

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE *Cestrum auriculatum* "HIERBA SANTA"
FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
y *Escherichia coli* ATCC 25922 - TACNA 2024**

TESIS

Presentada por:

Bach. María Mercedes Paredes Mamani

Para optar el Título Profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

TACNA – PERÚ

2025

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN

Facultad de Ciencias de la Salud

Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO
ETANÓLICO DE *Cestrum auriculatum* "HIERBA SANTA"
FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
y *Escherichia coli* ATCC 25922 – TACNA 2024**

TESIS

Presentada por:

Bach. MARÍA MERCEDES PAREDES MAMANI

Para optar el Título Profesional de:

QUÍMICO FARMACÉUTICO

Aprobada por UNANIMIDAD, ante el siguiente jurado



Dra. Lourdes Adriana Luque Ramos
Presidente



M.Sc. Juan José Vargas Mamani
Miembro



Mgr. Juan Carlos Efraín Cervantes Zegarra
Miembro



Mgr. Juan Carlos Efraín Cervantes Zegarra
Asesor

CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, **Mgr. Juan Carlos Efraín Cervantes Zegarra**, en mi condición de asesor acreditado por la Resolución de Facultad N° 13313-2024-FACS-UNJBG, de la tesis de investigación titulada: **ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE *Cestrum auriculatum* "HIERBA SANTA" FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922 - TACNA 2024**. Presentado por la bachiller **María Mercedes Paredes Mamani** para optar el título profesional de **QUÍMICO FARMACÉUTICO**.

Habiendo cumplido con lo establecido en el reglamento de originalidad y de similitud de trabajos de investigación y producción intelectual, considerando que según la revisión, evaluación y análisis realizado a través del software de similitud textual **TURNITIN**, cuenta con el nivel de similitud permitido cuyo porcentaje es de **8%**.

Por lo que **CERTIFICO LA SIMILARIDAD** de la tesis enunciada líneas arriba, la cual está expedita para continuar con los trámites para la obtención de Título Profesional de Químico Farmacéutico, según corresponda consiguientemente la publicación en el repositorio institucional.

Mgr. Juan Carlos Efraín Cervantes Zegarra
DNI: 00797995



Bach. María Mercedes Paredes Mamani
DNI: 74560869



DEDICATORIA

A Dios, por tener un propósito conmigo, enseñarme y ser mi soporte en cada situación de mi vida.

A mi amado esposo, por su amor, por ser mi apoyo incondicional y el compañero idóneo que Dios puso en mi camino.

A Santiago, mi pequeño que inspira mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A Mgr. Juan Carlos Efraín Cervantes Zegarra por brindarme su asesoría y consejos para la realización de la presente tesis.

A mis jurados de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, con profundo agradecimiento por compartir sus conocimientos y experiencia, las cuales valoro enormemente.

Finalmente, agradezco a todas las personas que me apoyaron a lo largo de este camino, haciendo posible la culminación de mi tesis.

ÍNDICE

	Pág.
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE	vi
ÍNDICE DE TABLAS	ix
ÍNDICE DE GRÁFICOS	xi
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	4
1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA.....	6
1.2.1. PROBLEMA PRINCIPAL.....	6
1.2.2. PROBLEMAS SECUNDARIOS	6
1.3 JUSTIFICACIÓN	7
1.4. OBJETIVOS	9
1.4.1. Objetivo general	9
1.4.2. Objetivos específicos.....	10
1.5. HIPÓTESIS	10
1.6. DETERMINACIÓN DE VARIABLES	11

1.6.1. Variable dependiente.....	11
1.6.2. Variable independiente.....	11
1.7. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	12
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	13
2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN.....	13
2.2. BASES TEÓRICAS	21
2.2.1. <i>Cestrum auriculatum</i> “Hierba Santa”	21
2.2.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	23
2.2.3. <i>Escherichia coli</i>	29
2.2.4. Medios de cultivo	33
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	41
3.1. TIPO, DISEÑO Y NIVEL DE LA INVESTIGACIÓN.....	41
3.1.1. Tipo de investigación	41
3.1.2. Diseño de investigación.....	42
3.1.3. Nivel de la investigación	42
3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA.....	43
3.2.1. Población.....	43
3.2.2. Muestra.....	43
3.3. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN	43
3.3.1. Materiales e instrumentos.....	44

3.3.1. Procedimientos	48
3.4. ANÁLISIS DE DATOS	63
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	65
DISCUSIÓN	88
CONCLUSIONES	96
RECOMENDACIONES.....	98
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
ANEXOS.....	103

