

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA



**“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO HIDROALCÓHOLICO DE
LAS HOJAS DE *Berberis vulgaris* L. (agracejo) EN CEPAS DE
Staphylococcus aureus ESTUDIO IN VITRO”.**

**Tesis para optar al Título Profesional de Químico
Farmacéutico y Bioquímico**

Bachiller. CHUMPE FERREL, MARCO ANTONIO

Asesor. Mg. Q.F. MUGURUZA LOPEZ, OSCAR

Lima – Perú

2019

DEDICATORIA

A Dios por guiar constantemente mis pasos; a mis padres por animarme a seguir adelante, por ser mi mayor apoyo y sobre todo por quererme; a mi novia por su comprensión y su amor incondicional y su motivación de superación, a toda mi familia por sus sabios consejos, a mi amigo Cesar y aquellas personas que me apoyaron a lo largo de mi carrera.

Marco Chumpe.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios por estar conmigo y guiarme, permitiendo la culminación de este trabajo de Investigación.

A mi asesor que sin su ayuda y conocimientos no hubiese sido posible realizar esta investigación.

A mi enamorada por el apoyo y el soporte que me brinda.

A mis padres por haberme proporcionado la mejor educación y lección de vida.

A mis hermanos por su apoyo y ejemplo a seguir superándome profesionalmente.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	2
1.1.DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA	2
1.2.FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	3
1.2.1.Problema general	3
1.2.2.Problemas específicos	3
1.3.OBJETIVOS	4
1.3.1.Objetivo general	4
1.3.2.objetivos específicos	4
1.4.JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL ESTUDIO	4
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	6
2.1.ANTECEDENTES DEL ESTUDIO	6
2.1.1.Nacionales.....	6
2.1.2.Internacionales	6
2.2.BASES TEÓRICAS	8
2.2.1.Descripción general <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo)	8
2.2.2.Clasificación taxonómica	9
2.2.3.Distribución geográfica	10
2.2.4.Historia	11
2.2.5.Descripción botánica	12
2.2.6.Composición química de <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo).....	13
2.2.7.Aplicaciones medicinales	15
2.2.8.Extractos	15
2.2.9.Obtención de extractos a partir de plantas medicinales.....	16
2.2.10. <i>Staphylococcus aureus</i>	16
2.2.11.Azitromicina	17
2.3. HIPÓTESIS	18
2.3.1.Hipótesis general.....	18
2.3.2.Hipótesis específicas.....	18
2.4.VARIABLES	18
2.5.MARCO CONCEPTUAL.....	20
CAPÍTULO III: MÉTODO.....	21
3.1.TIPO DE ESTUDIO	21
3.2.DISEÑO A UTILIZAR	21

3.3. POBLACIÓN	22
3.4 MUESTRA.....	22
3.5. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	24
3.6. PROCESAMIENTO DE DATOS.....	24
CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANALISIS DE RESULTADOS	36
4.1. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS	36
4.2. CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS	44
4.3. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	47
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	49
5.1. CONCLUSIONES.....	49
5.2. RECOMENDACIONES	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXOS	56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de variables.....	19
Tabla 2. Marcha fitoquímica	29
Tabla 3. Prueba de solubilidad	30
Tabla 4. Concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo).....	32
Tabla 5. Resultados de la prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo)	36
Tabla 6. Resultados de la marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de <i>Berberis vulgaris</i> L (agracejo).....	37
Tabla 7. Siembra bacteriana con <i>Staphylococcus aureus</i>	39
Tabla 8. : Resultado de medición de los halos de inhibición en mm	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N°1.Distribución geográfica de <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo) en el Perú	10
Figura N°2.Descripción botánica de <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo)	12
Figura N°3.Berberina.....	14
Figura N°4.Extracto hidroalcohólico <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo) al 10%.....	43
Figura N°5.Extracto hidroalcohólico <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo) al 20%	43
Figura N° 6. Extracto hidroalcohólico <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo) al 30%...	44

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1. Matriz de consistencia.....	56
Anexo N° 2. Operacionalización de Variables	57
Anexo N° 3. Certificado Botánico de <i>Berberis vulgaris</i> (agracejo).....	58
Anexo N° 4. Certificado de análisis de agar Müller Hinton	59
Anexo N° 5. Certificado de análisis de <i>Staphylococcus aureus</i>	60
Anexo N° 6. Proceso de reactivación de cepas	61
Anexo N° 7. Hojas secas de <i>Berberis vulgaris</i> (agracejo)	62
Anexo N° 8. Proceso de secado de las hojas de <i>Berberis vulgaris</i> (agracejo) .	62
Anexo N° 9. Extracto seco de la muestra en investigación	63
Anexo N° 10. Prueba de solubilidad.....	63
Anexo N° 11. Marcha fitoquímica	63
Anexo N° 12. Resultados de la cromatografía de capa fina	64
Anexo N° 13. Concentraciones del Extracto hidroalcohólico e inóculo de <i>Staphylococcus aureus</i>	64
Anexo N° 14. Vertido en placa del agar Mueller Hinton	64
Anexo N° 15. Siembra bacteriana de <i>Staphylococcus aureus</i>	64
Anexo N° 16. Lectura de resultados de los halos de inhibición	64
Anexo N° 17. Resultados de los halos de inhibición	64
Anexo N° 18. Ficha de observación de la Prueba de solubilidad	64
Anexo N° 19. Ficha de validación de Prueba de solubilidad: Experto 1	64
Anexo N° 20. Ficha de validación de Prueba de solubilidad: Experto 2	64
Anexo N° 21. Ficha de observación de Marcha fitoquímica	64
Anexo N° 22. Ficha de validación de Marcha fitoquímica: Experto 1	64
Anexo N° 23. Ficha de validación de Marcha fitoquímica: Experto 2	64
Anexo N° 24. Ficha de observación de la Actividad antibacteriana.....	64
Anexo N° 25. Ficha de validación de la Actividad antibacteriana: Experto 1	64
Anexo N° 26. Ficha de validación de la Actividad antibacteriana: Experto 2....	64

RESUMEN

El objetivo de la investigación fue evaluar el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las partes aéreas del *Berberis vulgaris* L. (agracejo) en cultivos de cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. Para el desarrollo de la evaluación microbiológica se utilizó el método de difusión en disco en el cual se usó el extracto hidroalcohólico de las partes aéreas del *Berberis vulgaris* L. (agracejo) en tres niveles, según el procedimiento del manual de técnicas de investigación de National Committee for Clinical Laboratory Standards y Revista médica comparado con azitromicina como control positivo, luego se evaluó el efecto inhibitorio mediante la medida de halos de inhibición generada por el extracto hidroalcohólico de las partes de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) al 10%, 20% y 30% comparados con azitromicina 15 µg, mostrando mayor inhibición el extractos al 30%. En conclusión, el extracto hidroalcohólico de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) presentó efecto antibacteriano, una concentración de 10% que llegó hasta las concentraciones de 20% y 30% sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. Asimismo, se determinó la presencia de metabolitos bioactivos cuya acción antibacteriana se relaciona con los flavonoides, alcaloides y compuestos fenólicos.

Palabras clave: *Berberis vulgaris* L. (agracejo), efecto antibacteriano, *Staphylococcus aureus*, *in vitro*.

ABSTRACT

The objective of the research was to evaluate the antibacterial effect of the hydroalcoholic extract of the aerial parts of *Berberis vulgaris* L. (barberry) in cultures of clinical strains of *Staphylococcus aureus*. For the development of the microbiological evaluation the disk diffusion method was used in which the hydroalcoholic extract of the aerial parts of *Berberis vulgaris* L. (barberry) was used in three levels according to the procedure of the manual of research techniques of National Committee for Clinical Laboratory Standards and Medical Journal compared to azithromycin as a positive control with the drug, then the inhibitory effect was evaluated by measuring halos of inhibition generated by the hydroalcoholic extract of the parts of the leaves of *Berberis vulgaris* L. (barberry) at 10%, 20% and 30% compared with azithromycin 15 µg, showing greater inhibition of the extracts of 30%. In conclusion, the hydroalcoholic extract of *Berberis vulgaris* L. (barberry) had an antibacterial effect, a concentration of 10% that reached concentrations of 20% and 30% on clinical strains of *Staphylococcus aureus*. Likewise, the presence of bioactive metabolites whose antibacterial action is related to flavonoids, alkaloids and phenolic compounds was determined.

Key words: *Berberis vulgaris* L. (barberry) antibacterial effect, *Staphylococcus aureus*, in vitro.

INTRODUCCIÓN

La presente investigación establece el estudio del efecto antibacteriano de las hojas de la especie *Berberis vulgaris* L. (agracejo), dado que en el Perú y Europa, se utiliza como alternativa en el tratamiento de diversas enfermedades por sus propiedades nutritivas y medicinales.

Diversos trabajos de investigación muestran los posibles compuestos bioactivos presentes en la planta, entonces es posible aseverar que existe mayor información sobre las propiedades medicinales del *Berberis vulgaris* L. (agracejo). Como señala Meza c. (2008) el uso empírico mediante el tratamiento tradicional frente a diversas enfermedades; debido a sus propiedades expectorantes, antifúngicas, antibacteriana, antioxidantes, antipiréticas y antiespasmódicas.

Se postula que la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas de la especie *Berberis vulgaris* L. (agracejo) está relacionado con la presencia de metabolitos secundarios, como flavonoides, compuestos fenólicos y alcaloides; siendo los responsables de la coloración de las flores, frutos y los que poseen actividad farmacológica como el efecto antibacteriano, antivírico y antifúngicos.

Asimismo, en el estudio se utilizó una cepa de bacteria clínica de *Staphylococcus aureus* el cual está relacionada en infecciones del tracto respiratorio superior y de la piel que persisten actualmente en la comunidad como una causa fundamental de la morbilidad y mortalidad cuya gravedad es mayor en la población infantil; asimismo la importancia de este microorganismo en la resistencia a antimicrobianos de uso en el tratamiento de las afecciones respiratorias.

Por tanto el propósito de la investigación es determinar la propiedad antibacteriana de la especie *Berberis vulgaris* L. (agracejo) como alternativa terapéutica económica para curar, aliviar y tratar ciertas afecciones producidas por este patógeno, teniendo en cuenta que la mayoría de la población requiere de alternativas farmacológicas de costo menor y alto beneficio terapéutico para el tratamiento de infecciones bacterianas que la haría accesible a poblaciones de menores recursos económicos.

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1.Descripción de la realidad problemática

Existen diversas infecciones causadas por *Staphylococcus aureus*, causantes incluso de la muerte, lo que hace necesario la búsqueda constante de tratamientos económicos y de bajos o nulos efectos secundarios, como lo son los productos naturales.

Según la OMS el 80% de la población mundial, utiliza las plantas como principal remedio medicinal. Asimismo cabe recordar que el 25% de los fármacos existentes se obtienen de extractos vegetales, o bien se han sintetizado a partir de sustancias encontradas en la investigación fitoquímica, en sí, la base de los medicamentos son las drogas vegetales ⁽¹⁾

El uso de plantas medicinales para el tratamiento de infecciones respiratorias agudas ha sido muy relevante debido a sus beneficios funcionales, según información etnomedicinal. Como el dolor de garganta, tos, entre otros; asimismo constituyen un recurso de gran importancia para cubrir las necesidades terapéuticas de la población, considerándose agentes funcionales para salud ampliamente conocidas en culturas ancestrales y transmitiéndose a través de generaciones, por ejemplo para aliviar y tratar diversas patologías producidas por microorganismos patógenos.

La bacteria *Staphylococcus aureus* está involucrada en las infecciones patógenas y dérmicas, la cual es uno de los causantes principales de morbi-mortalidad; afectando en su mayoría a la población infantil, nos permite conocer la importancia de este microorganismo en la resistencia a antimicrobianos de uso común en el tratamiento de las afecciones respiratorias y de la piel. ⁽²⁾

La especie vegetal *Berberis vulgaris* L. (agracejo) ha sido utilizado en el tratamiento de diversas enfermedades, aunque la corteza es la parte que contiene más cantidad de principios activos. Hoy en día es utilizada como

tónica de la vesícula biliar. La corteza y la raíz son antisépticas, astringentes, colagogas, hepáticas, purgantes, refrigerantes, estomáticas y tónicas. Las flores son antirreumáticas. La raíz de la corteza se usa como purgante en el tratamiento de la diarrea. ⁽³⁾

Se plantea realizar la investigación, con la finalidad de demostrar que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) posee efecto antibacteriano frente a cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* como una alternativa terapéutica natural.

1.2. Formulación del problema

1.2.1. Problema general

¿El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) posee efecto antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, estudio in vitro?

1.2.2. Problemas específicos

1. ¿Cuáles de los metabolitos presentes del *Berberis vulgaris* L. (agracejo) son responsables del posible efecto antibacteriano?
2. ¿Las concentraciones al 10%, 20%, 30% del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Berberis vulgaris* L. (agracejo) tienen efecto antibacteriano en cepas de *Staphylococcus aureus*, estudio in vitro?
3. ¿El efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Berberis vulgaris* L. (agracejo) es comparable con la azitromicina?

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo general

Determinar si el extracto hidroalcohólico de las hojas del *Berberis vulgaris* L. (agracejo) posee efecto antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, estudio in vitro.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Identificar los metabolitos presentes en las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) responsables del posible efecto antibacteriano.
2. Determinar si las concentraciones al 10%, 20%, 30% del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Berberis vulgaris* L. (agracejo) tienen efecto antibacteriano en cepas de *Staphylococcus aureus*, estudio in vitro.
3. Determinar si el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Berberis vulgaris* L. (agracejo) es comparable con la azitromicina.

1.4. Justificación e importancia del estudio

Las enfermedades respiratorias producidas por *Staphylococcus aureus* son unas de las afecciones más comunes que se presentan en el Perú, para la cual se emplean diversos fármacos de actividad antibacteriana. Sin embargo con el pasar de los años se ha observado un incremento en la resistencia bacteriana, por lo que hoy en día se buscan alternativas naturales, que son finalmente de bajo costo. Debido a esto es que tenemos la necesidad de conocer las propiedades medicinales de las plantas y existiendo poca información sobre los efectos antibacterianos que tiene *Berberis vulgaris* L. (agracejo) sobre el microorganismo *Staphylococcus aureus* causantes de diferentes enfermedades, por estos motivos el presente estudio es considerado de suma importancia, ya que se busca determinar la eficacia del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Berberis vulgaris* L. (agracejo)

lo cual nos brindaría una alternativa eficaz y de pocos o nulos efectos secundarios frente a las enfermedades producidas por el *Staphylococcus aureus* y por ello se consideró valioso la realización de este estudio de investigación para el beneficio de la población y la comunidad científica.

✓ **Delimitación de la investigación**

• **Delimitaciones Geográficas**

La presente Investigación se desarrolla en Lima – Perú, cuyos ensayos experimentales se desarrollarán en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega.

• **Delimitaciones Temporales**

La presente Investigación se desarrolló en un tiempo estimado de 1 año como inicio en Marzo del 2018 hasta Marzo del 2019.

✓ **Limitaciones de la investigación**

• **Limitación Interna**

La presente investigación limita sus resultados en la medida que los datos obtenidos son válidos por los investigadores sólo para la muestra en estudio, no pudiendo extenderse a otras muestras similares sin el control de los datos de la presente investigación.

