuentran presentes en sus tejidos en forma de precursores inactivos, pero cuando la planta sufre alguna herida o daño se activan por interacción con algunas enzimas, convirtiéndose en moléculas activas. Los isotiocianatos, la allicina, los fenoles y polifenoles como fenoles simples, derivados del ácido hidroxicinámico, flavonoides, taninos, antioxidantes fenólicos y parabenos son algunos compuestos antimicrobianos de origen vegetal. Estos actúan sobre las membranas plasmáticas de los microorganismos, tienen un importante efecto sobre las propiedades organolépticas del alimento, y en el caso de que sean antioxidantes, van a producir beneficios para la salud.²¹

2.4. Compuestos polifenólicos

Son compuestos químicos que se encuentran ampliamente distribuidos en las frutas y vegetales. Originan una de las clases más importantes de metabolitos secundarios en las plantas, en su mayoría derivados de la fenilalanina y en menor cantidad de la tirosina. Estos compuestos constituyen un amplio grupo de sustancias, presentes en las plantas con diferentes estructuras químicas y actividades metabólicas. Existen más de 8000 compuestos fenólicos identificados²². Son un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos y que ocurren frecuentemente como glucósidos, combinados con unidades de azúcar, son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua, pueden ser detectados por el intenso color verde, azul o negro, que producen cuando se les agrega cloruro férrico. Los polifenoles se pueden clasificar de muchas maneras debido a su diversidad estructural, según su estructura química tenemos dos grandes grupos²³.

a) No flavonoides

- **Fenoles no carboxílicos:** C6, C6-C1, C6-C3
- **Ácidos fenoles:** derivados del ácido benzoico C6-C1 y derivados del ácido cinámico C6-C3.

b) Flavonoides (C6-C3-C6)

Formados por 2 grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado.
Subgrupos:

- Antocianos.
- Flavonas, flavononas, y flavanoles.
- Flavanoles, taninos condensados y lignanos

2.4.1. Flavonoides

Según Wagner et al, el estudio de los flavonoides de los ejemplares analizados de *Ligaria cuneifolia*, independientemente del hospedante y del lugar geográfico, revelan la presencia de quercetina como el único flavonol. La quercetina se presenta libre y monoglicosidada con xilosa, ramnosa y arabinosa en el hidroxilo de la posición 3 del esqueleto del flavonol, además, se detectaron leucoantocianidinas, catequina-4-β-ol y proantocianidinas en distinto grado de polimerización: polímeros, oligómeros y dímeros que, por tratamiento ácido, producen cianidina.²³

Figura 1: Núcleo básico de un flavonoide²³

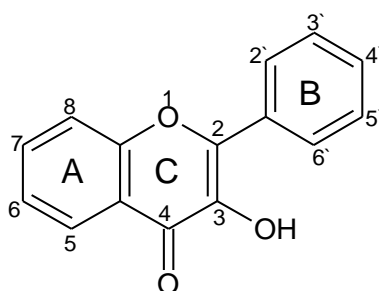


Figura 1: Núcleo básico de un flavonoide²³

En *Ligaria cuneifolia* la biosíntesis de estos compuestos puede seguir dos caminos: en un camino, la dihidroquercetina es oxidada por la enzima flavonol sintasa y genera quercetina; parte de este compuesto se acumula, pero gran parte sufre glicosidaciones en el OH del carbono 3 por la enzima UDP azúcar: flavonoide 3-O-glicosil transferasa. En el otro camino, el grupo ceto de la dihidroquercetina es reducido por acción de la enzima 3-hidroxiiflavanona-4-reductasa NADPH dependiente y origina leucocianidina. Este compuesto puede ser transformado en flavan-3-oles [(+) catequina o (-) epicatequina] por la 3,4-cis-diol-reductasa. Ambos, la leucocianidina y los flavan-3 oles pueden ser condensados y originar dímeros, oligómeros y polímeros por la actividad del complejo enzimático proantocianidinas sintasa. La vía biosintética de los flavonoides en *L. cuneifolia* es menos compleja si se compara con la de *V. album*, porque este presenta una diversificación en la biosíntesis, debido a la acción de la S-adenosil-L-metionina-X-O-metilasa (SAM) que genera flavonoides metilados, compuestos no detectados en la "tullma" o *Ligaria cuneifolia*²⁴.

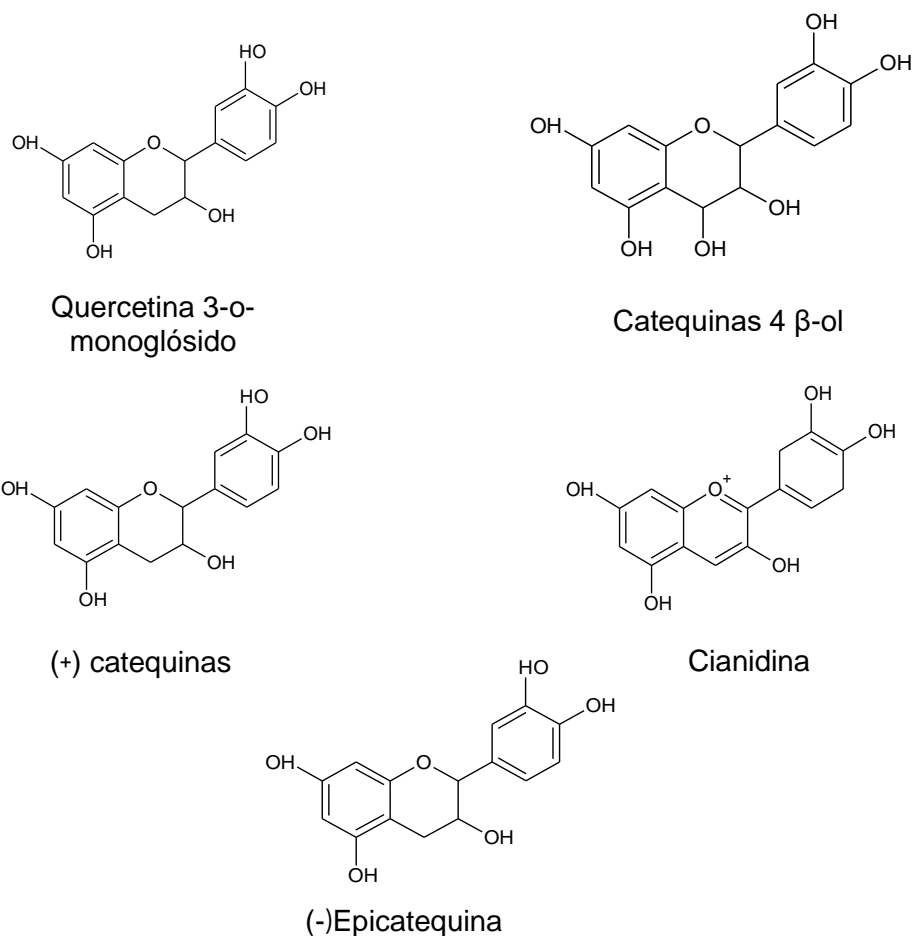


Figura 2. Formula de los flavonoides aislados de *Ligaria cuneifolia*²³

2.4.2. Taninos

Son compuestos fenólicos hidrosolubles, que presentan junto a las reacciones clásicas de los fenoles, la propiedad de precipitar alcaloides, gelatina y otras proteínas. Los taninos son compuestos poliméricos más complejos que se clasifican en hidrolizables y condensados. Los taninos hidrolizables están constituidos por unidades de ácido elágico, y pueden estar unidos a una molécula de glucosa. Los taninos hidrolizables están constituidos por unidades de ácido elágico, y pueden estar unidos a una molécula de glucosa. En cambio, los taninos condensados resultan de la condensación de unidades de flavan-3-oles, tales como la catequina que tienden a polimerizarse.²⁴ Los taninos condensados han sido más estudiados respecto a su actividad antioxidante, además de que se ha reportado que poseen beneficios a la salud por su actividad antibacteriana o bacteriostática.²⁴

2.5. Antimicrobiano

Molécula natural (producida por un organismo vivo, hongo o bacteria), sintética o

semisintético, capaz de inducir la muerte o la detención del crecimiento de bacterias, virus u hongos. Hoy en día no se utilizan moléculas de origen natural, por lo cual no se establece más la diferenciación con quimioterápicos, término usado para referirse a las moléculas de origen sintético y sus derivados. Utilizaremos el término antibiótico para referirnos al subgrupo de antimicrobianos con actividad antibacteriana. Los antibióticos constituyen un grupo heterogéneo de sustancias con diferente comportamiento farmacocinético y farmacodinámico, ejercen una acción específica sobre alguna estructura o función del microorganismo, tienen elevada potencia biológica actuando a bajas concentraciones y la toxicidad es selectiva, con una mínima toxicidad para las células de nuestro organismo. El objetivo de la antibiótico terapia es controlar y disminuir el número los microorganismos.²⁵

2.6. Ciprofloxacino

2.6.1. Mecanismo de acción

Las quinolonas son agentes totalmente sintéticos bactericidas que inhiben la síntesis del DNA bacteriano. Entran a la célula a través de porinas (canales de agua de la membrana), e interfieren con la acción de la DNA girasa bacteriana (topoisomerasa II) formando complejos enzimáticos con la misma. Esto ocurre en general para gérmenes Gram negativos. Para gérmenes Gram-positivos la acción es mayoritariamente a nivel de los complejos de la topoisomerasa tipo IV.²⁶

Para llegar al sitio blanco las quinolonas deben atravesar la membrana externa de las bacterias gram negativas a través de canales en la membrana llamados porina F. Una vez dentro de la bacteria las quinolonas ejercen su efecto bactericida impidiendo la síntesis de ADN al inhibir la acción de las enzimas ADN girasa y Topoisomerasa IV. Las moléculas de ADN están formadas por una doble cadena de nucleótidos, enrolladas una alrededor de la otra en forma helicoidal. En la naturaleza las moléculas de ADN son circulares y para formar estos círculos la doble hélice tiene que enrollarse en una nueva espiral (superhélice), de sentido contrario a las hélices primarias. Las cadenas de las moléculas de ADN deben separarse para poder replicarse o transcribirse. Para que las dos cadenas se puedan separar, deben desenrollarse y la superhélice debe enrollarse en sentido contrario. Para efectuar estos cambios es necesario efectuar cortes en las cadenas de nucleótidos y luego unirlos nuevamente. El ADN girasa es una enzima bacteriana dependiente de ATP, que cataliza la fractura y sellado de las cadenas de ADN. El ADN girasa de *Escherichia coli* consta de 4 subunidades, dos A (que

catalizan las reacciones de fractura y sellado) y dos B con actividad de ATPasa. Las quinolonas se unen a la subunidad A inhibiéndola y, por lo tanto, inhiben la síntesis de ADN de plásmidos y cromosomas. La inhibición de ADN cromosómico conduce a un efecto bactericida. Por la inhibición de ADN de plásmidos la resistencia codificada en estos no era esperable, pero ha sido observada. Se une a la subunidad B de la girasa y la inhibe, de una manera diferente a las quinolonas: estas inhiben las reacciones de fragmentación y sellado de las cadenas. La Topoisomerasa IV es la enzima encargada de separar las moléculas de ADN hijas que se producen como resultado de la replicación del ADN. Está compuesta por 4 subunidades: 2 subunidades C y 2 subunidades E. Para la mayoría de las bacterias Gram positivas, como el *Staphylococcus aureus*, la Topoisomerasa IV es el principal sitio blanco de las quinolonas, mientras que en las bacterias Gram negativas, como *Escherichia coli*, el ADN girasa es el principal sitio de acción. La acción del ADN girasa en células eucariotas se lleva a cabo por la enzima Topoisomerasa II (las células eucariotas carecen de ADN girasa). Las quinolonas inhiben a la Topoisomerasa II a concentraciones mucho mayores que las necesarias para inhibir al ADN girasa y a la topoisomerasa IV.²⁷

2.6.2. Efecto bactericida:

El efecto bactericida de las quinolonas se debe a la inhibición de la síntesis de ADN cromosómico. Este efecto requiere una concentración óptima de quinolonas, ya que se pierde con concentraciones muy bajas o muy altas de la droga. Las concentraciones altas inhiben la síntesis de ARN y, en consecuencia, la de proteínas. Por un mecanismo desconocido, la inhibición de la síntesis proteica inhibe el efecto bactericida. Por este motivo se produce una curva concentración / respuesta en forma de campana: el efecto bactericida aumenta hasta cierta concentración y luego comienza a descender. Es decir, las quinolonas son bactericidas a menores concentraciones (pero superiores a la CIM) y bacteriostáticas a concentraciones mucho mayor. Esto se observa claramente *in vitro*, pero su relevancia *in vivo* es desconocida. Las quinolonas tienen un efecto post antibiótico (como los aminoglucósidos) que parece ser relevante.²⁷

2.6.3. Espectro: Por ser las fluoroquinolonas más usadas se detalla a continuación el espectro de la ciprofloxacina.

- Gram (-) aerobias o enterobacterias: *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus mirabilis*. o *Neisseria gonorrhoeae* o *Pseudomona aureaginosa* o *Serratia sp.* o *Shigella sp.* o *Salmonella sp.*

- Gram (+) Aerobias o *Staphylococcus aureus* meticiclina sensible o *Streptococcus pyogenes* y enterococo: moderada susceptibilidad o *Listeria monocytogenes*
- Micobacterias: o *Mycobacterium tuberculosis*
- Otros microorganismos: o *Chlamidia trachomatis* o *Micoplasma*

No es activa contra bacterias anaerobias²⁸.