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Halos de inhibición por el método de difusión del disco Kirby Bauer del extracto etanólico de “Hierba Santa” frente a *Staphylococcus aureus*. 65
- Tabla 2.** Prueba de ANOVA H de un factor para la evaluación de la variabilidad de los halos de inhibición a diferentes concentraciones del extracto etanólico de Hierba Santa frente a *Staphylococcus aureus*. 68
- Tabla 3.** Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples de los promedios de los halos de inhibición a diferentes concentraciones del extracto etanólico de Hierba Santa frente a *Staphylococcus aureus*. 70
- Tabla 4.** Nivel de sensibilidad según Duraffourd y Lapraz de los halos de inhibición del extracto etanólico de Hierba Santa frente a *Staphylococcus aureus*. 71
- Tabla 5.** Halos de inhibición por el método de la difusión del disco Kirby Bauer para determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de Hierba Santa frente a *Escherichia coli*. 73
- Tabla 6.** Prueba de ANOVA H de un factor para la evaluación de la variabilidad de los halos de inhibición a diferentes

	concentraciones del extracto etanólico de Hierba Santa frente a <i>Escherichia coli</i>	76
Tabla 7.	Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples de los promedios de los halos de inhibición a diferentes concentraciones del extracto etanólico de Hierba Santa frente a <i>Escherichia coli</i>	78
Tabla 8.	Nivel de sensibilidad según Duraffourd y Lapraz de los halos de inhibición del extracto etanólico de Hierba Santa frente a <i>Escherichia coli</i>	79
Tabla 9.	Identificación colorimétrica de metabolitos en el extracto etanólico de Hierba Santa.....	81
Tabla 10.	.Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de Hierba Santa frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	82
Tabla 11.	Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de Hierba Santa frente a <i>Escherichia coli</i> .	84
Tabla 12.	Concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de Hierba Santa frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	86
Tabla 13.	Concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de Hierba Santa frente a <i>Escherichia coli</i>	87

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1.	Promedios de los halos de inhibición del extracto etanólico de “Hierba Santa” frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	66
Gráfico 2.	Relación entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Hierba Santa</i> y el nivel de sensibilidad frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	72
Gráfico 3.	Promedios de los halos de inhibición del extracto etanólico de <i>Hierba Santa</i> frente a <i>Escherichia coli</i>	74
Gráfico 4.	Relación entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Hierba Santa</i> y el nivel de sensibilidad frente a <i>Escherichia coli</i>	80

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. Recolección de la planta <i>Cestrum auriculatum</i> “Hierba santa”	104
ANEXO 2. Separación de las hojas con las otras partes de la planta <i>Cestrum auriculatum</i> “Hierba santa”	104
ANEXO 3. Proceso de lavado de las hojas <i>Cestrum auriculatum</i> “Hierba Santa”	105
ANEXO 4. Secado de las hojas <i>Cestrum auriculatum</i> “Hierba Santa”	105
ANEXO 5. Certificado de la planta <i>Cestrum auriculatum</i> “Hierba Santa”	106
ANEXO 6. Realización de envoltura y esterilización de los materiales.....	107
ANEXO 7. Trituración y pesado de las hojas de <i>Cestrum auriculatum</i> “Hierba santa”	107
ANEXO 8. Verter alcohol 70°, forrar la botella con papel aluminio y lo almacenamos.....	108
ANEXO 9. Filtrado	108
ANEXO 10. Preparación del agar Müller Hinton.....	109
ANEXO 11. Preparación del caldo Infusión Cerebro Corazón.....	109
ANEXO 12. Preparación del agar Nutritivo	110
ANEXO 13. Primer paso (se realizó la suspensión de ambos agentes bacterianos).....	110
ANEXO 14. Segundo paso (con la suspensión anterior del tubo de ensayo ahora se realiza el cultivo en viales por siembra en estría y agotamiento de ambos agentes bacterianos)	111

ANEXO 15. Tercer paso (teniendo los viales con crecimiento bacteriano se realiza la última suspensión de ambos agentes bacterianos)	111
ANEXO 16. Para ambos agentes bacterianos se realizó Nefelometría de McFarland (en los tres procedimientos se metieron en la incubadora)	112
ANEXO 17. Inactivación de los discos	112
ANEXO 18. Preparación de las concentraciones del extracto	113
ANEXO 19. Embebiendo a cada disco con su respectiva concentración	113
ANEXO 20. Agregando la suspensión bacteria y realizando la siempre por diseminación en superficie	114
ANEXO 21. Agregando los discos de sensibilidad con el respectivo porcentaje del extracto en las placas	114
ANEXO 22. Medición de los halos de inhibición.....	115
ANEXO 23. Preparación de las diluciones para la determinación del CMI	115
ANEXO 24. Resultados de la determinación de la CMI para <i>Staphylococcus aureus</i>	116
ANEXO 25. Resultados de la determinación de la CMI para <i>Escherichia coli</i> ..	116
ANEXO 26. Resultados de la determinación de la Concentración Mínima Bactericida para <i>Staphylococcus aureus</i>	117
ANEXO 27. Resultados de la determinación de la Concentración Mínima Bactericida para <i>Escherichia coli</i>	117
ANEXO 28. Preparación de los reactivos para la marcha fitoquímica.....	122