• **Limitación Externa**

Disponibilidad presupuestaria y la obtención de recursos económicos para la ejecución de la parte teórica y experimental y otros recursos materiales, disponibilidad de tiempo para buscar datos y buscar similares diseños experimentales.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes del estudio

2.1.1. Nacionales

Villar, Martha (1992), Realizó el estudio experimental titulado “Uso de plantas medicinales en el tratamiento del asma bronquial”, administrando a 51 varones y 49 mujeres menores de 20 años, a quienes se les administraron plantas depurativas, curativas, sintomáticas y preventivas, usando como planta depurativa el agracejo. Concluyendo que el uso de plantas curativas y depurativas es una alternativa en el tratamiento del asma bronquial. ⁽³⁾

2.1.2. Internacionales

Mezouar D, et. al. (2014), Realizaron el estudio experimental titulado “Actividad antimicrobiana de los extractos de corteza de *Berberis vulgaris*”. En este trabajo, se estudió los efectos antimicrobianos del *Berberis vulgaris*, donde se mostró la presencia de alcaloides, taninos, esteroides, triterpenos y compuestos reductores en grandes cantidades, también reveló menores cantidades de cumarinas, terpenos, saponinas y mucílago. Analizó el extracto para determinar la actividad antimicrobiana en diferentes cepas de bacterias y levaduras de referencia, utilizando la técnica de difusión en medio de agar y la determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM). Como resultados obtuvo que el extracto metanólico mostro la mejor actividad antibacteriana con diámetros de inhibición de 12.5 a 21 mm para algunas cepas. Además, extractos de *Berberis vulgaris* y más particularmente los alcaloides mostraron una alta actividad antifúngica en cepas de *Candida albicans* (diámetros de inhibición de 19 a 29 mm). ⁽⁸⁾

Cargua R (2012), Realizó el estudio experimental titulado: “Determinación de la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de carrasquilla (*Berberis hallii*) mediante el test de edema inducido en ratas (*Rattus*

novergicus) y contenido de flavonoides” Determinó el efecto antiinflamatorio a diferentes concentraciones de los extractos etanólicos de carrasquilla. Grupo A (114,47) mg/kg; grupo B (68,68) mg/kg, grupo C (45,78) mg/kg y naproxeno sódico 16 mg/kg sobre el edema sub plantar inducido por carragenina 0,5 % en ratas a la segunda hora de administración. Utilizó 15 ratas divididas en 5 grupos: Control positivo, Control negativo, A, B, y grupo C. Como testigo se usa las mediciones del tiempo 0 horas de todas las ratas. La inflamación se indujo administrando Carragenina al 0.5%. El tratamiento consistió en administrar vía oral al control positivo el antiinflamatorio Naproxeno sódico 16 mg/kg, en tanto que a los grupos A, B y C extractos de Carrasquilla a concentraciones de 114.47, 68.68 y 45.78 (mg/kg) respectivamente y el grupo negativo que recibió solo el vehículo agua destilada. El Efecto antiinflamatorio obtenido en forma creciente es: A>B>C. Se concluyó que las dosis del extracto de Carrasquilla presento efecto antiinflamatorio durante las 12 horas del ensayo, a partir de la doceava hora el edema desciende progresivamente. La investigación fue ampliada con el estudio de toxicidad aguda administrando extracto de Carrasquilla a concentraciones de 114.47 y 2000 mg/kg, observándose ausencia de mortalidad y de alteraciones morfológicas, así de esta forma se clasificó esta planta como no toxica. (7)

Núñez L (2010), Realizó el estudio experimental titulado “Estudio fitoquímico del extracto alcaloidal de la especie nativa *Berberis tadabiensis* (lac) berberidaceae” donde estudió la composición química de los tallos de *Berberis tadabiensis* como una contribución al estudio químico de especies colombianas de la familia Berberidaceae y del único género que la representa en Colombia, el género *Berberis*. Se aislaron 2 alcaloides protoberberinicos cuaternarios: berberina, como el alcaloide de la mayor porcentaje del género *Berberis* y *columbamina*, previamente aislado de especies foráneas del género, siendo un aporte a la correlación de las *Berberis* colombianas con otras especies del subgrupo *Austroales*. Los métodos espectroscópicos y espectrométricos permitieron elucidar un nuevo alcaloide BBI, tabienina B, que presenta un novedoso patrón de unión cabeza-cabeza, del cual no se conocen reportes en la familia

Berberidaceae. De esta forma, se muestra un nuevo patrón de sustitución y ordenamiento en los alcaloides BBI no solo del género *Berberis* (subdivisión *Aequinoctiales*), sino también para la familia *Berberidaceae*. (6)

Meza C, (2008), Realizó el estudio experimental titulado “Química y actividad biológica de *Berberis rotundifolia*” Basándose en la determinación de la composición alcaloidal del *Berberis rotundifolia*, los compuestos fueron aislados mediante la aplicación de técnicas cromatográficas y se identificaron usando diversos experimentos espectroscópicos: RMN-1H, RMN-13C. Del estudio químico se identificó la presencia de tres alcaloides del tipo benciliso quinolínicos: pronuciferina, lambertina y berberina. Con el fin de evaluar la actividad biológica de extractos y metabolitos secundarios mayoritarios, se evaluó la actividad antioxidante *in vitro* frente al radical DPPH y bioensayos de toxicidad general sobre *Artemia salina* y citotoxicidad en huevos fecundados de *Loxechinus albus*, dando como resultados una notable actividad tanto para el extracto, como para los metabolitos secundarios mayoritarios. Las características químicas de los alcaloides aislados, junto con las respuestas exhibidas frente a bioensayos, permitieron definir estos compuestos como sustancias químicas con actividad biológica, incitando a la realización de nuevos estudios con el fin de esclarecer posibles actividades farmacológicas que estas moléculas pudieran presentar. (5)

2.2. Bases teóricas

2.2.1. Descripción general *Berberis vulgaris* L. (agracejo)

El género *Berberis* es nativo de climas templados y subtropicales, localizándose en las áreas templadas de ambos hemisferios. En Europa su presencia es más escasa, siendo *B. vulgaris* la especie más extendida. Es un arbusto que forma parte de espinares y setos de la media-alta montaña mediterránea, por encima de los 1000 m sobre suelos calcáreos. (31)

El nombre del género vendría de “berbêrys”, el nombre árabe de los frutos de este arbusto, pero la etimología es controvertida y existen muchas otras

hipótesis. El epíteto específico “vulgaris” significa en latín “común”, “conocido para la gente”. (9)

2.2.2. Clasificación Taxonómica

La familia de las *Berberidaceae*, pertenecen al orden de la *Ranunculales*, y está constituida por 15 géneros y 650 especies ampliamente distribuidas en ambos hemisferios (10).

Clase: Dicotyledoneae

Subclase: Dicotyledoneae

Orden: Ranunculales

Familia: Berberidaceae

Género: Berberis

Especie: *Berberis vulgaris* L.

Nombre común: Agracejo, espino arro,
espino real o santo. (32)

2.2.3. Distribución Geográfica

Habita en gran parte de las zonas templadas y montañosas de Europa, Norte de África y Asia occidental, principalmente en terrenos secos y pedregosos. ⁽³⁾

En el Perú se ubica entre los 2500 y 4500 m.s.n.m. Especialmente en las regiones: Piura, Amazonas, Ancash, Ayacucho, Cajamarca, Huánuco, Lima, Pasco, Puno, San Martín. ⁽¹¹⁾

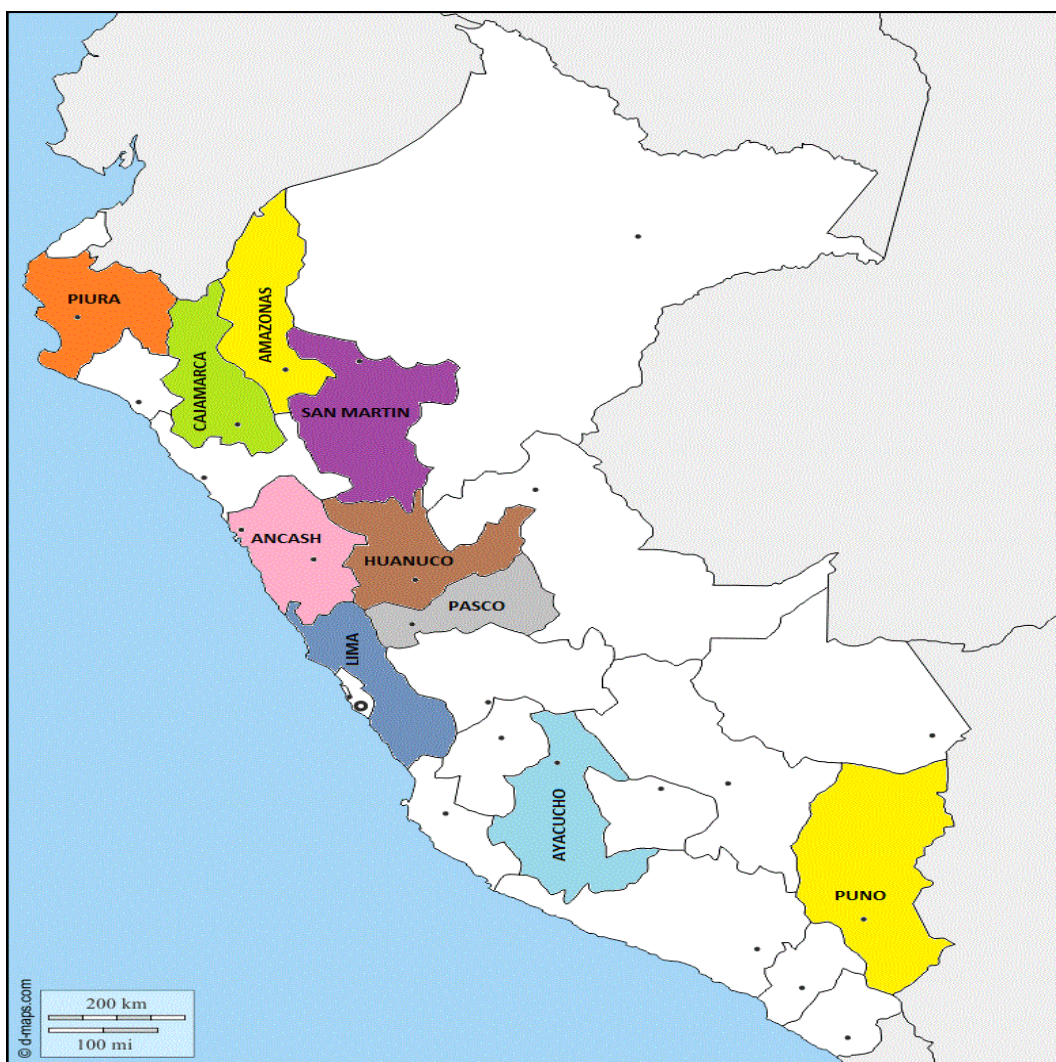


Figura N° 1. Distribución geográfica de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) en el Perú

2.2.4. Historia

El género al que pertenece el *Berberis vulgaris* L. (agracejo), ha sido utilizado en medicina popular de la India durante siglos, y los chinos también emplearon la Berberina, que es uno de los constituyentes del *Berberis*, desde tiempos muy antiguos.

Asimismo el agracejo ha desempeñado un papel fundamental en la curación a base de hierbas durante más de 2.500 años. *Berberis vulgaris* L. es un arbusto de jardín común, nativo de Europa y las islas británicas, naturalizadas en América del Norte, al parecer podría tener una historia tan antigua como la tiene la raza humana. Los antropólogos creen en una práctica ritual u objeto sagrado, especialmente por parte de los nativos americanos, que posee un poder sobrenatural o como prevención o remedio de enfermedades. (33)

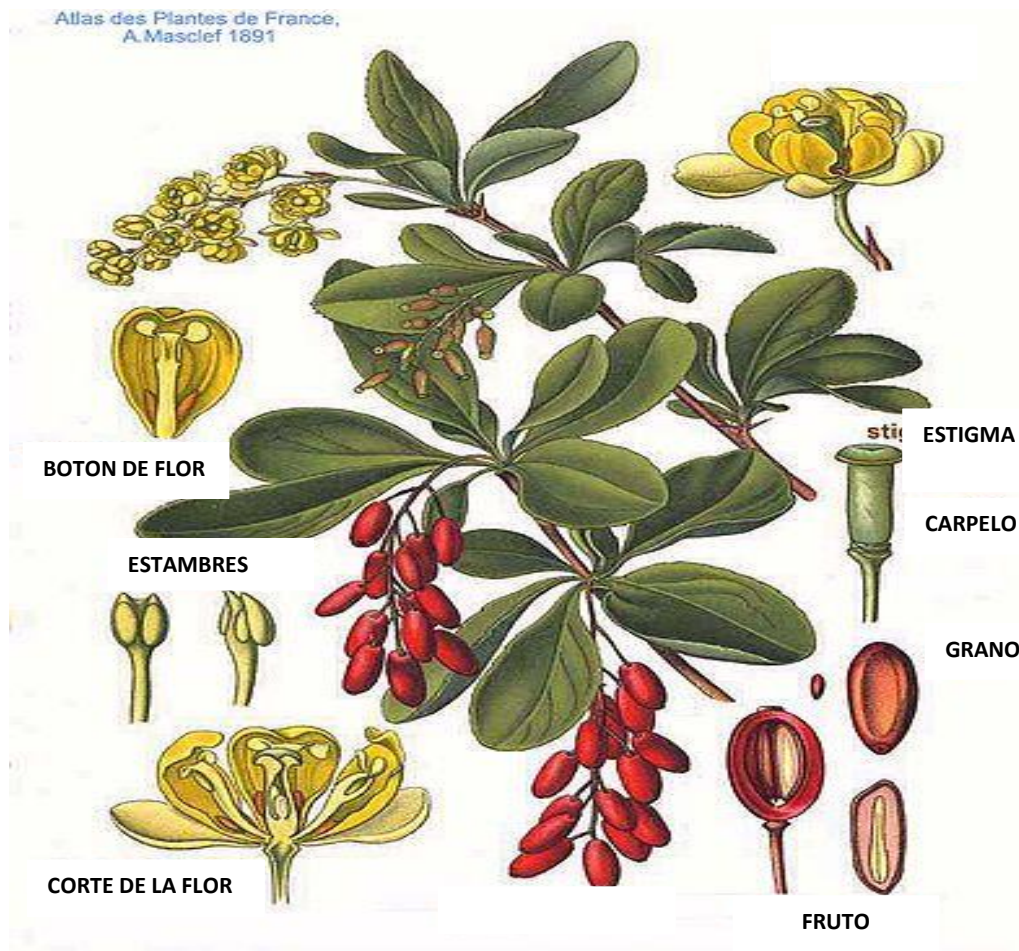
El primer uso que se documentó y está disponible sobre la Berberina fue en el año 1933 para tratar una enfermedad infecciosa de los ojos, llamada tracoma. (12)

Según información histórica la Berberina se empleó de manera común por sus propiedades antidiarreicas y antibióticas, se le considera como un tónico, purgante y antiséptico, se le adjudica la propiedad de reducir la fiebre, así también ayuda a relajar los vasos sanguíneos y reducir la presión arterial. En Irán, la *Berberis vulgaris* L. (Agracejo), se emplea para poder reducir el edema, y en Francia, su corteza se utiliza para reducir la tensión arterial. (12)

El agracejo es un arbusto, que a pesar de todas sus virtudes ya mencionadas, ha llegado a pasar por tiempos en los cuales llegó a ser aborrecido, debido a que se le atribuía la propagación de la roya de los cereales, es por este motivo que era desterrado de los campos de cultivo ya que se creía que de esta manera se evitaban los devastadores efectos que ocasionaban las plagas; tiempo después cuando se pudo constatar

que la roya se propagaba de la misma manera sin su presencia, este arbusto volvió a recuperar sus cualidades. (13)

2.2.5. Descripción botánica



Fuente: Atlas des plantes de France (34)

Figura N° 2. Descripción botánica de *Berberis vulgaris* L. (agracejo)

Berberis vulgaris L. en una planta arbustiva, glabra, de hasta 2 m de altura.

Tallos: Son espinosos asurcados; los de un año son amarillentos, floridos, y los de más años son grisáceos.

Espinas: Son hojas modificadas, de color pardo amarillento y simples o con hasta 5 ramas; la espina central es la mayor, de hasta 30 mm, y las laterales menores, de hasta 25 mm.