2.7. Vancomicina

2.7.1. Mecanismo de acción

Antibiótico glicopéptido con acción frente a la mayoría de bacterias gram positivas (aerobias y anaerobias). Es eficaz en el tratamiento de infecciones producidas por bacterias resistentes a los antibióticos beta-lactámicos. Vancomicina es el antibiótico de elección en el tratamiento de las infecciones graves por: *Staphylococcus aureus* meticilina resistente (MRSA), *Staphylococcus coagulasa* negativos, incluido *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) y Enterococo spp. resistentes a penicilinas.²⁹

La vancomicina inhibe la síntesis de la pared celular bacteriana uniéndose con alta afinidad a los terminales D-alanil-D-alanina de las unidades precursoras de la pared celular. Estas unidades están compuestas por ácido N-acetilmurámico, N-acetil glucosamina y un pentapéptido, y forman parte de la estructura del peptidoglucano de la pared celular. La vancomicina al igual que la Teicoplanina inhibe el proceso de la transglicosilación de estos precursores, impidiendo su unión a las capas de peptidoglucano, afectando la estabilidad de la pared bacteriana al igual que un betalactámico, pero en un sitio de acción distintos a estos. También inhibe la siguiente etapa de formación de la pared celular, la transpeptidación, por un efecto estérico.³⁰

2.7.2. Efecto bactericida:

La vancomicina produce un efecto bactericida sobre los gérmenes susceptibles, especialmente los cocos gram positivos, y puede ser bacteriostático frente a algunos tipos de entero cocos. Su acción se basa en que inhibe la síntesis de la pared bacteriana, en un paso anterior al que actúan los beta-lactámicos. El mecanismo específico de acción consiste en unirse a la porción terminal del disacárido pentapéptido, ubicado en la membrana citoplasmática, y de esa forma inhibir a la enzima involucrada en la síntesis de los peptidoglucanos de la pared celular. Como consecuencia, se debilita el peptidoglucano y la célula se vuelve susceptible a la lisis.²⁹

2.7.3. Espectro:

- Tiene un espectro de acción antibacteriana reducido y su efecto bactericida es lento, afectando sólo a las bacterias que se encuentran en división activa. Es especialmente eficaz frente a los estafilococos, incluyendo a las cepas resistentes a la meticilina, los estreptococos hemolíticos (α y β) y no hemolíticos, y los enterococos. En combinación con un aminoglucósido tiene efecto sinérgico contra los enterococos.
- Otros gérmenes susceptibles a la acción de la vancomicina son *Actinomyces*, *Clostridium*, incluyendo a *C. difficile*, *Corynebacterium*, *Bacillus anthracis*, *L. monocytogenes* *Propionibacterium* y *Peptostreptococcus*.³⁰

2.8. Microorganismo patógeno

2.8.1. *Escherichia coli*

En 1885 Theodore Escherichia, un pediatra alemán, describió por primera vez una bacteria encontrada en las heces de neonatos y niños sanos la cual denominó *Bacterium coli commune*. Posteriormente, en 1919 Castellani y Chalmers la denominaron *Escherichia coli* en su homenaje y desde entonces ha sido uno de los seres vivos más estudiados, de hecho, gran parte de los conocimientos sobre la biología celular fueron adquiridos en estudios con este microorganismo.³¹

Escherichia coli se encuentra en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y animales de sangre caliente y en el medio ambiente es posible encontrar una amplia variedad de cepas de *Escherichia coli* patógena que causan enfermedades transmitidas por los alimentos en los seres humanos. Algunos animales o especies de animales pueden ser portadores asintomáticos, las cepas de *Escherichia coli* son conocidas por su propensión al intercambio de material genético y su capacidad de adaptación a los cambios de su ambiente. A veces estas características favorecen la aparición de cepas con una mayor patogenicidad y capacidad de supervivencia.³³ Se pueden encontrar bacterias en el suelo, aguas termales, acidas, aguas residuales, en el fondo del mar y en el volcán, también es la especie microscópica que puede habitar en el cuerpo de plantas y animales y son usadas en experimentos de genética y biotecnología molecular³¹.

Tabla 2. Clasificación científica de la *Escherichia coli*

REINO	Bacteria
FILO	Proteobacteria
CLASE	Gammaproteobacteria
ORDEN	Enterobacteriales
FAMILIA	Enterobacteriaceae
GENERO	<i>Escherichia</i>
ESPECIE	<i>E. Coli</i>

Fuente: Manual Bergey 9ª edición julio de 2013

2.8.2. Características:

Según el Manual Bergey de bacteriología sistemática son bacterias Gram negativas cilíndricas con 1,1 – 1,5 µm de diámetro por 2,0 – 6,0 µm de largo que se disponen aisladas o en parejas. Conforme a la definición general de la familia enterobacteriaceae a la que pertenecen, son bacterias quimio heterótrofas facultativas teniendo los metabolismos fermentativo y respiratorio, no forman esporas, están desprovistas de oxidasa, producen catalasa y β-galactosidasa, pueden ser móviles por flagelos peritricos o inmóviles y normalmente reducen nitrato a nitrito. El género *Escherichia* comprende cinco especies distintas: *Escherichia coli*, *Escherichia hermanni*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia vulneris* y *Escherichia blattae*. La especie tipo es *Escherichia coli*, además es la única de las cinco con significación clínica. No obstante, *Escherichia hermanni*, y *Escherichia vulneris* han sido involucradas en infecciones de heridas, aunque de manera muy ocasional³¹.

2.8.3. Patogenia:

Existen numerosas cepas de *E. coli* que se pueden encontrar en patología humana y que presentan una virulencia marcada. Son conocidas como agentes responsables de gastroenteritis infantil, especialmente en países en vías de desarrollo, causando la muerte de cerca de un millón de niños cada año debido a deshidratación y a otras complicaciones. Esta familia de patógenos también incluye a *E. coli* O157:H7 que en USA causa al menos 20.000 casos de diarrea sanguinolenta y más de 200 muertes al año, debido a insuficiencia renal que ocurre especialmente en niños pequeños y ancianos.³²

Los principales patógenos intestinales, que se describen en función de los síntomas clínicos que generan y de los factores de patogenicidad que se expresan son los siguientes: *E. coli* enterotoxigénicas (ETEC), *E. coli* enteropatógenas

(EPEC), *E. coli enteroagregativas* (EAggEC), *E. coli enterohemorrágicas* (EHEC) y *E. coli enteroinvasivas* (EIEC)³².

2.8.4 Tratamiento

Tabla 3. Antibióticos y diámetros críticos para enterobacterias³³.

Antibacteriano	Contenido del disco	Diámetro en (mm)		
		R	I	S
Penicilinas				
Ampicilina	10 µg	£ 13	14 – 16	>17
Cefalosporinas				
Cefalotina	30 µg	£ 14	15 – 17	>18
Ceftriaxona	30 µg	£ 13	14 – 20	>21
Aminoglucósidos				
Gentamicina	10 µg	£ 12	13 – 14	>15
Amikacina	30 µg	£ 14	15 – 16	>17
Quinolonas				
Norfloxacino	10 µg	£ 12	13 – 16	>17
Ciprofloxacino	5 µg	£ 15	16 – 20	>21
Tetraciclina				
Tetraciclina	30 µg	£ 14	15 – 18	>19

2.8.5. *Staphylococcus aureus*

Los miembros del genero *Staphylococcus* son cocos gran positivos, anaerobios facultativos, inmóviles, que habitualmente forman agrupaciones irregulares. Son catalasa positiva, oxidasa negativa, fermentan la glucosa de forma anaerobia, poseen ácido teitoico en sus paredes celulares, un DNA con un contenido mucho más bajo en G+C (30 a 39%). Los estafilococos residen normalmente en la piel, las glándulas cutáneas y las mucosas de animales de sangre caliente.

La importancia de esta bacteria radica en su capacidad de producir enterotoxinas, las cuales son resistentes a las proteasas del intestino y termoestables. Al ser ingeridas producen gastroenteritis con náuseas, vómitos, diarreas y debilidad general, constituyendo una intoxicación, ya que no requiere una multiplicación de la bacteria.³⁴

Tabla 4. Clasificación científica de la *Staphylococcus aureus*

REINO	Bacteria
FILO	Firmicutes
CLASE	Cocci
ORDEN	Bacillales
GENERO	<i>Staphylococcus</i>
ESPECIE	<i>Staphylococcus aureus</i>

Fuente: Manual Bergey 9ª edición julio de 2013

2.8.6. Características:

Conocido comúnmente como *Staphylococcus aureus* o *estafilococo dorado*, es una bacteria anaerobia gram positivo productora de coagulasa y catalasa que se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo, estimándose que cada una de cada tres personas se hayan colonizadas, pero no infectadas por ella. Puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas, relativamente benignas tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía. Además, puede afectar al aparato gastrointestinal ya sea por presencia física o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria.³⁵

En la actualidad este microorganismo se rige como el principal causante de las infecciones nosocomiales. Esta situación se ve favorecida por el hecho de que esta especie habita tanto de las mucosas como en la piel de los seres humanos lo que permite que a través de las heridas quirúrgicas pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado o incluso con otro paciente. Son resistentes a la penicilina, siendo los antibióticos más eficaces para combatirlos los amino glucósidos, las cefalosporinas, la oxacilina o la nafcilina.³⁴

2.8.7. Patogenia:

Es un agente patogénico que actúa como un microorganismo saprofito, se encuentra en la piel del individuo sano, pero en ocasiones en que las defensas de la piel decaen puede causar enfermedad. El principal grupo de riesgo está constituido por pacientes hospitalizados o inmuno comprometidos. Cerca de 2 mil millones de personas han sido colonizadas mundialmente por este microorganismo. Causan infección de la piel, neumonía, sialadenitis (inflamación de una de las glándulas salivales), sepsis con o sin metástasis (osteítis, artritis, endocarditis, abscesos localizados), orzuelos; enfermedades por toxinas (síndrome de piel escaldada por estafilococo y gastroenteritis). Posee resistencia a través de una beta-lactamasa inducible que le confiere resistencia ante la penicilina, esta beta lactamasa esta codificada en un plásmido presente en más del 90% de las cepas.²⁶ La resistencia al óxido nítrico es una cualidad del *s. aureus*, capacidad que lo distingue de otros patógenos, incluyendo los comensales, *s. epidermidis* y *s. saprophyticus*. Esta resistencia se debe a que el microorganismo produce una enzima llamada lactato- deshidrogenasa, que la faculta para tolerar el estrés

causando por el radical del óxido nítrico. Esta observación se ha hecho tanto en especies resistentes a la meticiclina como en las que son susceptibles al antibiótico, así como en cepas hospitalarias como las adquiridas en la comunidad.³⁵

2.8.8. Tratamiento

Tabla 5. Antibióticos y diámetros críticos para *Staphylococcus spp.*³³

Antibacteriano	Contenido del disco	DIAMETRO EN mm		
		R	I	S
Penicilinas				
Penicilina	10 unidades	£ 28	-	>29
Oxacilina				
Estafilococos coagulasa negativos	1 µg	£ 17	11-12	>18
Glicopeptidos				
Vancomicina	30 µg	-	-	>15
Teicoplanina	30 µg	£ 10	11-13	>14
Aminoglucósidos				
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
Macrólidos				
Eritromicina	15 µg	£ 13	14-22	>23
Lincosamidas				
Clindamicina	2 µg	£ 14	15-20	>21
Otros				
Cloranfenicol	30 µg	£ 12	13-17	>18
Rifampicina	5 µg	£ 16	17-19	>20
Nitrofurantoína	300 µg	£ 14	15-16	>17
Trimetoprim/sulfametoxazol	1,25/23,75 µg	£ 10	11-15	>16

2.9. Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana

Los métodos para evaluar la actividad antibacteriana están clasificados, en tres grupos principales: métodos de difusión, métodos de dilución y bioautografía, un cuarto método es el análisis conductimétrico, el cual detecta el crecimiento microbiano como un cambio en la conductividad eléctrica. Las técnicas de difusión han sido ampliamente usadas para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana. En general se propone usar los métodos de difusión (en papel o en pozo) para estudiar compuestos polares.³⁶

Las metodologías aplicadas siempre consideran la estandarización de la concentración bacteriana a utilizar, con el ánimo de evitar un crecimiento

exhaustivo, que impida el análisis de los resultados o proporcione resultados errados lo cual puede variar significativamente la respuesta del extracto vegetal o aceite, indicando la necesidad de utilizar concentraciones mayores de éste para inhibir el crecimiento del microorganismo. La concentración de bacterias usada para el estudio de susceptibilidad en el laboratorio ha sido estandarizada en 5×10^5 unidades formadoras de colonias (ufc)/mL, lo cual equivale a un patrón de 0.5 en la escala de Mac Farland.³⁶

Los medios de cultivo más utilizados en dichas técnicas son el agar Müeller Hinton y agar tripticase soya, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras.³⁷

2.9.1. Métodos de difusión

La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer et al., (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos. El fundamento de esta determinación es establecer, en forma cuantitativa, el efecto de un conjunto de sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia.³⁹

Es necesario señalar que el tamaño del halo de inhibición es influenciado por varios factores, entre ellos; medio de cultivo en que se realiza la prueba, capacidad de difusión del compuesto, cantidad de inóculo, tiempo de generación del microorganismo, sensibilidad al antibiótico, y período de incubación. Cualquier variación de estos factores puede afectar el resultado de la prueba, sin embargo, al emplear un procedimiento estándar es posible obtener resultados confiables.³⁸

2.9.2. Métodos de dilución

Es una prueba cuantitativa en la que se emplean una técnica de dilución que consiste en inocular el organismo cuya sensibilidad a un antibiótico quiere probarse en tubos que contienen diluciones decrecientes de este último. Se incuban los tubos y posteriormente se observan para determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) de antibiótico necesario para evitar el crecimiento de la

bacteria. Para que el tratamiento antimicrobiano resulte efectivo, la concentración de antibiótico se puede obtenerse clínicamente a partir de los líquidos corporales tiene que ser superior a la CIM. Las pruebas de susceptibilidad cuantitativa son necesarias en los pacientes que no responden al tratamiento antimicrobiano o que han experimentado una recaída durante su aplicación. En algunos casos clínicos es necesario determinar la concentración bactericida mínima, es decir, la mínima concentración de antibiótico que puede matar al 100% de las bacterias, en vez de inhibir simplemente su crecimiento.³⁸

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del trabajo de investigación

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología del Centro de Investigación de Bioquímica Clínica y Molecular de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga.