Hojas: Miden de 15- 50 x.7- 25 mm, simples, fasciculadas, aparecen en la axila de las espinas y tienen forma elíptica, obovada u oblanceolada, con

la base cuneada, sésil o con un corto pecíolo de hasta 20 mm, y el margen tiene 8 - 35 dientes en cada lado, aunque en ocasiones es entero o subentero.

Flores: Aparecen en racimos alargados, de 25 – 50 mm, entre 9 y 20 flores pedunculadas y bracteadas. Las flores son amarillas y miden entre 4 y 6 mm de diámetro.

Cáliz: Posee 6 sépalos de consistencia petaloide, dispuestos en dos verticilos: los internos de hasta 4.5 x 2.5 mm, de forma oval y enteros, mientras que los externos son más pequeños.

Corola: Consta de 6 pétalos también dispuestos en dos verticilos, que tienen dos glándulas conspicuas en la base; miden hasta 4 x 2 mm, son oblanceolados, de ápices escotado y más cortos o iguales que los sépalos internos. El androceo está formado por 6 estambres opuestos a los pétalos y el gineceo por un ovario que carece de estilo, y un estigma truncado, persistente en el fruto.

Fruto: Es una baya de 5-9 x 3-4.5 mm, de forma oblonga, elipsoidal, de color rojo, generalmente pruinosa, con 2 semillas en el interior. Florece de mayo a julio ⁽³⁾

2.2.6. Composición química de *Berberis vulgaris* L. (agracejo)

La familia de las Berberidaceae contiene principalmente compuestos de tipo isoquinolina, lignano y flavonoide. Su característica composición química contiene alcaloides derivados de la L-tirosina ⁽¹⁵⁾.

Los alcaloides están distribuidos en toda la planta, excepto en los frutos. Los frutos poseen gran cantidad de dextrosa, levulosa, ácido tartárico, cítrico y málico, goma y pectosa. Los alcaloides se les atribuye propiedades aperitivas-eupéptica, colagoga y colerético, espasmolítico, antimicrobiana, antipirética, oxitócica y recientemente se ha analizado sus propiedades hipotensoras y antiinflamatorias. Debido a la presencia de estos componentes el *Berberis vulgaris* L. (agracejo), es indicado para la falta de apetito, dispepsias hiposecretoras, espasmos gastrointestinales, disquinesia y litiasis biliar, hipertensión y estreñimiento. ⁽³²⁾

De todos los alcaloides la berberina es el compuesto más representativo de los alcaloides de tipo isoquinolínico que se encuentra dentro de esta familia; principalmente en los géneros Berberis y Mahonia.

• Berberina

La Berberina es un alcaloide que se obtiene de las raíces, rizomas y corteza de las plantas tanto de las familias Ranunculaceae como de las Berberidaceae, incluyendo también especies de los géneros Berberis, Mahonia, Coptis, Thalictrum y Hydrastis. ⁽¹⁶⁾

Este alcaloide es una base cuaternaria estudiada como antiparasitario. Todas estas bases cuaternarias son coloreadas y la intensidad que presenta el color constituye un indicio de la posición de los sustituyentes en el anillo D. ⁽¹⁴⁾

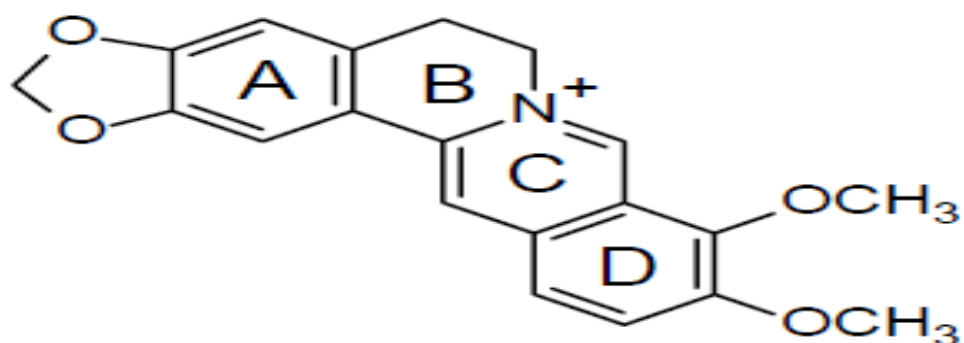


Figura N° 3. Berberina

Fuente Revista offarm Vol. 21 N° 11

- **Nombre químico (IUPAC):** 9,10-Dimetoxi-5,6-dihidro[1,3]dioxolo[4,5-g]isoquino[3,2-a]isoquinolin-7-io o 7,8,13,13^a Tertadehidro-9,10-dimetoxi-2,3-[metilenbis(oxi)]berbinio. ⁽¹⁴⁾

- **Fórmula molecular:** C₂₀H₁₈NO₄⁺

- **Peso molecular:** 336.37

- **Clasificación:** Alcaloide isoquinolínico. ⁽¹⁴⁾

2.2.7. Aplicaciones medicinales

El más poderoso alcaloide del género *Berberis* es la antes mencionada Berberina, de la cual se sabe que presenta una serie de efectos terapéuticos. (17)

La Berberina se emplea para combatir infecciones como la ocasionada por *Helicobacter pylori*, la cual está asociada a la gastritis y úlceras pépticas, así mismo también es empleada para tratar infecciones por levaduras, como las aftas causadas por *Candida albicans*, por lo que se atribuye un eficaz efecto antibacteriano. (17)

El *Berberis* comúnmente es empleado para la diarrea de origen bacteriano, diarrea del viajero e infecciones por parásitos. (17)

El alcaloide también actúa sobre la vejiga estimulando la secreción de la bilis, la cual arrastra los residuos fuera del hígado. (17)

La berberina también actúa como un inhibidor de la COX 2, produciendo un efecto antiinflamatorio, es útil para el tratamiento de los ojos adoloridos o irritados, reumatismo, psoriasis, eccema, hepatitis, así mismo también posee una acción desinflamante de los riñones y otros tipos de inflamaciones. (17)

2.2.8. Extractos

Para obtener una concentración óptima de todos los principios activos que contienen las plantas y lograr que la efectividad de la acción sea mayor, es necesario realizar diferentes procedimientos mediante los cuales se extraigan aquellos componentes con los solventes adecuados que se van a ir seleccionando de acuerdo a la solubilidad y la estabilidad que posean las sustancias. (18)

Los métodos de extracción más utilizados son:

1. Maceración
2. Percolación o lixiviación. (18)

2.2.9. Obtención de extractos a partir de plantas medicinales

•Maceración

El material a procesar deberá ser triturado previamente, para luego ponerlo en contacto permanente con una determinada cantidad de solvente, en un recipiente que debe ser cerrado y permanecer a temperatura ambiente durante 2-14 días hasta que se dé el agotamiento de la droga vegetal.

Se puede utilizar la agitación, para luego de este tiempo filtrar la muestra obtenida. El material insoluble debe ser lavado con el mismo solvente y los filtrados se mezclan para por ultimo concentrar el extracto obtenido.

(18) (19)

•Percolación o lixiviación

El material a procesar debe ser triturado previamente para después ponerlo en contacto con una cantidad determinada de solvente de forma tal que el solvente pueda cubrir la capa de sólido en el recipiente percolador.

El solvente debe removerse de modo continuo manteniéndose un gradiente de concentración, el disolvente puro va ir desplazando al que contiene la sustancia extraída sin ser necesario aplicar presión.

La droga que queda de residuo es prensada y el fluido que se obtiene es combinado con el percolado para concentrar el extracto posteriormente.

(18)

2.2.10. *Staphylococcus aureus*

El nombre de *Staphylococcus*, que significa racimo de uvas, son los responsables de la inflamación y supuración. *Staphylococcus aureus* es una bacteria anaerobia facultativa, Gram positiva en forma de cocos, productora de coagulasa y catalasa. Es un importante patógeno humano,

porque presenta varios factores de virulencia entre ellos una capsula mucoide, que incrementa su capacidad de adherencia y refuerza el efecto antifagocítico, causante de diversas infecciones agudas, piogénicas y superficiales en la población, así como infecciones hospitalarias entre otras. Se encuentra en todo el mundo presenta capacidad de adaptación y supervivencia, lo que conlleva al aumento progresivo de resistencia a los fármacos. (20)

• Patogenia

Cualquier enfermedad infecciosa es el resultado de la interacción entre el microorganismo causal y el huésped. *Staphylococcus aureus* presenta un amplio arsenal contra las defensas del hospedero, puede comportarse como un organismo comensal y como un agente patógeno. La mucosa nasal es el principal sitio de colonización en los seres humanos. Se ha estimado que aproximadamente el 30% de la población general es portadora de esta bacteria. (21)(22)

2.2.11. Azitromicina

• Descripción

La azitromicina es de amplio espectro y tiene actividad contra muchas bacterias aerobias. Sensibles: Gram (+), *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*; bacterias aerobias Gram (-). *Haemophilus influenzae*, *H ducreyi*, *Moraxella catarrhalis* *Legionella pneumophila*, *Neisseria meningitidis*, *Legionella sp*; bacterias anaerobias, *Clostridium perfringens*, *Peptostreptococcus spp*, *Propionibacterium acnes*. *Chlamydia trachomatis*, *C. pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Spiroquetas*, *Mycobacterium avium*, *Astinomyces*. Pueden ser sensibles: *N. gonorrhoeae*, *Shigella sp*. No sensibles: *Enterococcus sp*, *S. aureus* metilino resistente, *E.coli*, *Klepsiella sp*, *Enterobacter sp*, *Serratia*, *Proteus*, *P. aureginosa*, *Bacteróides fragilis*. (23)

- **Farmacocinética**

Se absorbe rápidamente desde el TGI, y disminuye con los alimentos tanto la absorción como el nivel máximo en el plasma. Se distribuye ampliamente y rápidamente en el cuerpo, tiene buena distribución en piel, pulmones, amígdalas y cerviz, penetra pobremente en el LCR. De 7 a 50% se une a proteínas plasmáticas. Metabolismo hepático. Menos del 10% se excreta en la orina y el 50% se excreta sin cambios en la bilis. Su $t^{1/2}$ es 68 horas. (23)

2.3. Hipótesis

2.3.1. Hipótesis general

El extracto hidroalcohólico de las hojas del *Berberis vulgaris* L. (agracejo) posee efecto antibacteriano sobre cepas de *Staphylococcus aureus* estudio in vitro.

2.3.2. Hipótesis específicas

1. Los metabolitos secundarios de las hojas del *Berberis vulgaris* L. (agracejo) son los responsables del posible efecto antibacteriano.
2. La concentración al 10%, 20%, 30% del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Berberis vulgaris* L. (agracejo) sí tiene efecto antibacteriano en cepas de *Staphylococcus aureus*, estudio in vitro.
3. El efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas del *Berberis Vulgaris* L. (agracejo) es comparable con la azitromicina

2.4. Variables

-Variable independiente: Extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo)

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

2.4.1. Tabla de Operacionalización de variables

Tabla 1. Operacionalización de variables

Variables	Dimensiones	Indicadores
Independiente: Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo)	Tamizaje fitoquímico	Compuestos fenólicos Taninos Flavonoides Alcaloides Saponinas Cumarinas
	Cromatografía en capa fina	Alcaloides Flavonoides
	Concentraciones de <i>Berberis vulgaris</i> L.	Concentraciones al 10%,20% y 30%
Dependiente: Efecto antibacteriano frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	Método de Difusión en disco	Medición de los diámetros de inhibición de los Halos en mm referidos según escala de Duraffourd Nula (-): diámetro inferior a 8 mm. Sensible (+): diámetro de 8 a 14 mm. Muy Sensible (++) : diámetro de 14 a 20 mm. Sumamente Sensible (+++): diámetro superior a 20 mm

2.5.Marco conceptual

- **Antibacteriano.** Dícese del fármaco capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias o su eliminación sin dañar el organismo infectado. ⁽²⁵⁾
- **American Type Culture Collection (ATCC).** Es una organización sin fines de lucro que recolecta, almacena y distribuye microorganismos de referencia estándar, líneas celulares y otros materiales para investigación y desarrollo. ⁽¹⁹⁾
- **Cepa.** Cultivo puro formado por bacterias descendientes de un solo aislamiento. ⁽²⁶⁾
- **Efecto antibacteriano.** Capacidad de matar o destruir o inactivar microorganismos, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena. ⁽²⁷⁾
- **Extracto.** Sustancia muy concentrada que se obtiene de una planta, semilla u otra cosa por diversos procedimientos, a menudo se usa etanol o agua como solventes. Los extractos pueden comercializarse como tinturas o en forma de polvo. ⁽²¹⁾
- **Extracto Hidroalcohólico,** Un extracto hidroalcohólico se obtiene macerando la planta aromática en etanol (alcohol etílico), por lo que sólo extraeremos los compuestos solubles en alcohol. ⁽²⁸⁾
- **Marchas fitoquímica.** La marcha fitoquímica o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. ⁽²⁹⁾

CAPÍTULO III: MÉTODO

3.1. Tipo de estudio

La investigación que se realizará será de tipo experimental, ya que se analizará la causa y efecto que generarán las variables propuestas en el presente estudio. Para ello, se manipulará de manera intencionada la variable independiente: Extracto hidroalcohólico de las hojas del *Berberis vulgaris* L. (agracejo), para luego analizar las consecuencias de manipulación que se generarán en la variable dependiente: Efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. Además, durante los experimentos será muy importante y obligatorio controlar las variables intervinientes de manera rigurosa para saber de qué forma o debido a qué se produce una situación o acontecimiento particular.

3.2. Diseño a utilizar

Con respecto a esta investigación, se podría decir que tiene un diseño experimental, de tipo “cuasi experimental”. Donde se tendrá un grupo control y uno experimental. Los mismos que se medirán a través de pruebas de pretest y pos test y fichas de observación para el registro de los hallazgos.

RG =01 X 02

RG= 03 X 04

Dónde:

R= Asignación al azar o aleatoriamente

G = Grupo de sujetos

X= tratamiento, estímulo o condición experimental

01 = Una medición PREVIA a los sujetos de un grupo (prueba, cuestionario, observación, tarea, etc.) Grupo blanco

02 = Una medición POSTERIOR a los sujetos de un grupo (prueba, cuestionario, observación, tarea, etc.) Grupo CONTROL

03 = Una medición PREVIA a los sujetos de un grupo (prueba, cuestionario, observación, tarea, etc.) Grupo EXPERIMENTAL

04 = Una medición POSTERIOR a los sujetos de un grupo (prueba, cuestionario, observación, tarea, etc.) Grupo EXPERIMENTAL II

3.3. Población

Población botánica: La población estará conformada por las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) recolectadas en la región San Martín - Perú.

Población Microbiológica: La población microbiológica fue constituida por las cepas *Staphylococcus aureus*

3.4. Muestra

Muestra botánica: La muestra para este estudio es de 300 gramos de hojas secas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) mediante muestreo probabilístico. Como criterio para definir la muestra, se procedió con un 95% de confianza y 5% de error, además, un porcentaje estimado de muestras de 50%-50%. Este análisis se desarrollará mediante el programa Decision Analyst STATS 2.0., que refiere Fernández *et al.* (2014) para determinar una muestra probabilística.

Muestra microbiológica: Para determinar el tamaño de la muestra microbiológica se procedió según:

$$\Delta E = \frac{\bar{X}_c - \bar{X}_e}{S_c}$$

Dónde:

- ΔE = Delta estandarizado o diferencia clínica.
- \bar{X}_c = Media del grupo control.
- \bar{X}_e = Media del grupo experimental.
- S_c = Desviación estándar del grupo control.

$$\Delta E = \frac{15.5 - 9.0}{1.4}$$

Dónde:

- $\Delta E = ?$
- $X_c = 15.5^{(1)}$
- $X_e = 9.0^{(1)}$
- $SC = 1.4^{(1)} \Delta E = 4.64$

Considerando un nivel de significancia a dos colas de 0.05, bajo un valor estimado de delta de 1.50, y un $\beta=0.2$, se estableció:

$$n = 6 \text{ placas por cada grupo}$$

Considerando la posibilidad que existan placas que puedan echarse a perder durante el desarrollo de la investigación, se recalculó el tamaño muestral por grupo en base a una tasa de pérdida de 10%.

$$nc = n \frac{1}{1 - R}$$

Dónde:

- nc = Tamaño muestral corregido a pérdidas.
- n = Tamaño muestral no corregido a pérdidas.
- R = Tasa estimada de pérdida.

$$nc = 9 \frac{1}{1 - 0.1}$$

Dónde:

- $nc = ?$
- $n = 9$
- $R = 10\% = 0.1$

$$n = 10 \text{ placas por cada grupo}$$

Tomando en consideración que cada placa podrá contener los tres tipos de tratamientos, se considerará las 10 placas como la muestra total del estudio.

3.5. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se emplearon las siguientes fichas de recolección de datos:

- Prueba de solubilidad
- Marcha fitoquímica
- Actividad microbiológica

Estas fichas se realizaron en base a los indicadores con sus respectivos criterios. Fue elaborado por el autor con el propósito de recolectar los datos para la prueba en estudio y su validación se realizó a través de la técnica del juicio de expertos. Los expertos fueron docentes investigadores de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega en Lima, Perú

3.6. Procesamiento de datos

Cuando se concluya la investigación los datos serán procesados mediante el paquete estadístico SPSS 24, con el que se realizarán los siguientes procedimientos estadísticos de análisis:

- a) Obtención de medias con su respectiva desviación estándar en los 3 dominios, con sus indicadores correspondientes.
- b) Se presentará los resultados en tablas con su respectiva representación gráfica.
- c) Para analizar diferencias significativas de medias independientes de los cuestionarios se utilizará la prueba paramétrica del Chi cuadrado.
- d) Se considerará un margen de error estadístico de 5%.

Materiales, reactivos y equipos para utilizar en la Investigación

✓ Materiales:

- Asas de Kolle
- Baguetas
- Beaker de 100, 250 y 500 mL

- Cubas Cromatográficas
- Embudos
- Espátulas
- Frasco de vidrio ámbar de 1 litro
- Fuentes de Vidrio
- Gradillas
- Goteros
- Laminas cromatofolios
- Mechero de bunsen
- Papel filtro
- Papel kraff
- Pinzas estériles
- Pipetas de 0.5, 1, 5 y 10mL.
- Pipetas Pasteur
- Placas Petri estériles descartables
- Probetas 100, 250 y 500 mL.
- Propipetas
- Regla
- Tubos de ensayo 13x100 y 10 x 100 mm.

✓ **Equipos:**

- Alcoholímetro
- Autoclave JSB
- Balanza Analítica y precisión RADWAG
- Baño María HE&A
- Estufa esterilizadora a calor seco MEMMERT
- Incubadora MEMMERT
- Molino

✓ **Reactivos:**

- Acetato de sodio 1M
- Acetona
- Ácido sulfúrico 2N
- Agar Mueller Hinton
- Agua destilada
- Alcohol de 96°
- Cepas de *Staphylococcus aureus*
- Ciclohexano
- Cloroformo
- Etanol
- Éter de petróleo
- Hidróxido de sodio al 10%
- Hidróxido de sodio al 5% (reacción de Bortranger)
- Metanol
- Reactivo de Baljet
- Reactivo de BAW: Butanol-Agua-Ácido acético glacial (4:3:1)
- Reactivo de Bertrand
- Reactivo de cloruro férrico
- Reactivo de Dragendorff
- Reactivo de Fehling A
- Reactivo de Fehling B
- Reactivo de gelatina 1%
- Reactivo de Lieberman Burchard
- Reactivo de Mayer
- Reactivo de metanol-agua (25:75)
- Reactivo de Ninhidrina
- Reactivo de Rosenheim
- Reactivo de Sonneschein
- Reactivo de Shinoda (tiras de magnesio + ácido clorhídrico)
- Reactivo de tricloruro férrico de aluminio al 2%

Procedimiento experimental

Las muestras de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) fue adquirida en la región San Martín en el mes de marzo del 2018. Para proceder a trabajar con las hojas, se llevó a la Universidad Nacional de la Amazonia peruana, para el reconocimiento taxonómico de la planta

A. Secado de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo)

Para poder trabajar con las hojas de *Berberis vulgaris* L (agracejo) se seleccionó y se eliminó las impurezas de las hojas con agua destilada, luego se colocaron en papel kraft, para luego ser llevada a la estufa a una temperatura de 40° a 45 °C, la temperatura es para no alterar los metabolitos.

B. Extracción hidroalcohólica de las hojas de *Berberis vulgaris* L (agracejo)

Una vez secas las hojas se llevaron a molienda y luego se pesó en la balanza analítica la cual pesó 300 g Se adicionó un promedio de 1000 mL de etanol 70°, luego se procedió a envasar y rotular la muestra en un frasco ámbar y dejarlo a maceración por 7 días, asimismo se agito con una bagueta con una frecuencia de 3 a 4 horas, para tener una buena concentración de los principios activos, después del tiempo estimado se filtró el extracto de *Berberis vulgaris* L (agracejo) con papel Whatman N° 40, el volumen total obtenido de extracto hidroalcohólico de *Berberis vulgaris* L (agracejo) fue de 600 mL. El extracto que obtuvimos servirá para los análisis posteriores.

C. Extracto seco de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo)

Para obtener el extracto seco, el líquido filtrado de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) se pasó al rotavapor. Este trabajo se realizó a temperatura controlada de 50°C, al final se obtuvo un total de 140 g de extracto seco de

Berberis vulgaris L. (agracejo). La muestra se recolectó en un envase de vidrio y se almacenó a temperatura de 2 a 8 °C hasta su utilización.

D. Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo)

Para la realización de la marcha fitoquímica se procedió, según el estudio de Olga Look de Ugaz: determinación de metabolitos mediante diversos tipos de ensayos.

Estos ensayos fueron verificados a partir de la muestra seca. Estos ensayos son de tipo cualitativo que permitieron la identificación de la muestra a estudiar.

• Procedimiento:

Se colocó 10 gotas de la muestra a 16 tubos de ensayo donde se les distribuyo los distintos reactivos a utilizarse, adicional se realizó en un tubo la reacción de espuma o índice afrosimétrico.

Tabla 2. Marcha fitoquímica

METABOLITOS	REACTIVOS	PROCEDIMIENTO	REACCIÓN POSITIVA
Carbohidratos	Molish	MP + Molish+H ₂ SO ₄ cc	Anillo violeta
	Antrona	MP + Antrona	Color verde
	Fehling	MP + Fehling A + Fehling B + Calentar en B.M	Coloración rojo ladrillo
Compuestos fenólicos	FeCl ₃	MP + FeCl ₃ 10%	Color verde o azul
Taninos	Gelatina	MP + 3 gotas de gelatina	Precipitado denso blanco
Flavonoides	Reactivo de Shinoda	MP + 2 virutas de Mg + HCL	Color rojo
Antocianinas y flavonoides catéquicos	Rosenheim	MP + Rosenheim	Coloración rojo oscuro
Aminoácidos libres y grupos amino	Ninhidrina	MP + Ninhidrina + calentar en B.M	Coloración violácea
Alcaloides	Dragendorff	MP + HCl 10% + Dragendorff	Precipitado naranja
	Mayer	MP + HCl 10% + Mayer	Precipitado blanco crema
	Bertrand	MP + HCl 10% + Bertrand	Precipitado blanco
	Sonneschein	MP + HCl 10% + Sonneschein	Precipitado amarillo
Naftaquinonas, antraquinonas y antranonas	Borntrager	MP + Borntrager	Coloración roja
Triterpenoides y esteroides	Buerchard	MP + Cloroformo + anhídrido acético + H ₂ SO ₄ cc	Coloración verde azul: Esteroides. Coloración rojo naranja: Triterpenoides
Saponinas	Agua destilada	MP + agua destilada	Formación de 0.5 a 1 cm de espuma estable por 15 min.
Glucósidos	Baljet	MP + ácido pícrico 1% + NaOH 5 %	Coloración anaranjada
Cumarinas	NH ₄ OH cc o NaOH 10%	MP + papel humedecido con NH ₄ OH cc o NaOH 10% en boca de tubo + calentar por 5 minutos	Fluorescencia celeste

E. Prueba de solubilidad

Para el análisis de solubilidad del extracto hidroalcohólico de *Berberis vulgaris* L. (agracejo), se utilizaron solventes de distinta polaridad. Para así conocer en que solvente se pueden analizar los metabolitos. Se realizó en: N-hexano, acetato de etilo, metanol, n-butanol, agua destilada y etanol.

• Procedimiento:

Se colocó una pequeña alícuota del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) en 6 tubos respectivamente y posteriormente se adicionó a cada uno un solvente distinto y se procedió a agitar hasta obtener los resultados.

Tabla 3. Prueba de solubilidad

N° DE MUESTRA	SOLVENTE
1	Etanol
2	Cloroformo
3	Éter de petróleo
4	Metanol
5	Agua destilada
6	Ciclohexano
7	Acetona

F. Cromatografía en capa fina

Para la identificación de flavonoides presentes en la muestra se preparó un extracto a partir de 1 g de muestra seca de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) con 5 mL de una mezcla de agua, después de haber transcurrido dos horas de agitación, la solución se filtró en papel filtro normal. Para la purificación del extracto de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) se volvió a filtrar en un micro filtro de 0,45 µm, una vez obtenido el extracto se procedió a realizar la

cromatografía en capa fina; para la cual se usó una placa con silica gel con medidas 3,5 cm x 10 cm y como fase móvil se usó una mezcla de solventes como cloroformo, éter de petróleo y agua, en una proporción de 4:1:5., para el revelado con soluciones de yodo con apoyo de una lámpara de luz UV con dos longitudes de onda. El extracto obtenido se sembró en la placa sobre una línea de origen trazada a 0,5 cm sobre el borde inferior (5 gotas), luego se colocó en la cuba cromatográfica la cual contenía un volumen de fase móvil y luego se esperó un promedio de 30 minutos para lograr el recorrido hasta el borde superior de la placa, pasado este tiempo se sacó de la cuba y se secó con ayuda de una secadora para finalmente llevarlo a una lámpara “UV”.

G. Actividad Antibacteriana

La determinación experimental de la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de la hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) en concentraciones de 10%, 20% y 30%, frente a la cepa *Staphylococcus aureus* se realizó empleando el método de difusión en disco, para luego evaluar el diámetro del halo que pudiese generar. Se utilizó como control de la actividad antibacteriana azitromicina de 15 µg.

Preparación de la sustancia vegetal de hojas extracto hidroalcohólico de la hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo)

Se prepararon 03 muestras del extracto a concentraciones de 10, 20 y 30%.

Tabla 4. Concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo).

N°	Concentración	Procedimiento
1	10%	9 mL de agua destilada + 1 mL de extracto hidroalcohólico
2	20%	8 mL de agua destilada + 2 mL de extracto hidroalcohólico
3	30%	7 mL de agua destilada + 3 mL de extracto hidroalcohólico

Preparación del agar Mueller Hinton

El agar Mueller - Hinton se preparó con agua destilada de acuerdo a la indicación técnica del laboratorio fabricante del medio de cultivo. Fundir el medio de cultivo solido de Mueller Hinton como indica la especificación técnica del laboratorio fabricante para este proceso, el agar requiere una temperatura 121°C y 15 libras de presión durante 15 minutos. Luego de este proceso de esterilización y fundición dejar enfriar en Baño María a 48 - 50°C. Alcanzada esta temperatura verter el preparado fresco y tibio a las placas Petri estériles descartables, para dar un fondo uniforme de aproximadamente 4 mm. Esto corresponde a 20 mL para placas de 100 mm de diámetro. El medio de agar se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se mantuvo el pH del medio de cultivo entre 7,2 - 7,4 según lo indicado por el fabricante, este proceso se realizó con pH metro de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la UIGV.

Reactivación del cultivos de la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC6538

Para este ensayo se utilizó 2 placas Petri que contengan 25 mL de Agar Soya Tripticasa (TSA) previamente elaborada, luego se procede a abrir el KWIK-STIK que contiene la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y se siembra con un hisopo a cada una de las placas de Agar Soya Tripticasa (TSA) realizando estrías y se incuba por un tiempo de 24 horas y a 37 °C de temperatura, pasado el tiempo estimado se verá el crecimiento bacteriano de las cepa de *Staphylococcus aureus*.

Preparación del Inóculo

Preparamos de acuerdo al tubo N° 0,5 de la escala de Mc Farland. Se obtiene al tocar con un hisopo estéril la superficie de una o varias colonias de cepas de *Staphylococcus aureus*, Luego se procedió a transferirlos a los tubos que contienen 3 mL de caldo nutritivo, previa agitación para un mejor homogenizado, se realizó diluciones seriadas hasta obtener la turbidez de la escala 0.5 de Mc Farland por comparación visual con dicho patrón, cabe mencionar que se usó una luz apropiada y se pudo observar los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste. La suspensión del inóculo con turbidez comparable al tubo de la escala de Mac Farland contiene aproximadamente $1,5 \times 10^8$ ufc/mL; para el ensayo la suspensión bacteriana se preparó agregando 0,1 mL del tubo de caldo Nutritivo (que contiene las bacterias de estudio) en 9.9 ml de caldo nutritivo obteniéndose un total de 10 mL con una concentración bacteriana para su siembra correspondiente en las placas de medio de cultivo de Muëller Hinton.

Estándar de turbidez

Se preparó este estándar añadiendo 0.5 mL de $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1.175%) a 99.5 mL de H_2SO_4 0.36N (1%). Mezclar perfectamente y distribuir en tubos tapa rosca 13 x 100 en cantidad de 6-8 mL; sellar herméticamente y almacenarlos en un lugar oscuro a temperatura ambiente.

Siembra de la muestra

Para la siembra de la muestra se procedió de la siguiente forma

- Sumergir un aplicador de algodón estéril, dentro de la suspensión del microorganismo en estudio. No usar cultivos sin diluir.

- Colocar el aplicador por encima del nivel del contenido del tubo y rotarlo contra las paredes del mismo para remover el exceso del inóculo.

- Sembrar el inóculo uniformemente sobre la superficie del medio Agar Mueller Hinton con un hisopo estéril. Hacer esta siembra en tres direcciones. Evitar inóculos muy concentrados o muy diluidos.

- Permitir que la superficie del medio sembrado se sumerge durante 5-20 minutos, manteniendo la placa con la tapa cerrada.

- Se colocó los discos sobre la superficie del agar con pinzas estériles; con éstas, presionar los discos ligeramente sobre el agar preparado de Mueller Hinton para asegurar un contacto uniforme sobre el sembrado de la bacteria en Investigación.

Se hizo una marcación en la superficie externa de las placas del medio de cultivo Mueller Hinton, se dividió la placa en dos y se añadieron un disco en cada extremo uno de ellos conteniendo el antibiótico azitromicina y el otro conteniendo el extracto hidroalcohólico de *Berberis vulgaris* L. (agracejo).

Medición de los Halos de Inhibición

Se procedió a medir la zona de inhibición de cada disco contra una superficie oscura bajo luz reflejada. Se midió el diámetro de la zona incluyendo el diámetro del disco, con una regla sobre el respaldo de la caja de Petri sin remover la tapa.

Interpretación de Resultados

Luego de 24 a 48 horas de incubación, en la incubadora marca Brinder de los Laboratorios de Microbiología de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, cada placa es revisada. Los halos de inhibición resultantes fueron uniformemente circulares en una capa homogénea de crecimiento bacteriano. Los diámetros de la zona de inhibición completa son medidos en milímetros pasando por el centro del disco. La medición se realiza con una regla según antecedente de Kirby-Bauer. Los valores de las mediciones por sextuplicados deben promediarse y compararse con las medidas de los halos de inhibición producidos por el antibiótico azitromicina según diseño de la investigación.

CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANALISIS DE RESULTADOS

4.1. Presentación de Resultados

Después de analizar las muestras se obtuvieron los siguientes resultados.

Prueba de Solubilidad

Según la prueba de solubilidad realizada al extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) presenta mayor solubilidad frente a agua destilada, moderada solubilidad a etanol, poca solubilidad frente a metanol e insolubilidad frente a acetona, Ciclohexano, cloroformo y éter de petróleo.

Tabla 5. Resultados de la prueba de solubilidad del extracto hidroalcohólico de hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo)

N°	SOLVENTES	RESULTADO
1	Acetona	-
2	Agua Destilada	+++
3	Ciclohexano	-
4	Cloroformo	-
5	Etanol	++
6	Éter de Petróleo	-
7	Metanol	+

Leyenda:

- Abundante +++
- Regular ++
- Poco +
- Ausencia -

Marcha fitoquímica

El extracto hidroalcohólico de *Berberis vulgaris* L. (agracejo), presenta dentro de sus metabolitos secundarios alcaloides, flavonoides, compuestos fenólicos, glucósidos y taninos.

Tabla 6. Resultados de la marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de *Berberis vulgaris* L (agracejo)

METABOLITO	REACTIVOS	REACCIÓN POSITIVA	RESULTADO
Carbohidratos	Molish	Anillo violeta	-
	Antrona	Color verde	-
	Fehling	Coloración rojo ladrillo	-
Compuestos Fenólicos	FeCl ₃	Color verde o azul	++
Taninos	Gelatina	Precipitado denso blanco	+
Flavonoides	Shinoda	Color rojo	+++
Antocianinas y Flavonoides Catéquicos	Rosenheim	Coloración rojo oscuro	-
Aminoácidos Libres y Grupos Amino	Ninhidrina (0.1% en Etanol)	Coloración violácea	-
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado naranja	-
	Mayer	Precipitado blanco crema	++
	Bertrand	Precipitado blanco	+
	Sonnenschein	Precipitado amarillo	+
Naftaquinonas, Antraquinonas y antranonas	Borntrager	Coloración roja	-
Triterpenoides y Esteroides	Lieberman-Burchard	Coloración verde azul: Esteroides. Coloración rojo naranja: Triterpenoides	-
Saponinas	Generación de Espuma	Formación de 0.5 a 1 cm de espuma estable por 15 min.	-
Glicósidos	Baljet	Coloración anaranjada	++
Cumarinas	NH ₄ OH cc o NaOH 10%	Fluorescencia celeste	-

Leyenda:

- Abundante +++
- Regular ++
- Poco +
- Ausencia -

Cromatografía en capa fina del extracto hidroalcohólico de *Berberis vulgaris* L. (agracejo)

Se obtuvo un RF de 7 centímetros con imágenes claras de reconocimiento de flavonoides.

Actividad antibacteriana

En la Investigación se trabajó con el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L (agracejo)

Se diseñó en 5 grupos de 6 placas con medio de cultivo de la forma siguiente.

a) Grupo N° 01: Se trabajó con 2 placas de medio de cultivo preparado pero sin ninguna siembra bacteriana, ninguna administración de drogas ya que sería nuestro grupo blanco.

b) Grupo N° 02: Se trabajó con siembra bacteriana de cepas de *Staphylococcus aureus*, en este grupo no se administró ninguna droga, sería nuestro control positivo.

c) Grupo N° 03: Se trabajó con siembra bacteriana de cepas de *Staphylococcus aureus* y se administró azitromicina en disco y un disco con extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L (agracejo) al 10% de concentración.

d) Grupo N°04: Se trabajó con siembra bacteriana de cepas de *Staphylococcus aureus* y se administró azitromicina en discos y un disco con extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris L* (agracejo) al 20% de concentración.

e) Grupo N°05: Se trabajó con siembra bacteriana de cepas de *Staphylococcus aureus* y se administró azitromicina en discos y un disco con extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris L* (agracejo) al 30% de concentración.

Tabla 7. Siembra bacteriana con *Staphylococcus aureus*

Grupos	Siembra bacteriana con <i>Staphylococcus aureus</i> cepas ATCC 6538	Administración del antibiótico azitromicina	Administración de extracto hidroalcohólico de <i>Berberis vulgaris L</i> (agracejo)
01	-	-	-
02	✓	-	-
03	✓	✓	10%
04	✓	✓	20%
05	✓	✓	30%

Tabla 8. : Resultado de medición de los halos de inhibición en mm

N° de los Medios	Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo) al 10%		Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis vulgaris</i> L.(agracejo) al 20%		Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis vulgaris</i> L.(agracejo) al 30%	
	<i>Berberis vulgaris</i> 10%	Azitromicina	<i>Berberis vulgaris</i> 20%	Azitromicina	<i>Berberis vulgaris</i> 30%	Azitromicina
1	6	39	35	38	33	38
2	6	38	30	39	32	39
3	6	40	25	39	32	38
4	6	40	27	40	33	40
5	6	39	20	39	33	41
6	6	40	25	38	32	39
Media	6	39	27	39	33	39

Cuadros estadísticos

Estadísticos							
		Extracto <i>Berberis vulgaris</i> 10%	Azitromicina 1	Extracto <i>Berberis vulgaris</i> 20%	Azitromicina 2	Extracto <i>Berberis vulgaris</i> 30%	Azitromicina 3
N°	Válido	6	6	6	6	6	6
	Perdidos	0	0	0	0	0	0
Media		1,00	2,33	2,83	1,83	1,50	2,17
Mediana		1,00	2,50	2,50	2,00	1,50	2,00
Moda		1	3	2	2	1a	1a
Desviación		0,000	0,816	1,472	0,753	0,548	1,169
a. Existen múltiples modos. Se muestra el valor más pequeño.							

Extracto <i>Berberis vulgaris</i> 10%					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	6	6	100,0	100,0	100,0

Azitromicina 1					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	38	1	16,7	16,7	16,7
	39	2	33,3	33,3	50,0
	40	3	50,0	50,0	100,0
	Total	6	100,0	100,0	

Extracto Berberis vulgaris 20%					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	20	1	16,7	16,7	16,7
	25	2	33,3	33,3	50,0
	27	1	16,7	16,7	66,7
	30	1	16,7	16,7	83,3
	35	1	16,7	16,7	100,0
	Total	6	100,0	100,0	

Azitromicina 2					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	38	2	33,3	33,3	33,3
	39	2	33,3	33,3	66,7
	40	1	16,7	16,7	83,3
	41	1	16,7	16,7	100,0
	Total	6	100,0	100,0	

Extracto Berberis vulgaris 30%					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	32	3	50,0	50,0	50,0
	33	3	50,0	50,0	100,0
	Total	6	100,0	100,0	

Azitromicina 3					
		Frecuencia	Porcentaje	Porcentaje válido	Porcentaje acumulado
Válido	38	2	33,3	33,3	33,3
	39	2	33,3	33,3	66,7
	40	1	16,7	16,7	83,3
	41	1	16,7	16,7	100,0
	Total	6	100,0	100,0	

Estadísticos descriptivos					
	N	Mínimo	Máximo	Media	Desviación
Extracto berberis vulgaris 10%	6	1	1	1,00	0,000
Azitromicina 1	6	1	3	2,33	0,816
Extracto berberis vulgaris 20%	6	1	5	2,83	1,472
Azitromicina 2	6	1	3	1,83	0,753
Extracto berberis vulgaris 30%	6	1	2	1,50	0,548
Azitromicina 3	6	1	4	2,17	1,169
N válido (por lista)	6				

GRÁFICOS DE MEDIDA DE HALOS DE INHIBICIÓN EN mm

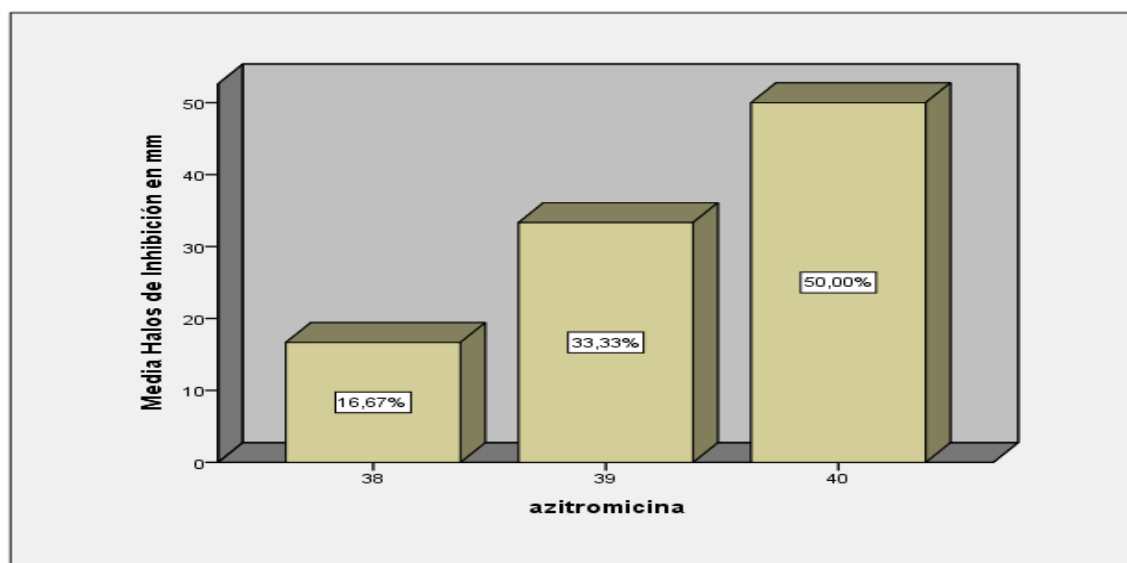


Figura N° 4. Extracto hidroalcohólico *Berberis vulgaris* L. (agracejo) al 10%

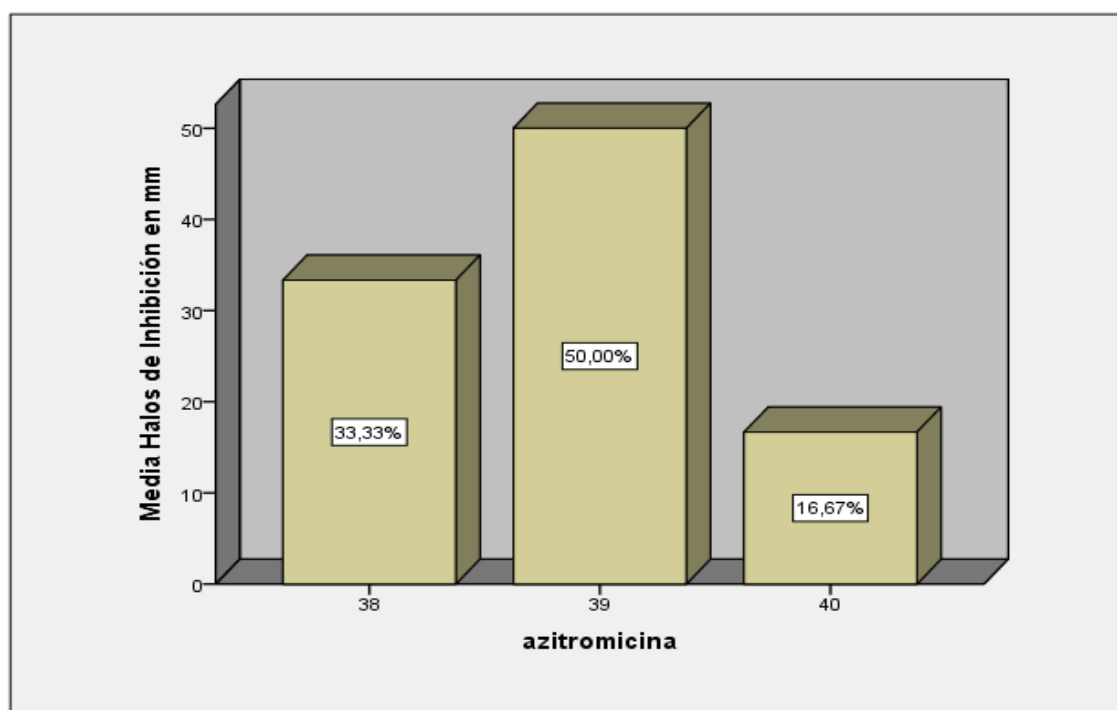


Figura N° 5. Extracto hidroalcohólico *Berberis vulgaris* L. (agracejo) al 20%

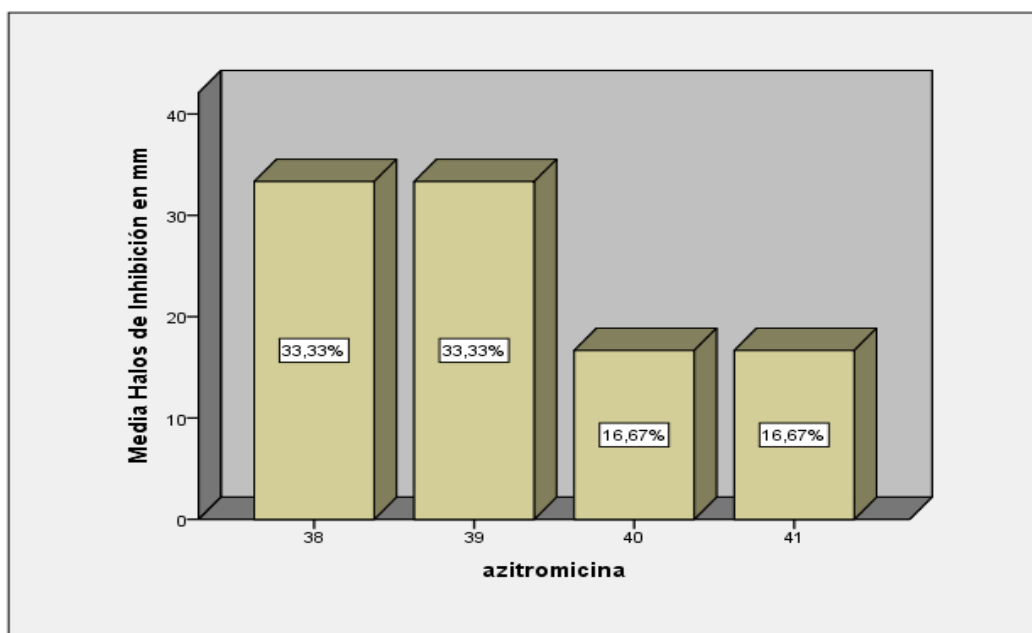


Figura N° 6. Extracto hidroalcohólico *Berberis vulgaris* L. (agracejo) al 30%

4.2. Contrastación de hipótesis

Para contrastar las hipótesis de investigación se sistematizaron y procesaron los resultados en función a pruebas estadísticas. Durante el proceso de experimentación se trabajó con 6 grupos: concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) al 10%, 20% y 30%, control positivo con (azitromicina) y control negativo sin tratamiento con 3 ensayos con extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo), por cada grupo, interpretados según la escala de Duraffourd y Lapraz.

El diseño estadístico que se empleó es el análisis de variancia (ANOVA) que permitió determinar que si hay diferencias estadísticas significativas entre los promedios de los halos de inhibición del hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) en los todos los grupos de análisis, con un nivel de confianza ($p < 0.05$).

La prueba TUKEY permitió comparar las diferencias entre los grupos de análisis en base a los promedios del diámetro de los halos de inhibición obtenidos en el trabajo de investigación.

También se emplearon las pruebas estadísticas de normalidad: T de una muestra y Wilcoxon para comparar el efecto antibacteriano entre el grupo control y las concentraciones del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo)

Contrastación de hipótesis general H1:

H1: El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) tiene efecto antibacteriano in vitro frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

H0: El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) no tiene efecto antibacteriano in vitro frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. La comprobación de la hipótesis general gira en función de las contrastaciones de las hipótesis específicas planteadas en el estudio, por tanto, debido a la complejidad de las variables de medición se procede a subdividir en hipótesis específicas.