3.2. Tipo de investigación

La tipología de la investigación corresponde, según el propósito de estudio, básico experimental porque se realizarán comparaciones de la variable dependiente (efecto antibacteriano) entre los grupos experimentales (1%; 2,5%; 5%; 10% y 15%) y de control (en el caso de *Escherichia coli* se usa el ciprofloxacino 30 µg y para *Staphylococcus aureus* se utilizó vancomicina 30 µg), según la cronología de las observaciones es prospectivo, porque en el registro de información se tomaron en cuenta los hechos a partir de la fecha de estudio y según el número de mediciones es longitudinal porque se estudiaron las variables a lo largo del tiempo durante el periodo de investigación.³⁹

3.3. Definición de la población y muestra

3.3.1. Población

Hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" que crece en el Distrito de Huamanguilla, provincia de Huanta, departamento de Ayacucho.

3.3.2. Muestra:

500 g de hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma", recolectados en el distrito de Huamanguilla en el mes de marzo del 2019, en la provincia de Huanta, departamento de Ayacucho.

3.4. Procedimiento metodológico

3.4.1. Recolección de la muestra

Se siguieron los procedimientos establecidos por Villar del Fresno.⁴⁰

Se recolectó aproximadamente 1 Kg de hojas frescas intactas de *Ligaria cuneifolia* “tullma” fueron secadas a temperatura ambiente, bajo sombra, sobre una base de papel periódico con recambio constante y remoción de la muestra para un secado uniforme, evitando el deterioro por la humedad.

3.4.2. Obtención del extracto hidroalcohólico

500 g de hojas desecadas se redujo el tamaño de partícula en una licuadora hasta obtener un polvo fino. Luego, la droga molida, fue sometida a extracción por maceración simple con etanol de 80°, cantidad suficiente para cubrir la muestra, durante 7 días en frasco de vidrio ámbar. Durante este proceso se agitó el frasco por 10 minutos dos veces al día. Luego se filtrará y la solución hidroalcohólica se concentrará por evaporación en baño maria, finalmente hasta sequedad en una estufa Memmert a una temperatura no mayor de 50°C. El extracto seco se almacenó en un envase de vidrio ámbar bajo refrigeración hasta su uso⁴⁰

3.4.3. Obtención de compuestos fenólicos

Para obtener los compuestos fenólicos se reconstituyó el extracto hidroalcohólico seco con agua destilada y se realizó el desengrasado con éter de petróleo hasta obtener una fracción desengrasada para eliminar grasas, ceras, pigmentos y otros metabolitos que posiblemente interfieran en la extracción de los compuestos fenólicos de interés. y luego se realizó una extracción líquido-líquido con acetato de etilo utilizando un embudo de separación para recuperar finalmente la fracción de acetato de etilo y se concentró a presión y temperatura reducidas en un rotavapor BUCHI-3000 para obtener finalmente la fracción de acetato de etilo⁴¹.

3.4.4. Evaluación de los parámetros fisicoquímicos del extracto

Una vez obtenido el extracto, se evaluó los parámetros fisicoquímicos que determinó la calidad de los mismos, que a continuación señalo:⁴²

a. Determinación de las características organolépticas

Se utilizó una cantidad suficiente de muestra en una luna de reloj, en un fondo blanco, para observar y determinar el color, de la misma manera para percibir y determinar el tipo de olor y finalmente observándose se determinó el aspecto de la muestra.⁴²

b. Determinación de la solubilidad

- Solubilidad en agua: En un tubo de ensayo se tomó un mililitro de agua destilada, luego se añadió 0,5 g de muestra, agitándose fuertemente, se observó si es soluble en agua.
- Solubilidad en alcohol: en un tubo de ensayo se colocó un mililitro de alcohol etílico de 70 °C, luego se añadió 0,5 g de muestra, agitándose fuertemente, se observó si es soluble en alcohol.⁴²

c. Determinación de pH

Para determinar el pH de la muestra se utilizó tiras reactivas de pH, colocándose una determinada cantidad de muestra en un vaso de precipitado, el cual previamente es diluido para introducir la tira reactiva, se dejó reposar por unos minutos al cabo del cual se retiró el papel y se comparó con el estándar de referencia para determinar su acidez o basicidad.⁴²

d. Determinación del contenido de humedad

Se pesó dos gramos del extracto de la muestra de ensayo con desviación permisible de 0,5 mg y se llevó a una cápsula de porcelana previamente tarada y desecada a 105 °C hasta masa constante, seguidamente se llevó a desecar la muestra a 105 °C durante 3 horas. Después de un tiempo se retiró la cápsula, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se pesó, colocándose nuevamente en la estufa durante 1 hora, volviéndose a pesar, hasta obtener una masa constante.⁴²

Cálculo:

$$\% H = \frac{M_2 - M_1}{M_2 - M} \times 100 (\%)$$

Donde:

Hg: Pérdida en peso por desecación (%)

M: masa de la cápsula vacía (g)

M₁: masa de la cápsula con la muestra de ensayo desecada (g)

M₂: masa de la cápsula con la muestra de ensayo (g)

100: factor matemático

e. Determinación de contenidos de Cenizas

Se empleó 2,5 g de droga triturada, exactamente pesada, en un crisol de porcelana previamente calibrado. Se calibró suavemente la porción de ensayo aumentando la temperatura hasta que se carbonizó en una cocina y posteriormente se incineró en un horno mufla a una temperatura de 750° C durante dos horas y media. Se enfrió en una desecadora y se pesó,

repitiéndose el proceso hasta obtener la masa constante los intervalos entre calentamiento y pesado fueron de 30 min. Al enfriar el residuo fue de color blanco.⁴²

Cálculo:

$$C = \frac{M_2 - M}{M_1 - M} \times 100 (\%)$$

Donde:

C: porcentaje de cenizas totales en base hidratada.

M: masa del crisol vacío (g)

M₁: masa del crisol con la porción de ensayo (g)

M₂: masa del crisol con la ceniza (g)

100: factor matemático

3.4.5. Identificación fitoquímica

Luego de obtenido la fracción de acetato de etilo, se procedió a la identificación cualitativa de los componentes presente en las hojas de *Ligaria cuneifolia* a través de reacciones de coloración o precipitación.⁴³

a. Prueba de identificación de flavonoides

- Se incorporó partículas de magnesio sobre la fracción de acetato de etilo contenida en un tubo de ensayo, luego se añadió gotas de ácido clorhídrico por las paredes del tubo. La aparición de tonos rojos se consideró como reacción positiva para flavonoides.⁴³

b. Prueba de identificación de taninos y fenoles

- Se le añadió unas gotas de cloruro férrico al 5%, sobre la fracción de acetato de etilo contenida en un tubo de ensayo. La aparición de tonos verde negruzcos se consideró como reacción positiva para compuestos fenólicos.⁴³

c. Cromatografía en capa fina (CCF)

Se realizó la cromatografía en capa fina con TLC silicagel 60F 20 x 20 cm y cromatografía a escala preparativa con cromatofolios de un milímetro de espesor.

⁴³

- La fracción de acetato de etilo se disolvió en 0,5 mL de metanol y mediante un capilar de vidrio, se aplicó en la parte inferior de la placa cromatográfica previamente activada (fase estacionaria)
- Se utilizó como sistema de solvente BAW (butanol, ácido acético, agua) en la proporción de 4:1:5

- Se colocó la placa de CCF en la cámara teniendo cuidado que el solvente no sobrepase a la muestra aplicada y dejándose que el líquido ascienda por capilaridad.
- Se sacó la placa de CCF de la cámara cromatográfica cuando el eluyente llegue a 2 cm de la parte superior de la placa (frente del solvente).
- Se dejó secar la placa de CCF al aire libre y se observó en la lámpara UV.
- Se observó la presencia de manchas.
- Cada banda será separada y reconstituida para su lectura espectrofotométrica UV-VIS.

3.4.6. Preparación del medio de cultivo

- Se pesó la cantidad de medio y se rehidrató con agua destilada en un matraz.
- Se autoclavó a 115°C
- Se sacó de la autoclave y se introdujo en la estufa por 24 h como control de que no haya crecimiento de microorganismos.
- Pasado el tiempo establecido, se distribuyó el medio en las placas de Petri dentro de una campana de flujo laminar y en las proximidades del mechero, flameando bien la boca del matraz para evitar las contaminaciones.
- Se dejó en el medio hasta que se solidifique.
- Se llevó al refrigerador por 24 horas.⁴⁴

3.4.7. Activación de las bacterias

Para activar las cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* se procedió a inocular en tubos de ensayo con 5 mL de caldo nutritivo, incubar a una temperatura de 37°C por 18 horas en diferentes tubos para cada cepa.⁴⁴

3.4.8. Preparación del inóculo

Con la cepa reactivada se procedió por separado a seleccionar 5 colonias en 5 mL de caldo nutritivo, se incubó a 37 °C hasta que la turbidez sea visible. Y se ajustó la turbidez visualmente al estándar 0,5 de la escala McFarland.⁴⁴

3.4.9. Determinación del halo de inhibición.

- Se colocó a cada una de las placas de Petri 20 mL de agar Müller Hinton previamente esterilizado y se dejó solidificar el medio.
- Se agregó una alícuota del inóculo con las cepas activas, y seguidamente con un asa de drigalsky se esparció el inóculo en forma o dirección (N) en el agar Müller Hinton con la finalidad de crecimiento homogéneo en toda la placa.
- Se dejó reposar por 5 minutos.

- Se colocó los discos impregnado con los extractos a diferentes concentraciones sobre la superficie del agar utilizando una pinza estéril y presionándolos suavemente sobre la superficie del agar
- De la misma manera se colocó los discos de antibióticos estándar (ciprofloxacino 30µg) para el caso de *E. coli* y (vancomicina 30 ug) para *S. aureus*.
- se dejó las placas 15 minutos a temperatura ambiente.
- Se incubó la placa en posición invertida a 37°C durante 24 horas.
- Pasado el tiempo establecido se midió los diámetros de la zona de inhibición con un vernier utilizando luz refleja sobre fondo negro.
- Se realizó ocho repeticiones por grupo. ⁴⁵

Interpretación: la formación del halo de inhibición significa sensibilidad (S) y la no formación resistencia (R)

3.4.10. Determinación del porcentaje de inhibición

Para el cálculo del porcentaje de inhibición se utilizó la siguiente formula: ⁴⁴

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Diámetro del halo de inhibición del extracto}}{\text{Diámetro del halo de inhibición del control positivo}} \times 100$$

3.4.11. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Se define como la cantidad o la concentración mínima de un agente químico antimicrobiano que se necesita para inhibir el crecimiento de un microorganismo. ⁴⁵

a. Procedimiento:

Para hallar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se preparó 15 tubos previamente esterilizados y rotulados del número 1 al 15:

- A partir del tubo N° 1 hasta el tubo N° 15, se agregó 1 mL de caldo nutritivo.
- Posteriormente se agregó 1mL de las concentraciones del extracto al tubo N° 1, a partir del cual se traspasó 1 mL al tubo N° 2 y así sucesivamente hasta el tubo N° 14, del tubo N° 14 se extrajo 1 mL y se descartó. El tubo N° 15 no recibirá el extracto, siendo éste el control.
- Luego se agregó 1 mL del inóculo de la cepa a todos los tubos y se llevó a incubar a 37°C por 24 horas.

Este procedimiento se realizó de la misma forma para ambas cepas en estudio.

b. Lectura

Se observó el crecimiento de la bacteria mediante la aparición de turbidez en el medio, o mediante cambio de color. Por lo que el punto final de la CMI, se define

a simple vista por la falta de turbidez en el caldo, para ello se compara el tubo con el control de crecimiento.⁴⁵

3.4.12. Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

Se define como la concentración más baja de antibacteriano que produce la muerte del 99,9% del microorganismo probado y solo permite la supervivencia del 0,1% de dicho microorganismo en cultivo.⁴⁵

a. Procedimiento:

Para la determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB), se procedió a partir de la CMI, realizándose de la siguiente manera:

- Una vez observada la turbidez a simple vista, se procedió a sembrar con la ayuda de un hisopo estéril, los caldos no turbios en las placas con agar Müller Hinton
- Posteriormente se incubó a 37°C por 24 horas.

b. Lectura

Se determinó la CMB verificando si hubo o no crecimiento de bacteria en las placas sembradas.⁴⁵

3.5. Diseño experimental

El diseño de investigación es básica experimental, con post prueba únicamente y de grupo control; de los cuales varios grupos recibirán el tratamiento experimental y uno de ellos no (grupo control positivo)⁴⁰

G_e	X	O_e
G_b	$-$	O_b
G_c	c	O_c

G_e : grupo experimental (extracto)

G_b : grupo blanco

G_c : grupo control (vancomicina) (ciprofloxacino)

O : Crecimiento bacteriano (halos de inhibición)

Para el presente trabajo se tomaron seis grupos y en cada grupo se realizó ocho repeticiones para ambas cepas tanto para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 35218.