Contrastación de la hipótesis específica 1:

H1: El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) posee algunos constituyentes químicos relacionados con el efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

H0: El extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) no posee algunos constituyentes químicos relacionados con el efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus*.

Para la contratación de la hipótesis se realizó la marcha fitoquímica, con el fin de identificar la presencia de los metabolitos presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo).

Los resultados expuestos corresponden a la marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) que indican que la muestra presenta una reacción positiva en su totalidad (+++), flavonoides. Por otro lado, la muestra presenta una reacción positiva moderada (++) para: compuestos fenólicos, alcaloides y glicósidos.

Los metabolitos identificados con mayor intensidad, entre ellos, compuestos fenólicos, flavonoides, estarían relacionados con el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) tal como lo indica los antecedentes. Por tanto, se acepta la H1.

Contrastación de la hipótesis específica 2:

H1: *Staphylococcus aureus* es sensible a concentraciones de 10%,20% y 30% del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo).

H0: *Staphylococcus aureus* no es sensible a concentraciones de 10%,20% y 30% del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo)

Para la contrastación de la hipótesis planteada se utilizaron las pruebas estadísticas ANOVA y DHS de TUKEY con el fin de establecer diferencias entre los grupos de análisis, así mismo, realizar comparaciones múltiples, en función a los promedios de los diámetros de halos de inhibición, determinando la sensibilidad de *Staphylococcus aureus*.

Hipótesis General

H0: El uso del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) no favorece la actividad antibacteriana frente a cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*

H1: El uso del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo), favorece la actividad antibacteriana frente a cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*.

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Halos de Inhibición en mm.

Origen	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	2317,167 ^a	2	1158,583	838,755	,000
Intersección	9900,250	1	9900,250	7167,274	,000
Concentración	2317,167	2	1158,583	838,755	,000
Error	45,583	33	1,381		
Total	12263,000	36			
Total corregida	2362,750	35			

a. R cuadrado = ,981 (R cuadrado corregida = ,980)

Decisión estadística:

Como el p-valor obtenido (0.000) es menor que el nivel de significancia $\alpha = 0,05$ 0.05 se rechaza la hipótesis nula y se tiene evidencia estadística para afirmar que el extracto hidroalcohólico de la hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) favorece la actividad antibacteriana frente a cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*.

4.3. Discusión de resultados

Con respecto a la primera hipótesis se puede señalar que los resultados de la marcha fitoquímica revelaron la presencia de flavonoides, compuestos fenólicos, taninos, alcaloides y glicósidos, como se evidencia en el trabajo de investigación de Mezouar D. quien en el examen fitoquímico cualitativo realizado en *Berberis vulgaris* observó la presencia de alcaloides, taninos, esteroides, triterpenos y reductores en grandes cantidades, y también reveló menores cantidades de cumarinas, terpenoides, saponinas y mucílago. La detección de estas clases químicas fue realizada por extracción usando solventes con polaridad creciente y extracción de alcaloides totales. En la prueba de cromatografía en capa fina, las fases móviles empleadas poseen buena elución para los flavonoides y alcaloides, como lo plantea Olga Lock, en el libro de "Investigación fitoquímica". Con lo cual queda demostrada la primera hipótesis.

Para la segunda hipótesis, se puede afirmar que la actividad antibacteriana del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Berberis vulgaris* L. (agracejo) que se realizó mediante el método de difusión en disco con la cepa de *Staphylococcus*

aureus sembrado sobre placas Petri conteniendo agar Müller Hinton, se realizó en tres concentraciones y cada uno por sextuplicado. Como son el 10%, 20% y 30%, comparándolo con la azitromicina a una concentración de 15 µg. Los halos obtenidos fueron medidos con una regla, obteniéndose como promedio de las seis lecturas 6 mm para la concentración de 10%, 27 mm para el 20% y 33 mm para el 30%, analizado en primera instancia con la escala de Duraffourd que nos indica que los halos mayores a 20 mm son sumamente sensibles, como lo fundamenta Mezouar D. en su trabajo de investigación, donde el extracto macerado metanólico posee la mejor actividad antibacteriana con diámetros de inhibición de 12.5 a 21 mm para algunos tipos de cepas. Además, los extractos de *Berberis vulgaris* y más específicamente los alcaloides mostraron una fuerte actividad antifúngica en *Candida albicans* con diámetros de inhibición de 19 a 29 mm.

Por ultimo para la tercera hipótesis, se podría afirmar que la concentración del extracto al 30% es casi comparable al grado de inhibición bacteriana de la azitromicina ya que el halo de inhibición de la azitromicina fue de 39 mm y la del extracto al 30% de 33 mm.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de las hojas *Berberis vulgaris* L. (*agracejo*) son: flavonoides, alcaloides, taninos, compuestos fenólicos y glicósidos.
- El extracto hidroalcohólico de las hojas *Berberis vulgaris* L. (*agracejo*) en las concentraciones al 10%, 20% y 30% poseen efecto antibacteriano frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, siendo la concentración al 30% la que posee mayor actividad antibacteriana.
- El efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas *Berberis vulgaris* L. (*agracejo*) al 30% es comparable con el efecto antibacteriano de la azitromicina, ya que presentan similar halo de inhibición (33 mm en el extracto al 30% y 39 mm en la azitromicina)

5.2. Recomendaciones.

- ✓ Utilizar preparados galénicos a base de las hojas *Berberis vulgaris* L (agracejo) ya que tiene un efecto antibacteriano y que puedan complementar el tratamiento convencional
- ✓ Realizar estudios microbiológicos con otras bacterias y de las hojas de *Berberis vulgaris* L (agracejo) para determinar su utilización para otras afecciones causadas por diferentes agentes microbianos
- ✓ Hacer investigaciones de sinergismo con otras plantas medicinales para incrementar el efecto antibacteriano y probarlo en diferentes cepas multiresistentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cargua R. Determinación de la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de Carrasquilla (*Berberis hallii*) mediante el test de edema inducido en ratas (*Rattus norvegicus*) y contenido de flavonoides. [Tesis]. Riobamba: Escuela superior politécnica de Chimborazo; 2012. [Fecha de acceso 25 de marzo del 2018]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2583/1/56T00355.pdf>
2. Quinto R. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *Muehlenbeckia volcánica* (benth.) endl. (mullaca) en cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, in vitro. [Tesis]. Lima: Universidad Inca Garcilaso de la Vega, 2018. [Fecha de acceso 04 de Abril del 2018]. Disponible en: http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/3074/008599_Tesis%20LAGOS%20TALAVERANO%20DANIEL-%20QUINTO%20ANCIETA%20ROCIO.pdf?sequence=3&isAllowed=y
3. Rodríguez E. Evaluación del potencial genotóxico de cinco especies medicinales de uso popular en el Perú. [Tesis]. Iquitos: Universidad nacional de la amazonia peruana, 2009. [Fecha de acceso 10 de Abril del 2018]. Disponible en : <http://repositorio.unapiquitos.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/2226/T-615.907-R74.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
4. Villar M. Uso plantas medicinales en el tratamiento del asma bronquial. Boletín de la Sociedad Peruana de Medicina Interna-Vol.5 N° 4-1992. [Fecha de acceso 19 de Abril del 2018]. Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/spmi/v05n4/trabajos%20originales4.htm>
5. Meza K. Química y actividad biológica de *Berberis rotundifolia*. [Tesis]. Valdivia, Universidad Austral de Chile; 2008. [Fecha de acceso 05 de Mayo del 2018]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2008/fcm617q/doc/fcm617q.pdf>

6. Nuñez L. Estudio fitoquímico del extracto alcaloidal de la especie nativa *Berberis tabiensis* (Jacq.) Berberidaceae. [Tesis]. Colombia, Universidad nacional de Colombia; 2010. [Fecha de acceso 11 de Mayo del 2018]. Disponible en: <http://bdigital.unal.edu.co/2990/1/197451.2010.pdf>

7. Cargua R. Determinación de la actividad antiinflamatoria del extracto etanólico de Carrasquilla (*Berberis hallii*) mediante el test de edema inducido en ratas (*Rattus norvegicus*) y contenido de flavonoides. [Tesis]. Riobamba: Escuela superior politécnica de Chimborazo; 2012. [Fecha de acceso 20 de mayo del 2018]. Disponible en: <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2583/1/56T00355.pdf>

8. Mezouar, D., Lahfa, F.B., Abdelouahid, D.E. et al. Phytothérapie [Internet], 2014, [Fecha de acceso 28 de mayo del 2018]. 12: 380. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10298-014-0863-5>.

9. Zanotti E. *Berberis Vulgaris*. Rev. Monaco nature encyclopedia. [Internet]. [Fecha de acceso 07 de Junio del 2018]. Disponible en: <https://www.monaconatureencyclopedia.com/berberis-vulgaris/?lang=es>

10. Chambi. Preparación de remedios con plantas medicinales de bosques naturales. [Fecha de acceso 10 de Junio del 2018]. Disponible en: <http://catalogo.ibcperu.org/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=13336>

11. Astahuaman D, et. al. Guía metodológica de preparados fitofarmacéuticos, [Internet], [Fecha de acceso 12 de Junio del 2018]. Disponible en: <http://docs.bvsalud.org/biblioref/2018/03/880573/guia-metodologica-de-preparados-fitofarmaceuticos.pdf>.

12. Arayne M. et. al. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*, [Internet], 2002. [Fecha de acceso 15 de Junio del 2018]. 20 (1), 83-92. Disponible en: www.pjps.pk/pjps-20-1-07/paper-16.pdf

13. Angerhofer CK. et. al: Antiplasmodial and cytotoxic activity of natural bisbenzylisoquinoline alkaloids. J Nat Prod [Internet], 1999 [Fecha de acceso 27 de Junio del 2018]. 62: 59–66. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9917283>
14. Akhter M. et. al. Possible mechanism of antidiarrhoeal effect of berberine. Indian J Med Res [internet], 1979, [Fecha de acceso 05 de Julio del 2018], 70: 233–241. Disponible en: <https://iaj.asm.org/content/iaj/35/2/471.full.pdf>
15. Fatehi M. et. al. A pharmacological study on Berberis vulgaris fruit extract. Journal of Ethnopharmacy, [Internet], 2005, [Fecha de acceso 13 de Julio del 2018]. 102, 46-52. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15993555>
16. Invitrogen Molecular Probes. Prestobblue cell viability reagent protocol product information sheet, 2010, [Fecha de acceso 30 de Julio del 2018] Disponible en: http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/PrestoBlue_Reagent_PIS_15Oct10.pdf
17. Amin A. et. al. Berberine sulfate: antimicrobial activity, bioassay, and mode of action. Canadian Journal of Microbiology, [Internet], 1969, [Fecha de acceso 07 de Agosto del 2018]. 15: 1067–1076. Disponible en: <https://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m69-190#citart1>
18. Angerhofer C. et. al. Antiplasmodial and cytotoxic activity of natural bisbenzylisoquinoline alkaloids. Publimed. [Internet], 1999, [Fecha de acceso 19 de Agosto del 2018]. 62: 59–66. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9917283>
19. Berberine monograph Altern Med Rev, [Internet], 2000, [Fecha de acceso 30 de Agosto del 2018]. 5: 175–177. Disponible en: <http://www.altmedrev.com/archive/publications/5/2/175.pdf>
20. Rodríguez K, “Actividad antibacteriana del extracto etanólico de las hojas de Jungia rugosa less (matico serrano) sobre cepas de Staphylococcus aureus.

[Tesis]. Lima: Universidad Inca Garcilaso de la Vega, 2018. [Fecha de acceso 04 de Setiembre del 2018]. Disponible en: http://repositorio.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/4055/003919_tesis%20de%20rodriguez%20-%20condori.pdf?sequence=3&isAllowed=y

21. Cisternas L, Avellano. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile Rev Med Chile.2010; 138(1): 1288-1293. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872010001100014
22. Dale, M.et.al. en Farmacología: McGraw-Hill. Interamericana.España. 2003.7. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookID=1832>
23. Ministerio de Salud. Azitromicina. [Fecha de acceso 06 de Setiembre del 2018] Disponible en: <http://www.digemid.minsa.gob.pe/UpLoad/UpLoaded/PDF/azitromicina.pdf>
24. Araujo J y Salas R. Actividad antimicrobiana de plantas. [En línea] Lima: Revista científica. [Fecha de acceso 08 de Setiembre del 2018]. URL: Disponible en: <https://es.scribd.com/doc/223627983/Actividad-Antimicrobiana-de-Plantas>
25. Berns, K. ATCC. Washington 1996. [Fecha de acceso 30 de junio del 2018]. URL: Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK209072/>
26. Lowy, F. Staphylococcus aureus. 1998. Disponible en: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM199812313392716>
27. Artemio C. La fitofarmacopea peruana. [En línea] Perú; Revista Científica del Laboratorio de Productos Naturales 2008; [Fecha de acceso 15 de Setiembre del 2018]. Disponible en <http://bibliotecafarmaceutica.com/Fitoica/2008/articulo%203.pdf>
28. Novelli S. et. al. Identification of Alkaloid's Profile in Ficus benjamina L. Extracts with Higher Antioxidant Power. Am J Plant Sci. [Internet], 2015; [Fecha de acceso 15 de Setiembre del 2018], 05(26):4029–39. Disponible en: <https://pdfs.semanticscholar.org/7b79/140ed288f8a16954bf08f0b5bf18a0304071.pdf>

29. Lock O. Investigación Fitoquímica. Segunda Edición. Lima: Editorial Fondo Pontificia Universidad Católica del Perú. 1994.
30. Sarg T. et. al. Two new polyphenolic compounds from *Ficus retusa* L. "variegata" and the biological activity of the different plant extracts. J Pharmacogn Phyther. [Internet], 2011; [Fecha de acceso 20 de Setiembre del 2018], 3(7):89–100. Disponible en: http://www.academicjournals.org/app/webroot/article/article1379600205_Sarg%20et%20al.pdf
31. AGUILELLA A. et. al. Catálogo valenciano de especies de flora amenazadas. Colección Biodiversidad, 18. Conselleria de Medio Ambiente, Valencia, 2010 [Fecha de acceso 04 octubre del 2018], Disponible en: http://www.cma.gva.es/comunes_asp/documentos/agenda/Cas/65557-CatalogoFloraAmenazada.pdf.
32. Benítez G. Etnobotánica y etnobiología del poniente granadino. [Tesis]. Granada, Universidad de Granada; 2009, [Fecha de acceso 04 de Octubre del 2018]. Disponible en: <https://hera.ugr.es/tesisugr/17822294.pdf>
33. Arayne S. La historia de Berberis: *Berberis vulgaris* en terapéutica, Rev. Pak J Pharm Sci. 2007; 20 (1): 83-92. [Fecha de acceso 10 de Octubre del 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17337435>
34. Masclef A. Atlas des plantes de France [Internet]. 1891. [Fecha de acceso 15 de Octubre del 2018]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Berberis_vulgaris#/media/Archivo:18_Berberis_vulgaris_L.jpg

ANEXOS

Anexo N° 1. Matriz de consistencia

TITULO:“ EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO HIDROALCOHOLICO DE LAS HOJAS DEL <i>BERBERIS VULGARIS</i> (AGRACEJO) EN CEPAS DE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> ESTUDIO IN VITRO”					
PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPOTESIS GENERAL	VARIABLES	INDICADORES	METODO DE INVESTIGACION
<p>¿El extracto hidroalcohólico de las hojas del <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo) posee efecto antibacteriano sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, estudio in vitro?</p> <p>PROBLEMAS ESPECÍFICOS</p> <p>-¿Cuáles de los metabolitos presentes del <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo) son responsables de posible efecto antibacteriano?</p> <p>-¿La concentración al 10%, 20%, 30% del extracto hidroalcohólico de las hojas del <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo) tiene efecto antibacteriano en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, estudio in vitro?</p> <p>-¿El efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas del <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo) es comparable con la azitromicina?</p>	<p>Determinar si el extracto hidroalcohólico de las hojas del <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo) posee efecto antibacteriano sobre cepas de <i>Staphylococcus Aureus</i>, estudio in vitro.</p> <p>OBJETIVO ESPECIFICOS</p> <p>-Identificar los metabolitos presentes en las hojas de del <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo) responsables del posible efecto antibacteriano.</p> <p>-Determinar si la concentración al 10%, 20%, 30% del extracto hidroalcohólico de las hojas del <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo) tiene efecto antibacteriano en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, estudio in vitro.</p> <p>-Determinar si el efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas del <i>Berberis Vulgaris</i> L. (agracejo) es comparable con la azitromicina.</p>	<p>El extracto hidroalcohólico de las hojas del <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo) posee efecto antibacteriano sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> estudio in vitro.</p> <p>HIPOTESIS ESPECIFICAS</p> <p>-Los metabolitos secundarios de las hojas del <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo) son los responsable del posible efecto antibacteriano.</p> <p>-La concentración al 10%, 20%, 30% del extracto hidroalcohólico de las hojas del <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo) sí tiene efecto antibacteriano en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>, estudio in vitro.</p> <p>-El efecto antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas del <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo) es comparable con la azitromicina</p>	<p>INDEPENDIENTE</p> <p>Extracto hidroalcohólico de las hojas del <i>berberis vulgaris</i> L. (agracejo)</p> <p>Dependiente:</p> <p>Efecto Antibacteriano frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i></p>	<p>a.- Taxonomía</p> <p>b.- Solubilidad</p> <p>c.- Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico de las hojas del <i>Berberis vulgaris</i> L. (agracejo)</p> <p>d.- Cromatografía en capa fina</p> <p>e.- Método de difusión en agar</p>	<p>Nivel: Experimental.</p> <p>Enfoque: Cuantitativo</p> <p>Diseño Especifico: experimental in vitro</p> <p>Temporalidad: Prospectivo.</p> <p>Propósito: Aplicativo</p> <p>instrumento Ficha de recolección de datos</p> <p>Población y muestra 5 grupos de placas con medio de cultivo</p>

Anexo N° 2. Operacionalización de Variables

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Indicadores
INDEPENDIENTE: Extracto hidroalcohólico de las hojas del <i>Berberis vulgaris</i> (agracejo)	Producto de la maceración en alcohol 70% por 7 días, concentrado en estufa hasta eliminación del solvente, conservado y almacenado en envase de vidrio color ámbar. Administrado según la concentración y el peso corporal.	Maceración en alcohol 70% por 7 días, concentrado en estufa a 45°C.	Aplicación del extracto hidroalcohólico de las hojas del <i>Berberis vulgaris</i> (agracejo) frente a bacterias de <i>Staphylococcus aureus</i> .
Dependiente: Efecto Antibacteriano frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	Acción de administrar el extracto hidroalcohólico de las hojas del <i>Berberis vulgaris</i> (agracejo)	Evaluación del Efecto Antibacteriano del extracto hidroalcohólico de las hojas del <i>Berberis vulgaris</i> (agracejo)	Efecto de Antibacteriano.

Anexo N° 3. Certificado Botánico de *Berberis vulgaris* (agracejo)

Certificado botánico



UNAP

Herbarium Amazonense – AMAZ
Centro de Investigación de
Recursos Naturales

CONSTANCIA N°129-HA-CIRNA-UNAP

EL COORDINADOR DEL HERBARIUM AMAZONENSE ,AMAZ- CIRNA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA AMAZONIA PERUANA,DEJA CONSTANCIA QUE :

La muestra vegetal (rama fértil) ,recibida de **Marco Antonio Chumpe Ferrel**, Bachiller de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Inca Garcilaso de la Vega, ha sido estudiada y clasificada como: *Berberis vulgaris* L. tiene la siguiente posición taxonómica, según el sistema de clasificación APG IV (2016).

Clase : Dicotyledoneae.

Subclase: Dicotyledoneae..

Orden:..Ranunculales.

Familia: Berberidaceae

Género: *Berberis*.

Especie: *Berberis vulgaris* L.

Nombre Vulgar: "agracejo"

Determinados por: A.J.M. Leeuwenberg (WAG).1997.

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

Iquitos, 15 de Mayo del 2018

Atentamente,


Bigo. RICHARD J. HUARANCA ACOSTUPA, M.Sc.
Coordinador AMAZ-CIRNA-UNAP



Anexo N° 4. Certificado de análisis de agar Müller Hinton

Liofilchem® Certificate of Analysis

Page 1 of 1

Product	Batch	Expiration date	
Mueller Hinton II Agar	071817504	2020.10.31	
Ref. 610627 – 620627 – 6106275			
Physical quality control	Specification	Results	
Expected pH-value (25°C)	7.3 ± 0.2	7.3	
Appearance of powder	Fine, dry, homogeneous, free of extraneous material	Conforms	
Colour of powder	Beige	Conforms	
Appearance of prepared medium	Slightly opalescent	Conforms	
Colour of prepared medium	Amber	Conforms	
Microbiological Performance			
Tested according to CLSI M22-A3, EN ISO 11133, current CLSI and/or EUCAST methodology			
Antimicrobial Susceptibility Testing, Method of control: Disc Diffusion			
Control strains	Antimicrobial agent	Expected results Zone range (mm)	Results
Staphylococcus aureus ATCC® 25923	Amoxicillin-clavulanic acid AUG 30 (20+10) µg	28–36	Conforms
	Ampicillin-sulbactam AMS 20 (10+10) µg	29–37	Conforms
	Tetracycline TE 30 µg	24–30	Conforms
Staphylococcus aureus ATCC® 29213	Erythromycin ERY 15 µg	23–29	Conforms
	Rifampicin RD 5 µg	30–36	Conforms
	Trimethoprim-sulfamethoxazole SXT 25 (1.25+23.75) µg	26–32	Conforms
Escherichia coli ATCC® 25922	Amoxicillin-clavulanic acid AUG 30 (20+10) µg	18–24	Conforms
	Ampicillin AMP 10 µg	16–22	Conforms
	Gentamicin CN 10 µg	19–26	Conforms
	Tetracycline TE 30 µg	18–25	Conforms
	Trimethoprim-sulfamethoxazole SXT 25 (1.25+23.75) µg	23–29	Conforms
Pseudomonas aeruginosa ATCC® 27853	Ceftazidime CAZ 30 µg	22–29	Conforms
	Gentamicin CN 10 µg	17–21*	Conforms
	Ticarcillin-clavulanic acid TTC 85 (75+10) µg	20–28	Conforms
	Tobramycin TOB 10 µg	20–26	Conforms
Enterococcus faecalis ATCC® 29212	Trimethoprim-Sulfamethoxazole SXT 25 (1.25+23.75) µg	26–34	Conforms

*Adjusted to meet both CLSI and EUCAST requirements

Batch Release

Approved

Date

24.07.2017

Signature

Quality Control
(D. Vitagliano)

Dario Vitagliano


The results reported were obtained at the time of release.

Anexo N° 5. Certificado de análisis de Staphylococcus aureus



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0485 Lot Number: 485-405** Reference Number: ATCC® 6538™* Purity: Pure Passage from Reference: 2	Expiration Date: 2019/8/31 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2016/11/4
--	---

Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, convex, circular, glistening, smooth, creamy, opaque, beta hemolytic - both light gold and darker gold colonies may be present. A second colony type maybe present a white, circular, entire, low convex, and beta hemolytic.	Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters.	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  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 N° 6. Proceso de reactivación de cepas






ILLUSTRATED INSTRUCTIONS

- 1




Allow the unopened KWIK-STIK pouch to equilibrate to room temperature. Tear open pouch at notch and remove the KWIK-STIK unit.
- 2




Tear off pull-tab portion on the label and attach it to the primary culture plate or QC record. Do not disassemble the device during
- 3


Over the edge of the work bench or counter, crack the ampoule at the top of the KWIK-STIK (just below the fluid meniscus of the ampoule) found in the cap to release the hydrating fluid.
- 4



Hold vertically and tap on a hard surface to facilitate flow of the fluid through the shaft into the bottom of unit where the pellet is contained.
- 5



Using a pinching action on the bottom portion of the unit, crush the pellet in the fluid until the pellet suspension is homogenous.
- 6



Immediately heavily saturate the swab with the hydrated material and transfer to the appropriate agar medium, or use according to the laboratory's SOP.
- 7




Inoculate the primary culture plate(s) by gently rolling the swab over one-third of the plate.
- 8



Using a sterile loop, streak to facilitate colony isolation.
- 9

Using proper biohazard disposal, discard the KWIK-STIK


- 10

Immediately incubate the inverted inoculated primary culture plate(s) at temperature and conditions appropriate to the microorganism.

Culture method can be found on the product's page at microbiologics.com

Anexo N° 7. Hojas secas de Berberis vulgaris (agracejo)



Fuente: El Investigador.

Anexo N° 8. Proceso de secado de las hojas de Berberis vulgaris (agracejo)



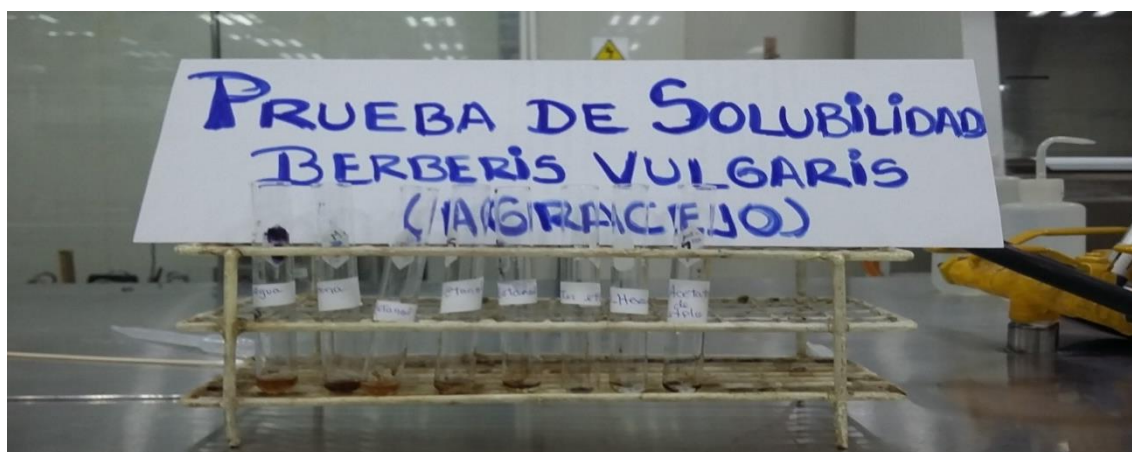
Fuente: El Investigador.

Anexo N° 9. Extracto seco de la muestra en investigación



Fuente: El Investigador.

Anexo N° 10. Prueba de solubilidad



Fuente: El Investigador

Anexo N° 11. Marcha fitoquímica



Fuente: El investigador

Anexo N° 12. Resultados de la cromatografía de capa fina



Fuente: El Investigador

Anexo N° 13. Concentraciones del Extracto hidroalcohólico e inóculo de *Staphylococcus aureus*



Fuente: El Investigador

Anexo N° 14. Vertido en placa del agar Mueller Hinton



Fuente: El Investigador

Anexo N° 15. Siembra bacteriana de *Staphylococcus aureus*



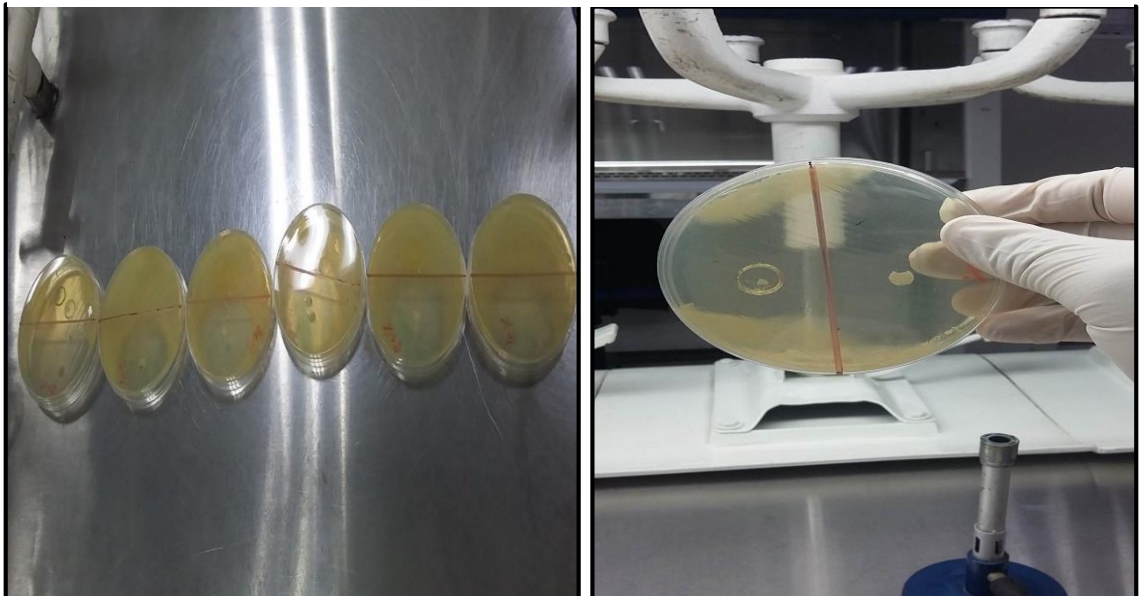
Fuente: El Investigador

Anexo N° 16. Lectura de resultados de los halos de inhibición



Fuente: El investigador

Anexo N° 17. Resultados de los halos de inhibición



Fuente: El investigador

Anexo N° 18. Ficha de observación de la Prueba de solubilidad



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

FICHA DE OBSERVACION DE PRUEBA DE SOLUBILIDAD “EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO

HIDROALCÓHOLICO DE LAS HOJAS DE *Berberis vulgaris* L. (agracejo) EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ESTUDIO IN VITRO”.

INSTRUCCIONES


- Antes de empezar con la evaluación, procure estar en un estado de equilibrio emocional y somático.
- Si se siente agotado, estresado o enfermo, aplaza la evaluación.
- Procure desarrollar todas las mediciones bajo las mismas circunstancias de comodidad.
- En el caso de no tener certeza sobre la medición de una determinada unidad de análisis, elimine su evaluación.
- Registre los datos sin tachaduras ni enmendaduras.
- Los espacios en los que no contenga información, táchelos con una línea

N°	SOLVENTES	RESULTADO
1	Acetona	
2	Agua Destilada	
3	Ciclohexano	
4	Cloroformo	
5	Etanol	
6	Éter de Petróleo	
7	Metanol	

Leyenda:

- Abundante +++
- Regular ++
- Poco +
- Ausencia -

Anexo N° 19. Ficha de validación de Prueba de solubilidad: Experto 1



Universidad Inca Garcilaso de la Vega
Nuevos Tiempos. Nuevas Ideas

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

1.- DATOS GENERALES

1.1. Apellidos y Nombres del Experto: Jacinto Harvas Pedro

1.2. Cargo e institución donde labora: Docente

1.3. Grado académico: Magister Q.P. Registro colegio profesional: 12197

1.4. Nombre del instrumento: Ficha de observación de la prueba de Solubilidad

1.5. Autor del instrumento: Marco Antonio Chupefennel

1.6. Instrucciones: Luego de analizar el instrumento y cotejar la investigación con la matriz de consistencia de la presente, le solicitamos que en base a su criterio y experiencia profesional, valide dicho instrumento para su aplicación.