Grupo I : Control positivo tratados con Ciprofloxacino y Vancomicina

Grupo II : Tratado con la muestra al 1% de concentración

Grupo III: Tratado con la muestra al 2,5% de concentración

Grupo IV: Tratado con la muestra al 5% de concentración

Grupo V : Tratado con la muestra al 10% de concentración

Grupo VI: Tratado con la muestra al 15% de concentración

El diseño experimental se resume a continuación

Tabla 6. Herramienta de recolección de datos de la investigación

Grupos	Grupo blanco	Grupo control (Vancomicina) (ciprofloxacino)	Grupo experimental Concentraciones				
			1%	2,5%	5%	10%	15%
Blanco	X						
Control		X					
Grupo I			X				
Grupo II				X			
Grupo III					X		
Grupo IV						X	
Grupo V							
Grupo VI							X

3.6. Análisis de datos

Los datos se procesaron utilizando el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences) fueron organizados en una matriz para calcular la media y la desviación estándar, y graficados en forma de gráficos, histogramas y barras. La diferencia significativa existente entre los tratamientos se evaluó mediante análisis de varianza (ANOVA) con una confianza del 95% y pruebas pos hoc HSD-Tukey.

IV. RESULTADOS

Tabla 7. Metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Ligaria cuneifolia* “tullma”, Ayacucho 2019.

Metabolitos secundarios	Ensayos	Resultados	Observaciones
Flavonoides	Shinoda	+++	Coloración rojiza
Triterpenos	Lieberman	+ +	Formación de precipitado naranja
Esteroides	Burchard	+	Formación de precipitado naranja
Fenoles y/o Taninos	Cloruro férrico	+++	Coloración verde oscuro
Alcaloides	Draguendorf	++	Formación de precipitado amarillo
Azúcares reductores	Benedict	+	Coloración pardo
Saponinas	Espuma	+++	Formación de espuma

Leyenda: (+): Escaso/Leve (++) : Moderado (+++): Abundante/Intenso

Tabla 8. Ensayos químicos de la fracción de acetato de etilo aislados de las hojas de *Ligaria cuneifolia* “tullma”, Ayacucho 2019.

Ensayo	Metabolitos secundarios	Resultados	Características
Cloruro férrico 5%	Fenoles y/o Taninos	+++	Coloración verde negruzco
Shinoda	Flavonoides	+++	Coloración rojiza

Leyenda: (+): Escaso/Leve (++) : Moderado (+++): Abundante/Intenso

Tabla 9. Parámetros químicos y fisicoquímicos de los compuestos fenólicos de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma", Ayacucho 2019.

Parámetros	Ensayos	Resultados
Organolépticos	Color	Naranja rojizo
	Olor	Sui géneris
	Sabor	Amargo
	Aspecto	Líquido homogéneo
Solubilidad	Agua	Soluble
	Etanol	Soluble
Humedad	Pérdida por desecación	11,62 %
Cenizas	Cenizas totales	4,5 %
pH	Determinación de acidez	4
Análisis espectral	Banda espectral	Picos
Muestra 1: fluorescencia celeste	1. 210 nm	2,147 A
	2. 270 nm	0,335 A
	3. 355 nm	0,129 A
Muestra 2: fluorescencia Roja	1. 205 nm	1,136 A
	2. 270 nm	0,189 A
	3. 355 nm	0,078 A

Tabla 10. Promedio de halos de inhibición (mm) de los compuestos fenólicos, aislado de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma", frente a *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Ayacucho 2019.

Concentración de los Compuestos Fenólicos	Promedio de Halos de Inhibición (mm)	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1%	11,88	12,25
2,5%	12,25	13,25
5%	12,75	15,00
10%	14,00	15,75
15%	14,50	15,88
Estándar: Ciprofloxacino / Vancomicina	21,00	16,00

Tabla 11. Porcentaje de halos de inhibición de los compuestos fenólicos, aislado de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma", frente a *Escherichia coli* ATCC 35218, y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, frente al estándar ciprofloxacino 30 µg y vancomicina 30 µg, Ayacucho 2019.

Concentración de los Compuestos Fenólicos	Porcentaje de Inhibición	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1%	56,57±3,97	76,56±4,41
2,5%	58,33±3,36	82,81±4,40
5%	60,71±4,36	98,43±3,23
10%	66,67±5,09	98,44±4,41
15%	69,05±5,69	99,25±5,21

Tabla 12. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida de los compuestos fenólicos (FAE) aislado de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" frente a *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Ayacucho 2019.

Numero de tubos	FAE 15% C mg/ml	Inhibición y Muerte de Bacterias	
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
1	75	-	-
2	37,50	-	-
3	18,750	-	-
4	9,375	CMB (**)	-
5	4,688	CMI (*)	CMB (**)
6	2,344	+	CMI (*)
7	1,172	+	+
8	0,586	+	+
9	0,293	+	+
10	0,146	+	+
11	0,073	+	+
12	0,037	+	+
13	0,018	+	+
14	0,0092	+	+

Leyenda: No hubo crecimiento (-) Hubo crecimiento (+) Concentración Mínima Inhibitoria CMI (*) Concentración Mínima Bactericida CMB (**)

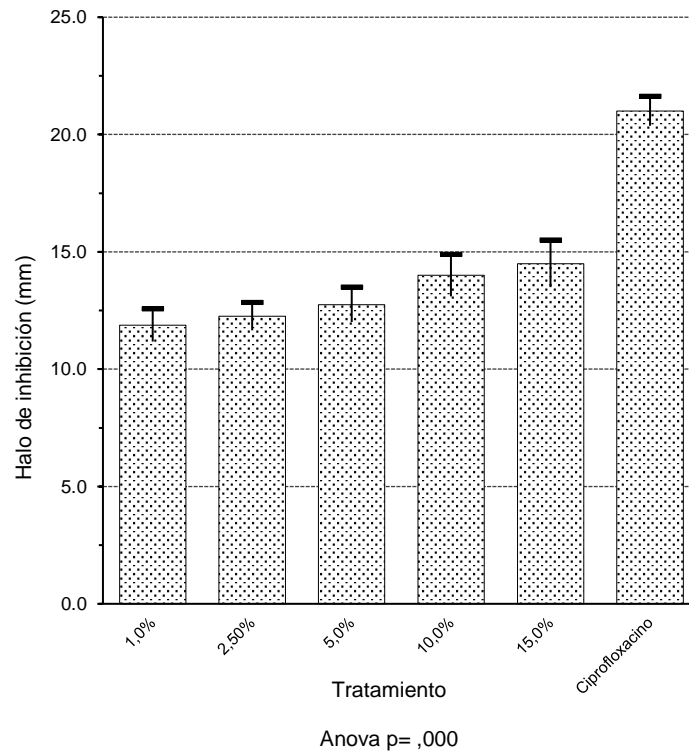


Figura 3. Variación de los halos de inhibición por efecto de las diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma", frente a *Escherichia coli* ATCC 35218, Ayacucho 2019.

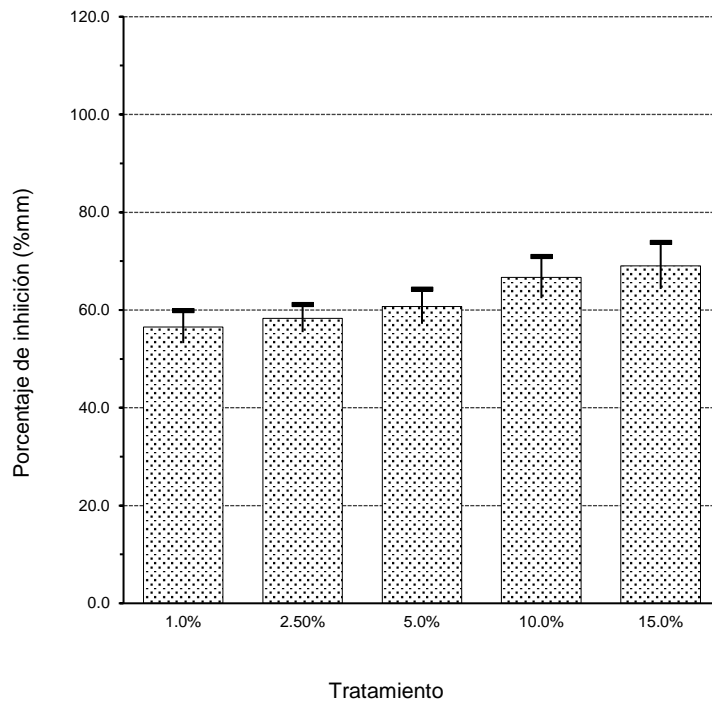


Figura 4. Porcentaje de inhibición de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" frente a *Escherichia coli* ATCC 35218 en comparación con el ciprofloxacino 30 µg, Ayacucho 2019.

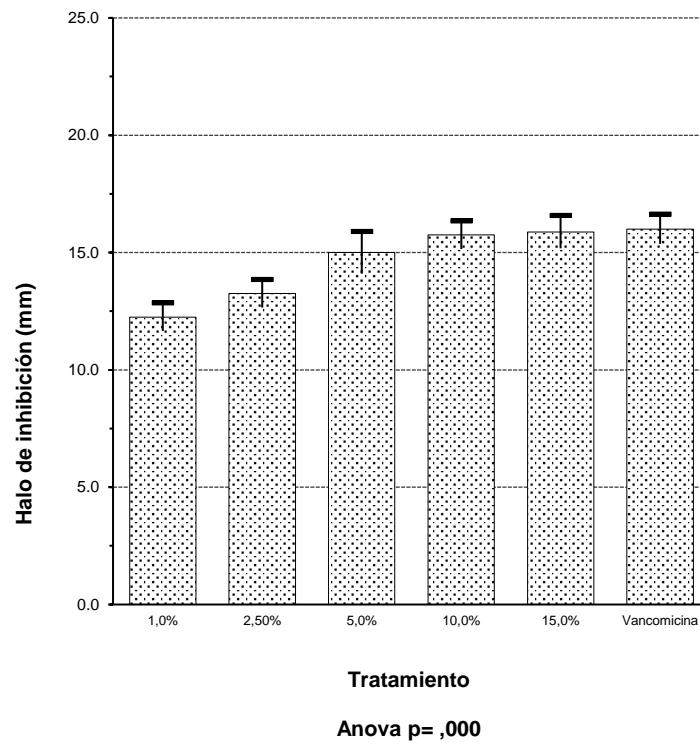


Figura 5. Variación de los halos de inhibición por efecto de las diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Ayacucho 2019.

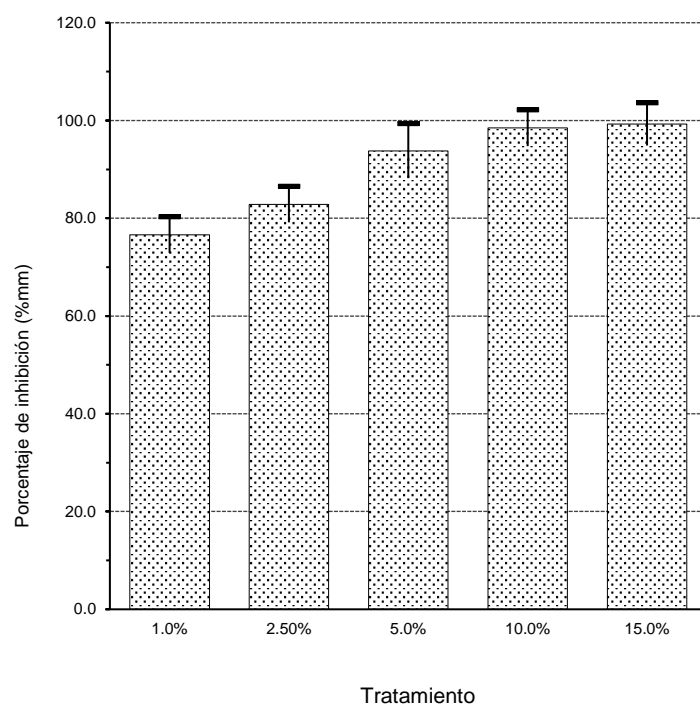


Figura 6. Porcentaje de inhibición de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 en comparación con la vancomicina 30 µg, Ayacucho 2019.

V. DISCUSIÓN

El presente estudio se llevó a cabo sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 35218, con la finalidad de comprobar la actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos aislado de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma". La actividad antibacteriana sobre estos microorganismos está representada por la presencia de los halos de inhibición para determinar resistencia o sensibilidad de la bacteria frente al extracto, mientras mayor sean los halos de inhibición mejor será la actividad antibacteriana; así mismo el método de dilución en caldos nos ayuda a determinar la concentración inhibitoria mínima y la concentración bactericida mínima, razón a ello se procedió a realizar su estudio. Para la extracción de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma", se sometió a un proceso de extracción hidroalcohólica, desengrasado con éter de petróleo y extracción de los fenoles y otros con acetato de etilo; como nos muestra Villar del Fresno⁴⁰ como un método de extracción. La tabla 7 y 8, muestra los resultados de la identificación de los diferentes metabolitos secundarios presentes tanto en el extracto etanólico y en la fracción de acetato de etilo de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma".

Del tamizaje fitoquímico de los compuestos fenólicos y etanólico de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma", se aprecia la presencia de taninos, flavonoides, saponinas, fenoles y triterpenos con mayor intensidad como se determinó en la tabla 7 y 8 y en el anexo 7; pero no la que se esperaba en el corrido cromatográfico como se observa, se logró determinar según la fluorescencia y longitud de onda la presencia de flavonoides(chalconas), flavonoles, flavonoles libres y glicosiladas en anexo 8 y 9; esto podría atribuirse al tipo de disolvente utilizado para la extracción ya que la polaridad del disolvente juega un papel clave en la mayor concentración de compuestos fenólicos, por lo general los disolventes menos polares se consideran adecuados para la extracción de fenoles lipófilos.

Con respecto a la determinación de los parámetros fisicoquímicos en la tabla 9, el extracto presenta 11,62% de humedad y 4,5% de cenizas. El extracto es de color naranja rojizo, de olor sui géneris, sabor amargo y de aspecto líquido homogéneo, soluble en agua y etanol contiene un pH de 4. Según Miranda y Cuellar⁴³ el porcentaje de humedad límite debe ser de 8 -14%, así como también están determinadas en las farmacopeas, para evitar el crecimiento microbiano; con respecto al límite de porcentaje de cenizas también hace referencia un valor límite < 5%; estos resultados podrían también explicarse por las diferentes condiciones de crecimiento de la planta, los factores ambientales, el estado de maduración y técnicas de procesamiento en la extracción de los metabolitos secundarios. Resultados similares fueron reportados por Pillaca¹⁸ quien determinó los principales metabolitos secundarios en el extracto hidroalcohólico de *Ligaria cuneifolia*, los cuales fueron flavonoides, taninos, fenoles, azúcares con mayor intensidad, y otros como alcaloides y Cardenólidos en menor intensidad. Así mismo Maderuelo⁹ y colaboradores en su estudio identificaron compuestos activos antibacterianos, estos fueron identificados como mono flavonoles, diglicósidos y ácido gálico.

Soberón et al¹⁰ en su estudio purificaron e identificaron cuatro glicos flavonoides como rutina, nicotiflorina, hiperosido e isoquercitrina y un inusual glicósido fenilbutanoide llamado tripodantósido; concluyen que los flavonoides presentan efecto bactericida. Así también Kolling¹¹ et al, realizaron estudios microbiológicos y cuantitativos de extractos de *Ligaria cuneifolia* y *Jodina rhombifolia* en la cual determinaron que la *Ligaria cuneifolia* es una planta rica en saponinas, taninos, resinas, cera, ácidos orgánicos, oxidasas, etc. Ricco et al¹³ en su estudio realizaron análisis de polifenoles; para ello se realizó pruebas cromatográficas en capa delgada de tipo monodimensional, observándose la presencia de flavonoides, derivados hidroxicinámicos y proantocianidinas en los extractos de hojas, tallos primarios, tallos secundarios y flores; en cuanto al análisis cuantitativo observaron altos valores de flavonoides en hojas 2,14 mg.eq de rutina por gramo de material seco y de proantocianidinas en flores 7,52 mg.eq de catequina por gramo de material seco. Y finalmente Varela et al¹⁵ realizaron análisis de los polifenoles mostrando que el único flavonol detectado fue la quercetina libre y glicosilada. Así también en la mayoría de los ejemplares analizados se detectó la presencia de tiramina.

Con respecto a la determinación de actividad antibacteriana, el uso de la técnica de difusión de disco Kirby Bauer permite un análisis preliminar eficaz para demostrar efectos antibacterianos (sensible o resistente) de las bacterias frente al extracto de la planta y los métodos de microdilución en caldos para determinar la CIM y CBM de los compuestos fenólicos aislado de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma"; así se muestra en la tabla 10 el promedio de los halos de inhibición frente a las cepas en estudio mostrando que el extracto al 15%, presenta mayor halo de inhibición a diferencia de las otras concentraciones ensayadas que muestran menor halo de inhibición ; también se puede afirmar que los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" presenta mayor efecto frente a bacterias gram (+) como se muestra en la tabla 11 con un 99,25% de inhibición frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y con menor porcentaje de inhibición frente a *Escherichia coli* ATCC 35218 con 69,05%. Maderuelo et al⁹, en su estudio determinaron que los extractos metanólicos y acuosos de *Ligaria cuneifolia* presentan actividad inhibitoria sobre bacterias fitopatógenas, utilizaron métodos de bioautografía y microdilución en el caso del extracto metanólico resulto la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 2,5 a 156 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ y para el extracto acuoso de 5 mg/mL^{-1} ; en el caso de *Escherichia coli* presento CIM de 156 mg/mL^{-1} y frente a *Staphylococcus aureus* la CIM fue de 78 mg/mL^{-1} ;de la misma manera se determinó la concentración bactericida mínima (CBM) la cual fue de 312 mg/mL^{-1} . Por lo expuesto, los compuestos aislados de *Ligaria cuneifolia* poseen actividad inhibitoria sobre cepas fitopatógenas, los cuales podrían utilizarse como una fuente eficaz de metabolitos contra las enfermedades bacterianas en vegetales. Estos datos asemejados al obtenido apoyan el uso etnomedicinal de las hojas de *Ligaria cuneifolia* para el tratamiento de las infecciones y de otros síntomas cuya etiología son causados por bacterias.

Soberon¹⁰ en su estudio concluye que los extractos metanólicos y la infusión de *Ligaria cuneifolia* inhiben significativamente el crecimiento de las bacterias fitopatógenas contra *Xanthomonas campestris* resultando la concentración inhibitoria mínima (CIM) de 0,0195mg/ml , frente a *Agrobacterium tumefaciens* con (CIM) de 0,0195mg/ml y Concentración bactericida mínima (CBM) de 0,078mg/ml, así mismo frente a *Pseudomonas corrugata* con (CIM) 0,00975mg/m y (CBM) de 0,078mg/ml, *Pseudomonas syringae* con (CIM) de 0,002437mg/ml y (CBM) 0,078mg/ml y por ultimo frente a *Erwinia carotovora var* con (CIM) de 0,195mg/ml y (CBM) 0,078mg/ml. También utilizaron cepas estándar de *Escherichia coli* ATCC

25922 la cual resulto CIM de 0,156mg/ml y frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 la CBM fue de 0,312mg/ml con el uso del método de microdilución.

A partir de los diferentes resultados se podría afirmar que la actividad antibacteriana que muestran los diversos extractos se podrían atribuir a la presencia de metabolitos secundarios como taninos y flavonoides ya que están fueron halladas en la mayoría de los estudios realizados.

La variabilidad de la actividad antibacteriana de los extractos de *Ligaria cuneifolia* "tullma" podría ser debido a la naturaleza de las sustancias antimicrobianas presentes en los extractos y de su mecanismo de acción sobre el microorganismo ensayado. La actividad antibacteriana de los compuestos fenólicos, taninos, terpenos y flavonoides están documentados en la literatura científica.²² El mecanismo responsable del efecto antibacteriano de los fenoles puede estar relacionado con procesos de inhibición enzimática por parte de los compuestos oxidados posiblemente a través de reacciones con grupos sulfhídricos o a través de interacciones inespecíficas con las proteínas. La presencia de hidroxilos en los anillos les confiere a los flavonoides mayor actividad contra bacterias Gram positivas al inhibir la síntesis de ADN, en contraste con las Gram negativas, sobre las que la actividad es menor. Así mismo la actividad de los taninos es debida probablemente, a su capacidad para formar complejos con proteínas solubles extracelulares y a nivel de la pared celular de la bacteria.²⁴

Los espectros de la actividad antimicrobiana exhibida por el extracto se podrían atribuir a la presencia de estos fito constituyentes, lo que podría significar que *Ligaria cuneifolia* "tullma", representa una fuente potencial de agentes terapéuticos. Es de esperar que el estándar de ciprofloxacino, por ser un fármaco de síntesis con un espectro de acción definido, muestre los resultados de inhibición esperado, es por ello que la eficacia antimicrobiana es superior a las concentraciones del extracto fenólico aislado de *Ligaria cuneifolia* "tullma", esto se muestra en la tabla 10 y 11; gráfico 1 y 2. En el caso de los extractos frente a *Staphylococcus aureus* presentan halos de inhibición similares a la del estándar (vancomicina) en algunos casos muestra igual halo de inhibición esto en la tabla 10 y 11 gráfico 3 y 4 se puede observar el porcentaje de halos de inhibición y la variación de inhibición de las diferentes concentraciones frente a la cepa en estudio, por lo que se puede decir que todas las concentraciones en estudio muestran cierta actividad inhibitoria sobre las cepas empleadas.

En general las plantas sintetizan sustancias químicas como factor defensivo, tal es el caso de los flavonoides que son conocidos por ser sintetizados en respuesta al ataque microbiano.²⁴ En efecto se puede apreciar en el gráfico 2 y 4 que los compuestos fenólicos aislado de las hojas muestra un porcentaje de inhibición de 99,25% frente a *Staphylococcus aureus* y 66,05% frente a *Escherichia coli* a una concentración de 15%.

Como se ha determinado los compuestos fenólicos aislado de la hoja muestra mayor porcentaje de inhibición ya que es el órgano donde se concentra la mayor parte de metabolitos secundarios activos con actividad antibacteriana seguida de las flores y corteza. En este sentido, podría afirmarse, que se trata de los compuestos fenólicos presentes en las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma". A pesar de la fuerte resistencia intrínseca de estos microorganismos a la mayoría de agentes antimicrobianos; es importante la inhibición lograda con *Ligaria cuneifolia* "tullma". Dado que frente a *Escherichia coli* la CMI de 4,688 mg/ml y CMB de 9,375 mg/ml y frente a *Staphylococcus aureus* la CMI fue de 2,344 mg/ml y CMB de 4,688 mg/ml tal como se determinó en la tabla 12. Esto indica de que los fitoconstituyentes de las hojas de *Ligaria cuneifolia* tiene un alto potencial terapéutico que incluso trabajos científicos preliminares realizados en el VIII congreso del medio ambiente realizado por la asociación de Universidades grupo Montevideo en Argentina reporta que el extracto metanólico de las hojas de *Ligaria cuneifolia* inhibió el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* ATCC 32218¹⁰. De igual manera Maderuelo et al⁹, en los extractos diclorometanico, infusión y metanólico de las hojas de *Ligaria cuneifolia* inhibió el crecimiento de 5 cepas fitopatógenas así mismo en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; y por ello afirmar con exactitud que el metabolito secundario con actividad antibacteriana resultaría impreciso ya que, como se dijo, todos poseen cierta capacidad de actuar frente a muchos microorganismos y se han postulado múltiples formas de actuación de estos metabolitos sobre los microorganismos que conducen a la muerte de la bacterias.

Según la prueba de normalidad con un nivel de confianza de 95%, los datos presentan una distribución normal ($p > 0,05$) para ambas cepas en estudio. Por lo tanto, se procede a la prueba de Anova de un factor, lo cual demostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) por lo tanto existe una variación de medias que nos indica realizar las comparaciones múltiples (prueba de Tukey). La prueba de Tukey en el caso de *Escherichia coli* ATCC 35218, demuestra

diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre todos los extractos y el fármaco control (ciprofloxacino 30ug) por lo tanto se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna en el que las medias de los extractos no son similares a la media del estándar. En el caso de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 no muestra diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los extractos 5%, 10%, 15% y el fármaco control (vancomicina 30ug) por lo tanto se acepta la hipótesis nula y se rechaza la hipótesis alterna, en la que las medias de los extractos son similares a la media del estándar. A partir de ello se puede concluir que los compuestos fenólicos de *Ligaria cuneifolia* "tullma" presenta mayor actividad frente a bacterias gram positiva.

VI. CONCLUSIONES

1. Los compuestos fenólicos de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" tienen actividad antibacteriana a una concentración del 15 % frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Escherichia coli* ATCC 35218.
2. Los metabolitos secundarios de la fracción de acetato de etilo aislado de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" fueron: fenoles y flavonoides.
3. Los parámetros fisicoquímicos de los compuestos fenólicos de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" resultaron 11,62 % de humedad; 4,5 % de ceniza. El extracto fue de color naranja rojizo, olor sui géneris, sabor amargo, aspecto homogéneo, soluble en agua y etanol y pH 4.
4. La Concentración mínima inhibitoria (CMI) de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" frente a *Escherichia coli* resultó 4,688 mg/mL y en el caso de *Staphylococcus aureus* fue de 2,344 mg/mL.
5. La concentración mínima bactericida (CMB) de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" frente a *Escherichia coli* resultó de 9,375mg/mL y en el caso de *Staphylococcus aureus* fue de 4,688 mg/mL.

VII. RECOMENDACIONES

1. Ampliar la investigación de la planta en estudio utilizando extractos con otros solventes, así mismo utilizando otros órganos de esta planta.
2. Continuar con las investigaciones farmacológicas del género *Ligaria* frente a otros microorganismos.
3. El alto porcentaje de residuos son principalmente desechados y no tienen una aplicabilidad a nivel nacional; sin embargo, estos podrían contener compuestos bioactivos con propiedades antioxidantes y antimicrobianas.
4. Seguir investigando plantas medicinales con actividad antibacteriana para lograr alternativas del tratamiento de infecciones bacterianas.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. OMS, Informe resistencia bacteriana en el Mundo 2019: forjemos el futuro. Ginebra, Organización Mundial de la Salud.
2. Ryan K, George C, Microbiología medica una introducción a las enfermedades infecciosas IV ed. Editorial McGRAW – HILL. México 2004.
3. Quero S, Parraga N, Garcia M, Sabria M. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. G model of Pharmacy. 2015; 23(4): 1 – 8.
4. Cuéllar P.L; De La Rosa Rosales C; Florentino Aquino R. Eficacia de un programa educativo para la prevención y el control de infecciones intrahospitalarias en el Instituto Especializado de Enfermedades Neoplásicas, Lima, Perú. Rev. Perú Med Exp Salud Pública. (2004). V.20 N. I. pág. 37-43
5. Cisneros J, Palomino J y Pachon J. La interconsulta de enfermedades infecciosas es una actividad clave para los servicios y unidades de enfermedades infecciosas y para el hospital. Enferm Infecc. Microbiol Clin. 2014; 32(10): 671 -675. Disponible en: www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica.
6. Carhuapoma M, Angulo P, Plantas medicinales en atención primaria de salud agroindustria, fitoquímica y ecoturismo: perspectivas de desarrollo de la región los libertadores Wari. Agencia cooperación; Perú 1999.
7. Mercado G, Carrillo L, Medrano A, López J, Álvarez E, Compuestos polifenólicos y capacidad antioxidante de especias típicas consumidas en México, Nutr Hosp;28(1):36-46, México 2013.
8. Varela, B.G.; Fernández, T.; Taira, C.; Cerdá Zolezzi, P.; Ricco, R.A.; Caldas López, E.; Álvarez, É.; Gurni, A.A.; Hajos, S.; Wagner, M.L. (2000). “El muérdago criollo, *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. -Loranthaceae-. Desde el uso popular hacia el estudio de los efectos farmacológicos”. *Dominguezia* 17 (1): 31-50.
9. Dip Maderuelo M. Rocío, Jiménez M, Vattuone M, Soberón R. Antibacterial activities of *Ligaria cuneifolia* and *Jodina rhombifolia* leaf extracts against phytopathogenic and clinical bacteria. en: *el Sevier. Journal of Bioscience and Bioengineering*. 118 (5): 599-605. Argentina 2014.
10. Soberón JR, Sgariglia MA, Sampietro DA, Quiroga EN, Sierra MG, Vattuone MA. Purification and identification of antibacterial phenolics from *Tripodanthus acutifolius* leaves. *J Appl Microbiol*. 2010;108(5):1757-68.