Nota: Para cada criterio considere la escala de 1 a 5 donde:

1.-Muy poco	2.-Poco	3.-Regular	4.-Aceptable	5.-Muy aceptable
-------------	---------	------------	--------------	------------------

INDICADORES	CRITERIOS	PUNTUACIÓN				
		1	2	3	4	5
1.- Claridad	Esta formulado el instrumento con un lenguaje aplicado					X
2.- Objetividad	El instrumento evidencia recojo de datos observables					X
3.- Actualidad	El instrumento se adecua a los criterios científicos y tecnológicos					X
4.- Organización	El instrumento tiene una organización lógica					X
5.- Suficiente	Son suficientes en cantidad y calidad los elementos que conforman el instrumento					X
6.- Intencionalidad	Es adecuado para obtener datos relacionados al estudio fitoquímico y efecto antibacteriano in vitro de la planta mencionada					X
7.- Consistencia	Se basa en aspectos teóricos científicos de la Farmacognosia, Farmacología, y Microbiología					X
8.- Coherencia	Existe coherencia y relación de los ítems, indicadores, las dimensiones y las variables					X
9.- Metodología	La estrategia responde al propósito de la problemática de la investigación					X
10.- Pertinencia	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al método científico					X
Total Parcial						50
Total						50

Recomendaciones:


Promedio de valoración: 50

Puntuación

11-20	No valido, reformular
21-30	No valido, modificar
31-40	Valido, mejorar
41-50	Valido, aplicar

Firma RS Pedroza 10/11/17

Anexo N° 20. Ficha de validación de Prueba de solubilidad: Experto 2



Universidad Inca Garcilaso de la Vega
Nuevos Tiempos. Nuevas Ideas

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

1.- DATOS GENERALES

1.1. Apellidos y Nombres del Experto: Flores Lopez Oscar

1.2. Cargo e institución donde labora: Docente

1.3. Grado académico: Magister D.F. Registro colegio profesional: 19190

1.4. Nombre del instrumento: Ficha de Observación de la prueba de Solubilidad

1.5. Autor del instrumento: Marco Antonio Chupe Ferrel

1.6. Instrucciones: Luego de analizar el instrumento y cotejar la investigación con la matriz de consistencia de la presente, le solicitamos que en base a su criterio y experiencia profesional, valide dicho instrumento para su aplicación.

Nota: Para cada criterio considere la escala de 1 a 5 donde:

1.-Muy poco	2.-Poco	3.-Regular	4.-Aceptable	5.Muy aceptable
-------------	---------	------------	--------------	-----------------

INDICADORES	CRITERIOS	PUNTUACIÓN				
		1	2	3	4	5
1.- Claridad	Esta formulado el instrumento con un lenguaje aplicado					X
2.- Objetividad	El instrumento evidencia recojo de datos observables					X
3.- Actualidad	El instrumento se adecua a los criterios científicos y tecnológicos					X
4.- Organización	El instrumento tiene una organización lógica					X
5.- Suficiente	Son suficientes en cantidad y calidad los elementos que conforman el instrumento					X
6.- Intencionalidad	Es adecuado para obtener datos relacionados al estudio fitoquímico y efecto antibacteriano in vitro de la planta mencionada					X
7.- Consistencia	Se basa en aspectos teóricos científicos de la Farmacognosia, Farmacología, y Microbiología					X
8.- Coherencia	Existe coherencia y relación de los ítems, indicadores, las dimensiones y las variables					X
9.- Metodología	La estrategia responde al propósito de la problemática de la investigación					X
10.- Pertinencia	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al método científico					X
Total Parcial						50
Total						50

Recomendaciones:

Promedio de valoración: 50

Puntuación

11-20	No valido, reformular
21-30	No valido, modificar
31-40	Valido, mejorar
41-50	Valido, aplicar

Firma Oscar Flores
19190

Anexo N° 21. Ficha de observación de Marcha fitoquímica



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

FICHA DE OBSERVACION DE PRUEBA DE MARCHA FITOQUIMICA

“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO

HIDROALCÓHOLICO DE LAS HOJAS DE *Berberis vulgaris* L.

**(agracejo) EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ESTUDIO IN
VITRO”.**

INSTRUCCIONES


- Antes de empezar con la evaluación, procure estar en un estado de equilibrio emocional y somático.
- Si se siente agotado, estresado o enfermo, aplaza la evaluación.
- Procure desarrollar todas las mediciones bajo las mismas circunstancias de comodidad.
- En el caso de no tener certeza sobre la medición de una determinada unidad de análisis, elimine su evaluación.
- Registre los datos sin tachaduras ni enmendaduras.
- Los espacios en los que no contenga información, táchelos con una línea

METABOLITO	REACTIVOS	REACCION POSITIVA	RESULTADO
Carbohidratos	Molish	Anillo violeta	
	Antrona	Color verde	
	Fehling	Coloración rojo ladrillo	
Compuestos Fenólicos	FeCl ₃	Coloración verde o azul	
Taninos	Gelatina	Precipitado denso blanco	
Flavonoides	Shinoda	Color rojo	
Antocianinas y Flavonoides Catéquicos	Rosenheim	Coloración rojo oscuro	
Aminoácidos Libres y Grupos Amino	Ninhidrina (0.1% en Etanol)	Coloración violácea	
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado naranja	
	Mayer	Precipitado blanco	
	Bertrand	Precipitado blanco	
	Sonnenschein	Precipitado amarillo verdoso	
Naftaquinonas, Antraquinonas y antranonas	Borntrager	Coloración roja	
Triterpenoides y Esteroides	Lieberman-Burchard	Coloración verde azul: Esteroides. Coloración rojo naranja: Triterpenoides	
Saponinas	Generación de Espuma	Formación de 0.5 a 1 cm de espuma estable por 15 min.	
Glicósidos	Baljet	Coloración anaranjada	
Cumarinas	NH ₄ OH cc ó NaOH 10%	Fluorescencia celeste	

Leyenda:

- Abundante +++
- Regular ++
- Poco +
- Ausencia -

Anexo N° 22. Ficha de validación de Marcha fitoquímica: Experto 1



Universidad Inca Garcilaso de la Vega
Nuevos Tiempos. Nuevas Ideas

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

1.- DATOS GENERALES

1.1. Apellidos y Nombres del Experto: Flores Lopez Oscar

1.2. Cargo e institución donde labora: Docente

1.3. Grado académico: Magister Registro colegio profesional: 1990

1.4. Nombre del instrumento: Ficha de Observación de Marcha Fitoquímica

1.5. Autor del instrumento: Marco Antonio Chua Ferrer

1.6. Instrucciones: Luego de analizar el instrumento y cotejar la investigación con la matriz de consistencia de la presente, le solicitamos que en base a su criterio y experiencia profesional, valide dicho instrumento para su aplicación.

Nota: Para cada criterio considere la escala de 1 a 5 donde:

1.-Muy poco	2.-Poco	3.-Regular	4.-Aceptable	5.-Muy aceptable
-------------	---------	------------	--------------	------------------

INDICADORES	CRITERIOS	PUNTUACIÓN				
		1	2	3	4	5
1.- Claridad	Esta formulado el instrumento con un lenguaje aplicado					X
2.- Objetividad	El instrumento evidencia recojo de datos observables					X
3.- Actualidad	El instrumento se adecua a los criterios científicos y tecnológicos					X
4.- Organización	El instrumento tiene una organización lógica					X
5.- Suficiente	Son suficientes en cantidad y calidad los elementos que conforman el instrumento					X
6.- Intencionalidad	Es adecuado para obtener datos relacionados al estudio fitoquímico y efecto antibacteriano in vitro de la planta mencionada					X
7.- Consistencia	Se basa en aspectos teóricos científicos de la Farmacognosia, Farmacología, y Microbiología					X
8.- Coherencia	Existe coherencia y relación de los ítems, indicadores, las dimensiones y las variables					X
9.- Metodología	La estrategia responde al propósito de la problemática de la investigación					X
10.- Pertinencia	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al método científico					X
Total Parcial						50
Total						50

Recomendaciones:

Promedio de valoración: 50 Puntuación

Firma: [Firma]

2019

11-20	No valido, reformular
21-30	No valido, modificar
31-40	Valido, mejorar
41-50	Valido, aplicar

Anexo N° 23. Ficha de validación de Marcha fitoquímica: Experto 2

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOLÓGICAS

1.- DATOS GENERALES

1.1. Apellidos y Nombres del Experto: Juan Carlos Herrera Pizarro

1.2. Cargo e institución donde labora: Docente

1.3. Grado académico: Mag. en Q.F. Registro colegio profesional: 18197

1.4. Nombre del instrumento: Formulario de validación de Marcha fitoquímica

1.5. Autor del instrumento: Francisco Antonio Choza Firre

1.6. Instrucciones: Luego de analizar el instrumento y cotejar la investigación con la matriz de consistencia de la presente, le solicitamos que en base a su criterio y experiencia profesional, valide dicho instrumento para su aplicación.

Nota: Para cada criterio considere la escala de 1 a 5 donde:

1. Muy poco	2. Poco	3. Regular	4. Aceptable	5. Muy aceptable
-------------	---------	------------	--------------	------------------

INDICADORES	CRITERIOS	PUNTUACIÓN				
		1	2	3	4	5
1.- Claridad	Está formulado el instrumento con un lenguaje aplicado					✓
2.- Objetividad	El instrumento evidencia recojo de datos observables					✓
3.- Actualidad	El instrumento se adecua a los criterios científicos y tecnológicos					✓
4.- Organización	El instrumento tiene una organización lógica					✓
5.- Suficiencia	Son suficientes en cantidad y calidad los elementos que conforman el instrumento					✓
6.- Intencionalidad	Es adecuado para obtener datos relacionados al estudio fitoquímico y efecto antibacteriano in vitro de la planta mencionada					✓
7.- Consistencia	Se basa en aspectos teóricos científicos de la Farmacognosia, Farmacología, y Microbiología					✓
8.- Coherencia	Existe coherencia y relación de los ítems, indicadores, las dimensiones y las variables					✓
9.- Metodología	La estrategia responde al propósito de la problemática de la investigación					✓
10.- Pertinencia	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al método científico					✓
Total Parcial						50
Total						50

Recomendaciones: _____

Promedio de valoración: 50

Puntuación

11-20	No válido, reformular
21-30	No válido, modificar
31-40	Válido, mejorar
41-50	Válido, aplicar

Firma: [Firma] (15/12/10)

Anexo N° 24. Ficha de observación de la Actividad antibacteriana



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

FICHA DE OBSERVACION DE PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA

“EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO HIDROALCÓHOLICO DE LAS HOJAS DE *Berberis vulgaris* L. (agracejo) EN CEPAS DE *Staphylococcus aureus* ESTUDIO IN VITRO”.

INSTRUCCIONES

- Antes de empezar con la evaluación, procure estar en un estado de equilibrio emocional y somático.
- Si se siente agotado, estresado o enfermo, aplaza la evaluación.
- Procure desarrollar todas las mediciones bajo las mismas circunstancias de comodidad.
- En el caso de no tener certeza sobre la medición de una determinada unidad de análisis, elimine su evaluación.
- Registre los datos sin tachaduras ni enmendaduras.
- Los espacios en los que no contenga información, táchelos con una línea

N° de los Medios	Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis vulgaris</i> (agracejo) al 10%		Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis vulgaris</i> (agracejo) al 20%		Extracto hidroalcohólico de las hojas de <i>Berberis vulgaris</i> (agracejo) al 30%	
	<i>Berberis vulgaris</i> 10%	Azitromicina	<i>Berberis vulgaris</i> 20%	Azitromicina	<i>Berberis vulgaris</i> 30%	Azitromicina
1						
2						
3						
4						
5						
6						
Media						

Anexo N° 25. Ficha de validación de la Actividad antibacteriana: Experto 1

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

1.- DATOS GENERALES

1.1. Apellidos y Nombres del Experto: José Luis Méndez Roldán

1.2. Cargo e institución donde labora: Docente

1.3. Grado académico: Magister en Farmacia Registro colegio profesional: 12193

1.4. Nombre del instrumento: Ficha de Observación de la Actividad de la Investigación en Farmacología

1.5. Autor del instrumento: Marco Antonio Chaves Fierro

1.6. Instrucciones: Luego de analizar el instrumento y cotejar la investigación con la matriz de consistencia de la presente, le solicitamos que en base a su criterio y experiencia profesional, valide dicho instrumento para su aplicación.

Nota: Para cada criterio considere la escala de 1 a 5 donde:

1.-Muy poco	2.-Poco	3.-Regular	4.-Aceptable	5.-Muy aceptable
-------------	---------	------------	--------------	------------------

INDICADORES	CRITERIOS	PUNTAJE				
		1	2	3	4	5
1.- Claridad	Está formulado el instrumento con un lenguaje aplicado					✓
2.- Objetividad	El instrumento evidencia recojo de datos observables					✓
3.- Actualidad	El instrumento se adecua a los criterios científicos y tecnológicos					✓
4.- Organización	El instrumento tiene una organización lógica					✓
5.- Suficiente	Son suficientes en cantidad y calidad los elementos que conforman el instrumento					✓
6.- Intencionalidad	Es adecuado para obtener datos relacionados al estudio fitoquímico y efecto antibacteriano in vitro de la planta mencionada					✓
7.- Consistencia	Se basa en aspectos técnicos científicos de la Farmacognosia, Farmacología, y Microbiología					✓
8.- Coherencia	Existe coherencia y relación de los ítems, indicadores, las dimensiones y las variables					✓
9.- Metodología	La estrategia responde al propósito de la problemática de la investigación					✓
10.- Pertinencia	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al método científico					✓
Total Parcial						50
Total						50

Recomendaciones:


Promedio de valoración: 50

Puntuación:

11-20	No válido, reformular
21-30	No válido, modificar
31-40	Válido, mejorar
41-50	Válido, aplicar

Firma [Firma]

Anexo N° 26. Ficha de validación de la Actividad antibacteriana: Experto 2


Inca Garcilaso de la Vega
 Nuevos Tiempos. Nuevas Ideas

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

1.- DATOS GENERALES

1.1. Apellidos y Nombres del Experto: Flores Lopez Oscar

1.2. Cargo e institución donde labora: Docente

1.3. Grado académico: Magister Q.P. Registro colegio profesional: 19190

1.4. Nombre del instrumento: Ficha de Observación de la Actividad antibacteriana

1.5. Autor del instrumento: Marco Antonio Chaga Ferrel

1.6. Instrucciones: Luego de analizar el instrumento y cotejar la investigación con la matriz de consistencia de la presente, le solicitamos que en base a su criterio y experiencia profesional, valide dicho instrumento para su aplicación.

Nota: Para cada criterio considere la escala de 1 a 5 donde:

1.-Muy poco	2.-Poco	3.-Regular	4.-Aceptable	5.Muy aceptable
-------------	---------	------------	--------------	-----------------

INDICADORES	CRITERIOS	PUNTUACIÓN				
		1	2	3	4	5
1.- Claridad	Esta formulado el instrumento con un lenguaje aplicado					X
2.- Objetividad	El instrumento evidencia recojo de datos observables					X
3.- Actualidad	El instrumento se adecua a los criterios científicos y tecnológicos					X
4.- Organización	El instrumento tiene una organización lógica					X
5.- Suficiente	Son suficientes en cantidad y calidad los elementos que conforman el instrumento					X
6.- Intencionalidad	Es adecuado para obtener datos relacionados al estudio fitoquímico y efecto antibacteriano in vitro de la planta mencionada					X
7.- Consistencia	Se basa en aspectos teóricos científicos de la Farmacognosia, Farmacología, y Microbiología					X
8.- Coherencia	Existe coherencia y relación de los ítems, indicadores, las dimensiones y las variables					X
9.- Metodología	La estrategia responde al propósito de la problemática de la investigación					X
10.- Pertinencia	El instrumento muestra la relación entre los componentes de la investigación y su adecuación al método científico					80
Total Parcial						50
Total						50

Recomendaciones:

Promedio de valoración: 50

Puntuación

11-20	No valido, reformular
21-30	No valido, modificar
31-40	Valido, mejorar
41-50	Valido, aplicar

Firma: Oscar Flores
19190