11. Kolling A, M Rocío, Irupé A, Marisol C. Estudios microbiológicos y de cuantitativos de extractos de *ligaria cuneifolia* y *Jodina rhombifolia*. 2010;10.
12. Ricco V. Maria, Bari L. Martín, Ricco A. Rafael, Wagner L. Marcelo. Análisis de polifenoles e iniciación de cultivos in vitro de *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh (Loranthaceae) de ejemplares provenientes de la localidad La Población, provincia de Córdoba, Argentina.2018;6:53-64.
13. Ferrero M, Wagner M, Varela B, Ricco R, Hajos S, Gurni A. "Study of an Argentine mistletoe, the hemiparasite *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae)". *Journal of ethnopharmacology* 62: 25-34, Argentina 2010
14. Varela G. Beatriz, Zolezzi C. Paula, Gurni A. Alberto, Wagner L. Marcelo. López C. Eloisi. El "muérdago criollo", *ligaria cuneifolia* (R. ET P.) Tiegh. – Loranthaceae. Desde el uso popular hacia el estudio de los efectos farmacológicos. Argentina.2000
15. Giménez C. Maria, Hidalgo J. Melisa, Petenatti M, Marchevsk J, Pellerano G. Caracterización multivariable de "muérdago criollo", *Ligaria cuneifolia* (Loranthaceae) de acuerdo a su composición minera. 2012 *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas* 11 (3): 233 - 240. Disponible en: www.blacpma.usach.cl.
16. Roque A, Mirtha. Frecuencia de *Escherichia coli* diarreogénicas aisladas de niños en un hospital pediátrico en Lima - Perú. *Ciencia e Investigación* 28 jul. 2018. ISSN 1609-9044. Disponible en: revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/farma/article/view/14807.
17. Harris LG, Foster SJ, Richards RG. An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relations to adhesión to biomaterials: review. *Eur Cells Mater.* 2002 jul-dec; 4(2): 39-60.
18. Pillaca Gómez, Karol tesis para obtener título profesional de: Químico Farmacéutica. Efecto cicatrizante de las flores y hojas *Ligaria cuneifolia* "tullma", Ayacucho 2008.
19. Abbiatti, D. (1946). "Las Lorantáceas Argentinas". *Revista del Museo de La Plata* (nueva serie) 7 (sección botánica): 1-110.
20. Fernández, T.; Wagner, M.; Varela, B., Ricco, R.; Hajos, S.; Gurni, A. and Álvarez, E. (1998). "Study of an Argentine Mistletoe, the hemiparasite *Ligaria cuneifolia* (R. et P.) Tiegh. (Loranthaceae)". *Journal of Ethnopharmacology* 62: 25-34.

21. Ramírez L, Castaño D, Metodologías para evaluar In vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal, Universidad de Pereira, Scientia et Technica Año XV, No 42, Brasil 2009. Disponible en: [www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf] 16. Peredo H, Palou E.
22. Gimeno E. Compuestos fenólicos. Un análisis de sus beneficios para la salud. OFFARM. Ámbito Farmacéutico nutrición. Disponible en: <http://www.elsevier.es>.
23. Wagner, M.L. (1993). Estudios fitoquímicos Comparativos de los Flavonoides de Loranthaceae de la Flora Argentina. Relación con el Muérdago Europeo. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires
24. Dobrecky, C.B.; Moreno, E.; Garcés, M.; Lucangioli, S.; Ricco, R.A.; Evelson, P.; Wagner, M.L. (2014). "Contenido de polifenoles en "Contenido de polifenoles en Ligaria cuneifolia y su relación con la capacidad antioxidante". Dominguezia 30 (2): 35-39.
25. Rodríguez S, Elvia N, Uso de Agentes Antimicrobianos Naturales en la conservación de Frutas y Hortalizas, Ra Ximhai, vol. 7, México 2011, pp. 153-170.
26. Martínez J, Sánchez J Mecanismo de acción de los antibióticos, España 2007
27. Ventriglia M, Vives E, Medvedovsky D, Rothlin R, farmacología II Quinolonas, 2003. Fecha de acceso: el 12 de abril del 2016.
28. Calvo J, Martínez L, Mecanismos de acción de los antimicrobianos, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España 2009, Disponible en: el 24 de abril 2016 [<http://zl.elsevier.>]
29. Smith TL, Pearson ML, Wilcox KR, et al. Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. N Eng J Med 1999; 340:493-501.
30. Briceland, L. Vancomycin Duration of Treatment. Medscape, Ask the Experts about Pharmacotherapy 2. Disponible en : <http://www.medscape.com>
31. Plino L, Formación de Biopelículas por *Escherichia coli* y su correlación con factores de virulencia. Prevención y actividad de antimicrobianos frente a organismos planctónicos y asociados a biopelículas, España 2010. Disponible en: [<http://eprints.ucm.es/9780/1/T31422.pdf>] fecha de acceso: el 12 de abril de 2016
32. MedlinePlus. Escherichia coli, características generales, taxonomía y cepas virulentas. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/ecoliinfections.html>. Fecha de acceso: marzo 2016

33. MINSA, Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de discos difusión INS, Perú 2008. Disponible en: el 12 de agosto del 2016. Disponible en: www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/manua_l%20sensibilidad.pdf
34. Concepción García L. Actividad antimicrobiana de extractos vegetales en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* con resistencia múltiple. Tesis de Doctorado. Torreón. Coahuila. México. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narra. 2006.
35. Bermejo V, Spadaccini L, Elbert GR, Duarte AIE, Erbin M, Cahn P. Prevalencia de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina en infecciones de piel y partes blandas en pacientes ambulatorios. Medicina (B. Aires). 2012 citado 20 jul 2015;72(4).
36. Ramírez L, Castaño D, Metodologías para evaluar In vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal, Universidad de Pereira, Scientia et Technica Año XV, No 42, Brasil 2009. Disponible en [www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf]
37. Shiva Ramayoni C. Estudio de la Actividad Antimicrobiana de extractos naturales y ácidos orgánicos. Posible alternativa a los antibióticos promotores de crecimiento. Tesis de Doctorado. Barcelona, España. Universitat Autònoma de Barcelona. 2007. 13pp.
38. Granados R, Villaverde P. Microbiología: bacteriología, medios de cultivo y pruebas bioquímicas. Micología general, parasitología general. II ed. Thomson editores, España 2000.
39. Hernández Sampieri, metodología de la investigación 6ta edición. Editorial McGraw-Hill interamericana. México 2004.
40. Villar del Fresno A. Farmacognosia General. Madrid- España; Editorial síntesis S.A; 1999. Disponible en: <https://www.lineasalud.com/que-es/maceracion>.
41. Lock O, investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales II edición Pontificia Universidad católica del Perú 1994
42. Evans W. Farmacognosia. 4a edición. México: Editorial Interamericana McGraw Hill.; 1991.
43. Miranda M, Cuellar A. Manual de Prácticas de Laboratorio, Farmacognosia y Productos Naturales. La Habana: Instituto de Farmacia y Alimentos; 2000.
44. Picazo J. Procedimientos en Microbiología Clínica. Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Recomendaciones de la

Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica.
España. 2000.

45. Surjeet k, Lincy J, Mathew G, y Vivek B. antimicrobial activity of methanolic extract of *Rumex nepalensis* leaves. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 2011. Disponible en: <http://www.ijppsjournal.com/Vol3Suppl4/2423.pdf>.

ANEXOS

Anexo 1. Constancia de identificación botánico de *Ligaria cuneifolia* "tullma", Ayacucho 2019.

CONSTANCIA

LA BIÓLOGA LAURA AUCASIME MEDINA ESPECIALISTA EN TAXONOMÍA Y SISTEMÁTICA DE PLANTAS DEJA CONSTANCIA:

Que, la Bachiller en Farmacia y Bioquímica, Srta. Sandrin Deysi, CUADROS LAGOS, ha solicitado la identificación de una muestra vegetal para trabajo de tesis.

Dicha muestra ha sido estudiada y determinada según el Sistema de Clasificación de Cronquist. A. 1988, siendo su taxonomía el siguiente:

DIVISIÓN	:	MAGNOLIOPHYTA
CLASE	:	MAGNOLIOPSIDA
SUB CLASE	:	ROSIDAE
ORDEN	:	SANTALES
FAMILIA	:	LORANTHACEAE
GENERO	:	Ligaria
ESPECIE	:	<i>Ligaria cuneifolia</i> (R. & P.) Tiegh..
N.V.	:	"tullma"

Se expide la certificación correspondiente a solicitud de la interesada para los fines que estime conveniente.

Ayacucho, 4 de Febrero del 2019



LAURA AUCASIME MEDINA
BIÓLOGA
Reg. C.B.P. N° 583 C.R. - XIII

Anexo 2. Certificado de identificación de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Ayacucho 2019



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0360 Lot Number: 360-396** Reference Number: ATCC® 25923™* Purity: Pure Passage from Reference: 3	Expiration Date: 2020/6/30 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2018/7/27
---	---

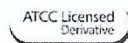
Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached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

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

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

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



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

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



Anexo 3. Certificado de identificación de *Escherichia coli* ATCC 35218, Ayacucho 2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL DE HUAMANGA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ÁREA ACADÉMICA DE MICROBIOLOGÍA


El jefe del Laboratorio de Bacteriología, del Área Académica de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga:

CERTIFICA:

Que, el Laboratorio de Bacteriología ha proporcionado la cepa de *Escherichia coli* ATCC 35218 a la Srta. Sandrin Deysi CUADROS LAGOS, estudiante de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica para que ejecute la tesis titulada: "Actividad antibacteriana de compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma", frente a *Escherichia coli* ATCC 35218 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Ayacucho 2019".

Se expide la presente certificación a solicitud de la interesada para los fines que crea conveniente.

Ayacucho, 24 de Julio de 2019

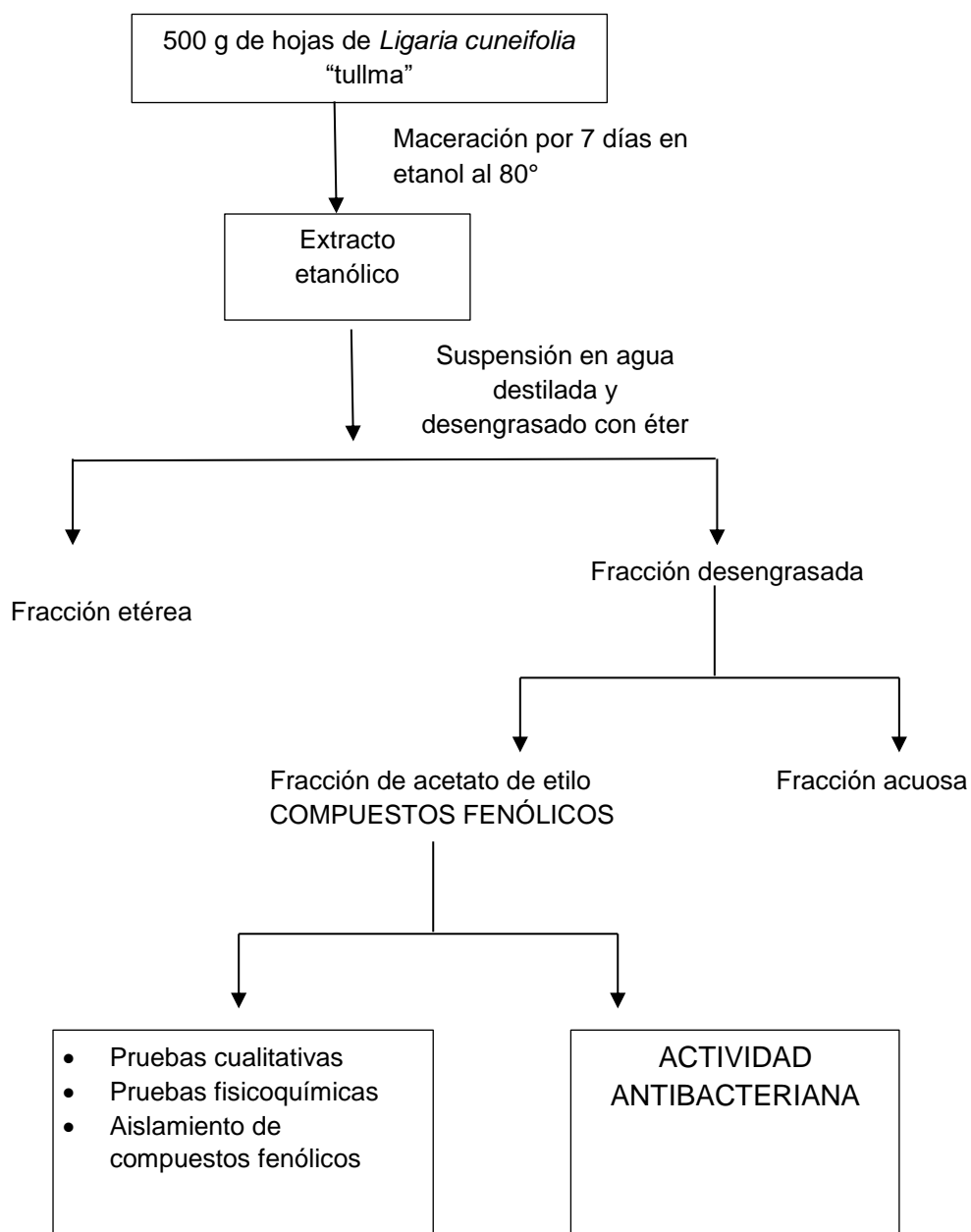


Dr. Victor L. Cárdenas López
Área Académica de Microbiología
Laboratorio de Bacteriología

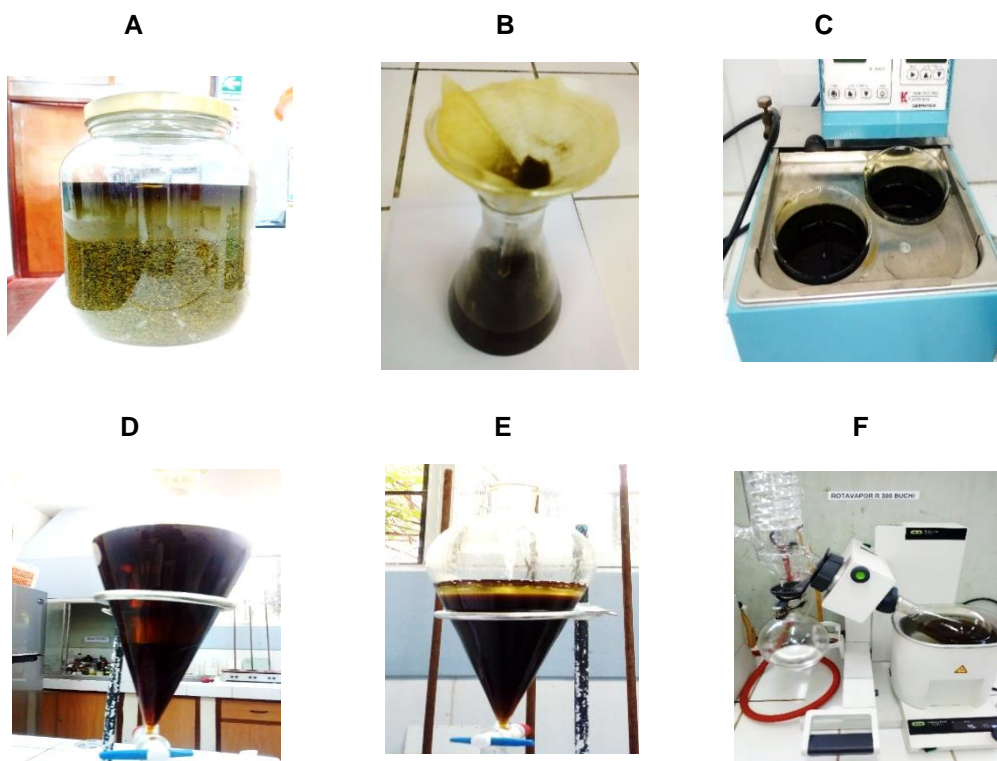
Anexo 4. Fotografía de las muestras de *Ligaria cuneifolia* “tullma” en hospederos de níspero de la localidad de Huamanguilla, Ayacucho 2019.



Anexo 5. Flujograma de extracción de los compuestos fenólicos de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma", Ayacucho 2019

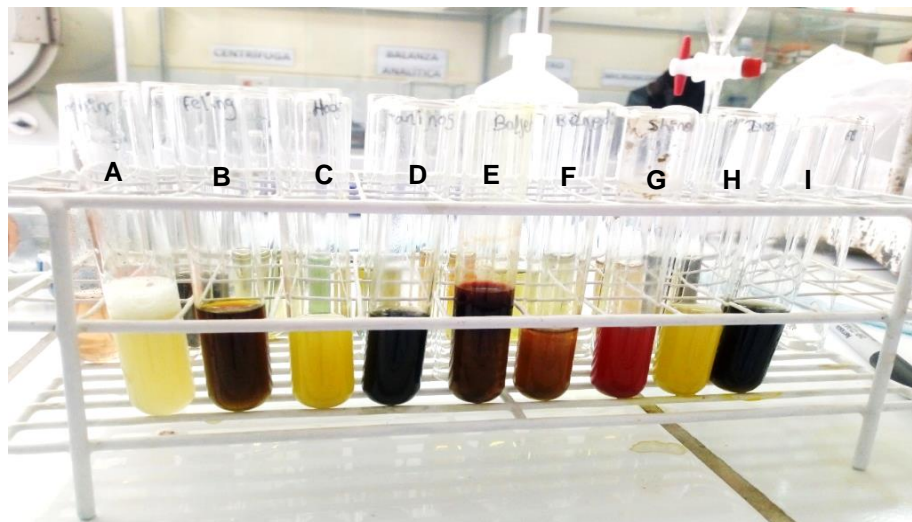


Anexo 6. Extracción e identificación cualitativa de los compuestos fenólicos de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma", Ayacucho 2019.

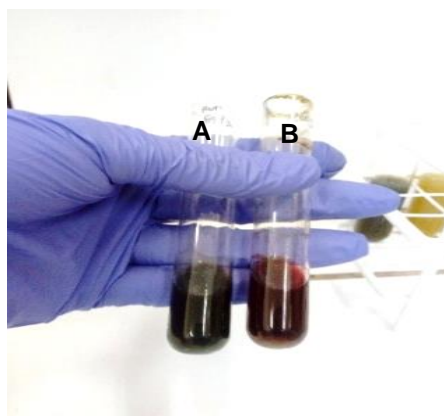


A, Muestra seca y molida; **B**, filtración; **C**, extracto hidroalcohólico en proceso de reducción; **D**, extracción líquida – líquido con éter de petróleo; **E**, extracción líquido – líquido con acetato de etilo; **F**, concentración al vacío

Anexo 7. Reconocimiento de los principales metabolitos secundarios en el extracto etanólico y de la fracción de acetato de etilo aislado de las hojas de *Ligaria cuneifolia*. "tullma", Ayacucho 2019.

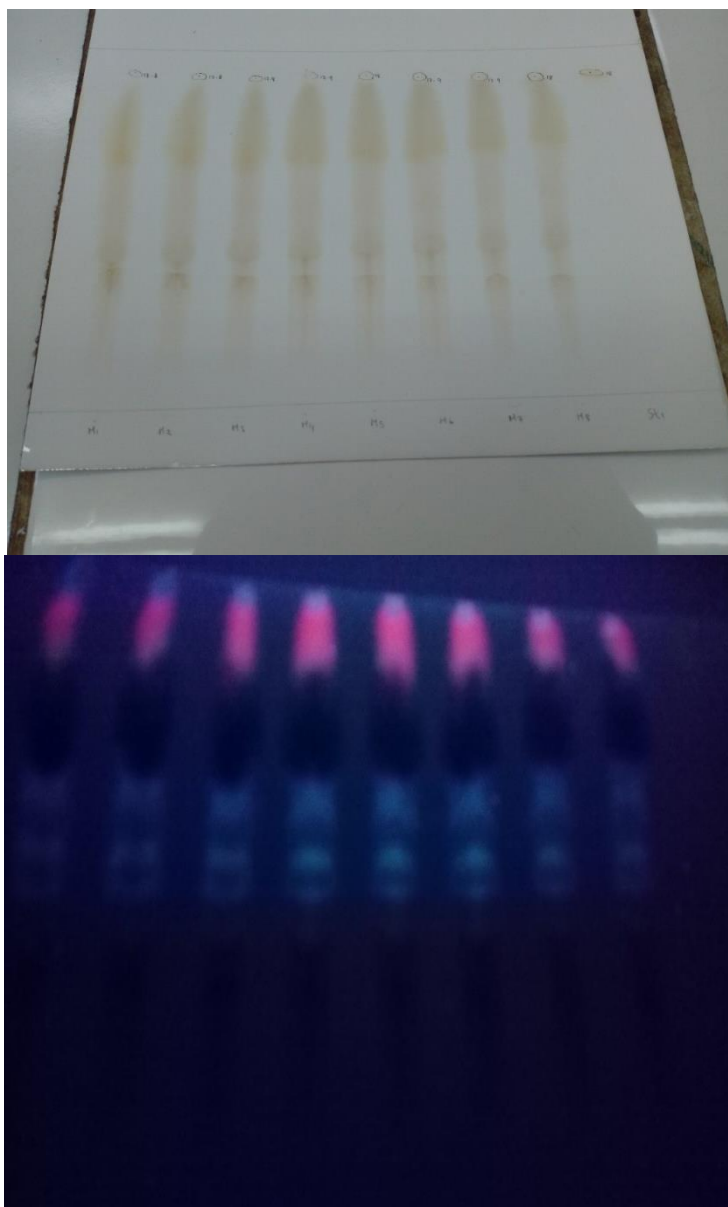


A; saponinas, **B;** triterpenos, **C;** antraquinonas, **D;** taninos, **E;** esteroides, **F;** Benedict, **G;** Flavonoides, **H;** alcaloides, **I;** fenoles.

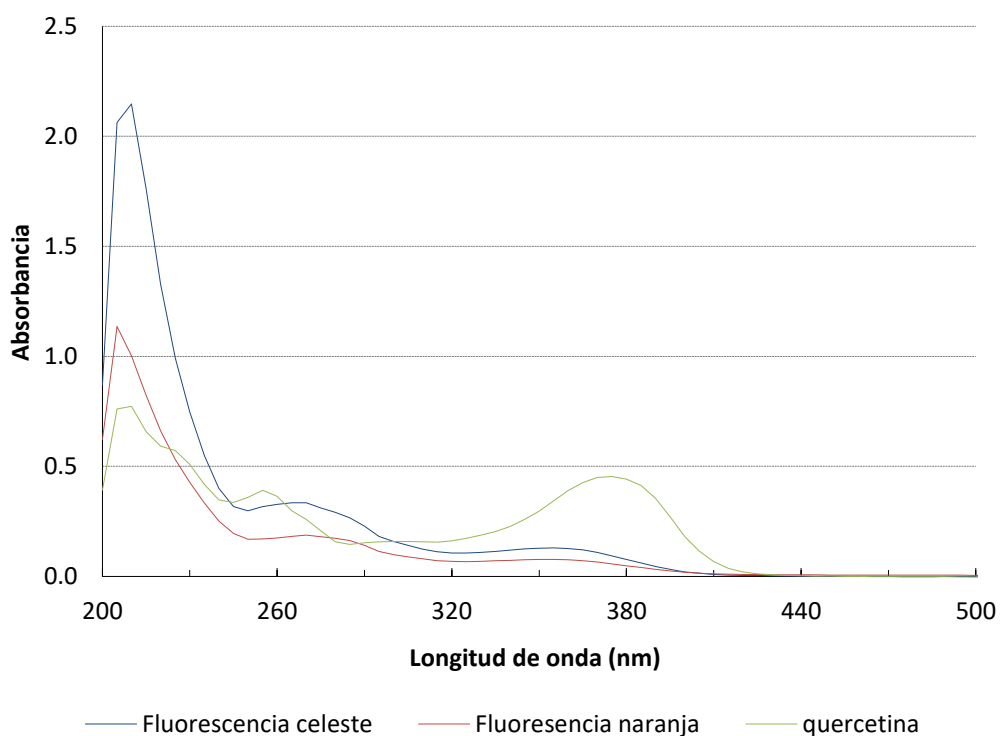


A, fenoles (verde negruzco); **B,** flavonoides (rojo).

Anexo 8. Compuestos fenólicos aislados por cromatografía en capa fina por espectrofotometría ultravioleta y medición del RF de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ligaria cuneifolia*, frente al estándar de quercetina, Ayacucho 2019.



Anexo 9. Curvas cromatográficas de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" en espectro Uv-vis, Ayacucho 2019.



M1.dsp Fluorescencia celeste

Picos Umbral: 0,01 A

1 210nm 2.147 A 2 270 nm 0.335 A 3 355nm 0129A

M2.dsp Fluorescencia roja

picos

1 205nm 1.136 A 2 270nm 0.189 A 3 355nm 0.078 A

ST 1.dps Quercetina

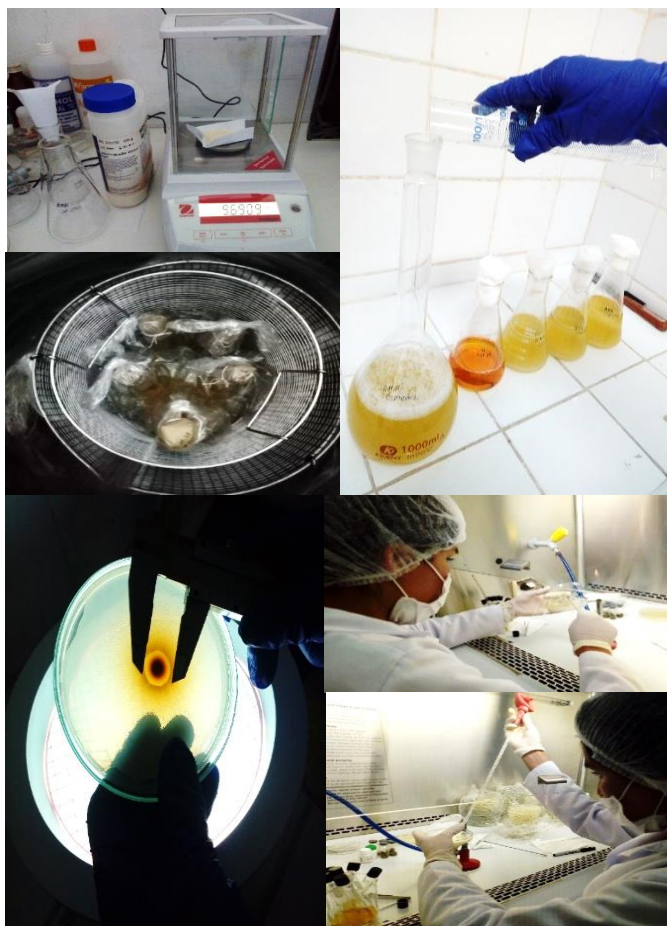
Picos

1 210nm 0.773 A 2 255nm 0.392 A 3 370nm 0.449 A

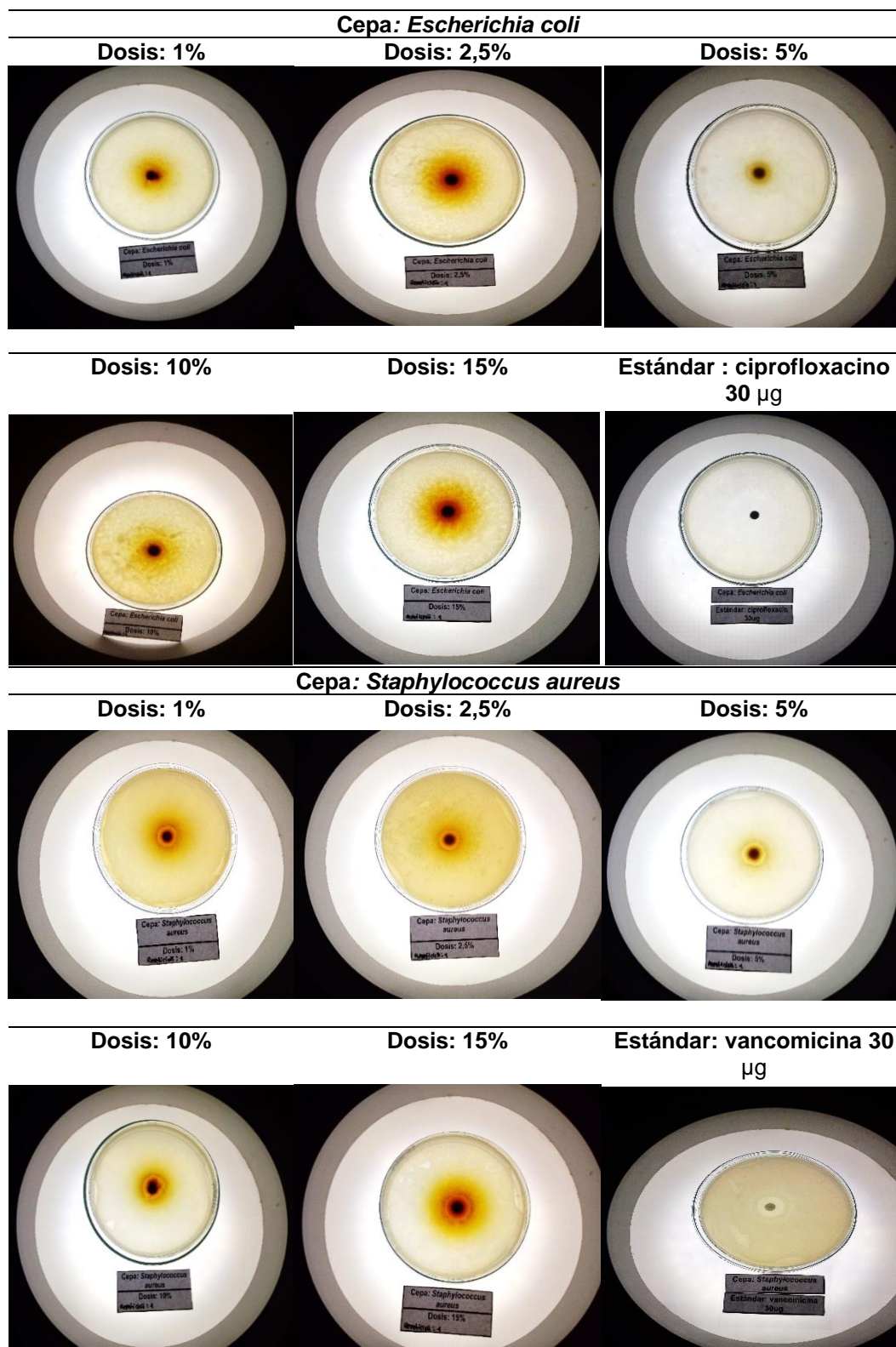
Leyenda:

- 230nm – 270nm: presencia de chalconas (flavonoide)
- 350nm – 385nm: presencia de flavonoles (3-OH libre)
- 330nm – 360nm: presencia de flavonoles (3-OH substituido)

Anexo 10. Proceso de determinación de halos de inhibición de los compuestos fenólicos de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" frente a las cepas en estudio, Ayacucho 2019.



Anexo 11. Determinación de halos de inhibición de los compuestos fenólicos de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" de las 5 dosis frente a *Escherichia coli* ATCC35218 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Ayacucho 2019.



Anexo 12. Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria al 15% de los compuestos fenólicos de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" frente a *Escherichia Coli* ATCC 35218, Ayacucho 2019.



Leyenda: No hubo crecimiento (-) Hubo crecimiento (+) CMI (*)

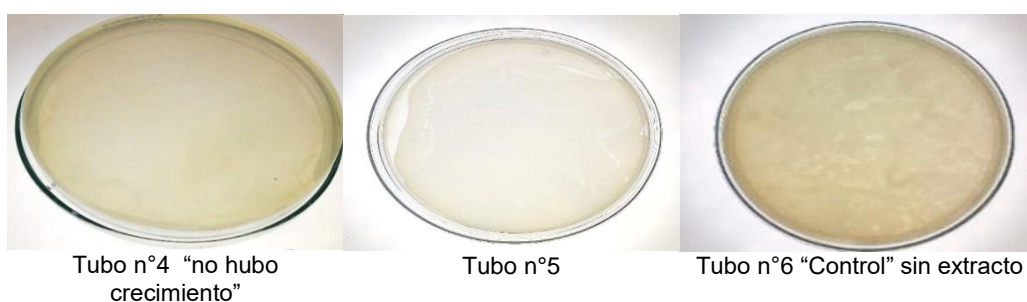
Anexo 13. Determinación de la concentración Mínima Inhibitoria al 15% de los compuestos fenólicos de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Ayacucho 2019.



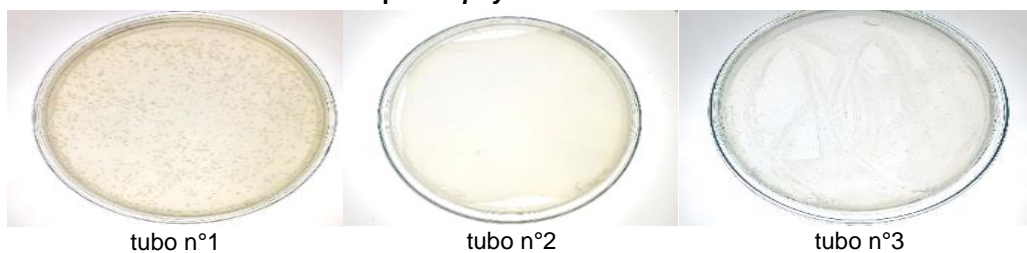
Leyenda: No hubo crecimiento (-) Hubo crecimiento (+) CMI (*)

Anexo 14. Determinación de la concentración Mínima Bactericida al 15% de los compuestos fenólicos de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" frente a *Escherichia coli* ATCC 35218 y *staphylococcus aureus* ATCC 25923, Ayacucho 2019.

Cepa: *Escherichia coli*



Cepa: *Staphylococcus aureus*



Anexo 15. Análisis de prueba de normalidad de los halos de inhibición de a las diferentes dosis de los compuestos fenólicos de las hojas de *Ligaria cuneifolia* “tullma”, frente al estándar ciprofloxacino 30 µg, Ayacucho 2019.

	Pruebas de normalidad					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
1%	,228	8	,200*	,835	8	,067
2,5%	,263	8	,109	,827	8	,056
5%	,361	8	,003	,826	8	,054
10%	,250	8	,150	,860	8	,120
15%	,162	8	,200*	,897	8	,274
Estándar ciprofloxacino	,250	8	,150	,849	8	,093

H0: los datos presentan una distribución normal

H1: los datos no presentan una distribución normal

Interpretación:

El $p > 0,05$ por lo tanto se acepta la hipótesis nula, concluyendo que los datos presentan una distribución normal.

Anexo 16. Análisis de prueba de normalidad de los halos de inhibición de a las diferentes dosis de los compuestos fenólicos de las hojas de *Ligaria cuneifolia* “tullma”, frente al estándar vancomicina 30 µg, Ayacucho 2019.

	Pruebas de normalidad					
	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
1%	,263	8	,109	,827	8	,056
2,5%	,263	8	,109	,827	8	,056
5%	,250	8	,150	,860	8	,120
10%	,263	8	,109	,827	8	,056
15%	,228	8	,200*	,835	8	,067
Estándar vancomicina	,250	8	,150	,849	8	,093

H0: los datos presentan una distribución normal

H1: los datos no presentan una distribución normal

Interpretación:

El $p > 0,05$ por lo tanto se acepta la hipótesis nula, concluyendo que los datos presentan una distribución normal.

Anexo 17. Resultados del análisis de varianza de los halos de inhibición de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma", frente a *Escherichia coli* ATCC 35218, Ayacucho 2019.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	459,604	5	91,921	107,615	,000
Dentro de grupos	35,875	42	,854		
Total	495,479	47			

H0: Las medias de los grupos son iguales

H1: Al menos una de las medias es distinta

Interpretación:

Se rechaza la hipótesis nula, y se acepta la hipótesis alterna, en la cual al menos una de las medias es distinta.

Anexo 18. Resultados del análisis de varianza de los halos de inhibición de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Ayacucho 2019.

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	98,938	5	19,788	30,359	,000
Dentro de grupos	27,375	42	,652		
Total	126,313	47			

H0: La media de los grupos son iguales

H1: Al menos una de las medias es distinta

Interpretación:

Se rechaza la hipótesis nula, y se acepta la hipótesis alterna en la cual al menos una de las medias es distinta.

Anexo 19. Medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos por la prueba de Tukey, de los halos de inhibición por efecto de las diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma", frente a *Escherichia coli* ATCC 35218, Ayacucho 2019.

Extracto	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		A	B	C	D
1%	8	11,8750			
2,5%	8	12,2500			
5%	8	12,7500	12,7500		
10%	8		14,0000	14,0000	
15%	8			14,5000	
Ciprofloxacino 30 µg	8				21,0000
Sig.		,420	,095	,886	1,000

Anexo 20. Medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos por la prueba de Tukey, de los halos de inhibición por efecto de las diferentes concentraciones de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de *Ligaria cuneifolia* "tullma", frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, Ayacucho 2019.

Extracto	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		A	B
1%	8	12,2500	
2,5%	8	13,2500	
5%	8		15,0000
10%	8		15,7500
15%	8		15,8750
Vancomicina 30 µg	8		16,0000
Sig.		,154	,154

Anexo 21. Matriz de consistencia, Ayacucho 2019

Título	Problema	Objetivos	Marco teórico	Hipótesis	Variables	Metodología
Actividad antibacteriana de compuestos fenólicos de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma", frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 Ayacucho. 2019	¿Tendrá actividad antibacteriana los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma", frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923?	<p>Objetivo general: Determinar la actividad antibacteriana a partir de los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma" frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923</p> <p>Objetivos específicos: -Identificar los principales metabolitos secundarios presentes en la fracción de acetato de etilo de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma" -Evaluar los parámetros fisicoquímicos de los compuestos fenólicos de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma" -Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria CMI de la fracción de acetato de etilo de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma" -determinar la Concentración Mínima Bactericida de la fracción de acetato de etilo de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma". frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 35218 y <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923.</p>	<p>-Antecedentes -clasificación botánica de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma". -Descripción botánica -Compuestos fenólicos -Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana de <i>staphylococcus aureus</i> -taxonomía de <i>escherichia coli</i>. - Determinación de la concentración mínima inhibitoria - Determinación de la concentración mínima bactericida.</p>	Los compuestos fenólicos aislados de las hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma" presenta actividad antibacteriana.	<p>Independiente: Compuestos fenólicos aislados de las hojas de "tullma" Indicadores Dosis de 1%; 2,5%; 5%; 10% y 15% Dependiente: Efecto antibacteriano Indicadores: -halo de inhibición en (mm) -concentración mínima inhibitoria (CMI) en mg/mL -concentración mínima bactericida (CMB) en mg/mL</p>	<p>Tipo de investigación: Básica-Experimental. Población Hojas de <i>Ligaria cuneifolia</i> "tullma" que crecen en el distrito de Huamanguilla, provincia de Huanta, Región Ayacucho. Muestra: 500 g de hojas. Muestra biológica: Cepas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> Obtención del extracto hidroalcohólico y compuestos fenólicos. Pruebas cualitativas Cromatografía en capa fina (CCF) Análisis espectral Determinación de CIM Y CBM Análisis estadístico. Los datos serán organizados en una matriz para calcular la media y la desviación estándar, y graficados en forma de gráficos, histogramas y barras. La diferencia significativa existente entre los tratamientos será evaluada mediante análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significación estadística de 95%. Las comparaciones entre cada tratamiento se harán con pruebas Pos Hoc HSD-Tukey, para cuyo efecto se recurrirá al uso del programa SPSS versión 22.0</p>