RESUMEN

El presente estudio evaluó la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* "Hierba Santa" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Para ello, se realizó una investigación aplicada, prospectiva, transversal y experimental. La planta fue recolectada en el distrito de Pocollay, y se realizó un estudio taxonómico en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Se cultivaron las cepas bacterianas y expusieron a diferentes concentraciones del extracto etanólico de Hierba Santa (EHS, 20, 40, 60, 80 y 100%). El análisis fitoquímico colorimétrico del EHS evidenció taninos, diterpenoides, flavonoides y alcaloides. Asimismo, a partir de una concentración del 60% y 80% el EHS presentó actividad antibacteriana frente *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, respectivamente. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para *Staphylococcus aureus* fue de 53,33%, y para *Escherichia coli* fue de 71,11%, mientras que la Concentración Mínima Bactericida (CMB) fue de 55,56% y 71,11%, respectivamente. En conclusión, el EHS mostró actividad antibacteriana frente a ambas cepas patológicas.

Palabras clave: *Cestrum auriculatum*, actividad antibacteriana, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

ABSTRACT

The present study evaluated the in vitro antibacterial activity of the ethanolic extract of *Cestrum auriculatum* “Hierba Santa” against *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 and *Escherichia coli* ATCC 25922. For this purpose, an applied, prospective, cross-sectional and experimental investigation was carried out. The plant was collected in the district of Pocollay, and a taxonomic study was carried out at the Faculty of Sciences of the Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. The bacterial strains were cultured and exposed to different concentrations of the ethanolic extract of Hierba Santa (EHS, 20, 40, 40, 60, 80 and 100%). Phytochemical colorimetric analysis of EHS showed tannins, diterpenoids, flavonoids and alkaloids. Also, from a concentration of 60% and 80% EHS showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, respectively. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for *Staphylococcus aureus* was 53.33%, and for *Escherichia coli* it was 71.11%, while the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) was 55.56% and 71.11%, respectively. In conclusion, EHS showed antibacterial activity against both pathological strains.

Key words: *Cestrum auriculatum*, antibacterial activity, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana constituye una de las principales amenazas para la salud pública a nivel mundial. Este fenómeno ocurre cuando las bacterias desarrollan mecanismos que les permiten sobrevivir a los efectos de los antibióticos, reduciendo la eficacia de estos medicamentos y limitando las opciones terapéuticas disponibles. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en 2019 se registraron aproximadamente 1,27 millones de muertes directamente atribuibles a infecciones resistentes a los antimicrobianos (1).

En este contexto, las plantas medicinales emergen como una fuente prometedora de compuestos bioactivos con potencial actividad antibacteriana. Estas plantas, utilizadas durante siglos en diversas culturas, contienen una amplia variedad de sustancias activas, tales como flavonoides, terpenoides, alcaloides y ácidos fenólicos, que han demostrado propiedades antibacterianas en diversos estudios (2–4).

En relación a lo anterior, la actividad antibacteriana de diversas plantas medicinales ha sido objeto de múltiples estudios, evidenciando su

potencial contra patógenos comunes en entornos hospitalarios, como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Staphylococcus aureus representa una preocupación importante en el ámbito médico debido a su capacidad para causar una amplia gama de infecciones. Estas pueden ir desde afecciones cutáneas leves, como forúnculos y abscesos, hasta enfermedades graves y potencialmente mortales, incluyendo neumonía, meningitis, endocarditis (infección del revestimiento interno del corazón), sepsis y síndrome de shock tóxico. Además, es uno de los principales agentes etiológicos asociados a infecciones adquiridas tanto en entornos hospitalarios (infecciones nosocomiales) como en la comunidad, lo que refuerza su relevancia clínica y epidemiológica. (5)

Por otra parte, *Escherichia coli* es una bacteria gramnegativa que forma parte del microbiota normal del intestino grueso, donde actúa como un comensal aeróbico. Sin embargo, algunas cepas patógenas de esta bacteria son capaces de causar enfermedades gastrointestinales, como diarrea, y todas pueden originar infecciones si logran invadir tejidos u otros órganos del cuerpo, agravando así cuadros clínicos preexistentes. (6)

Dicho lo anterior, diversos estudios han evaluado la actividad antibacteriana de extractos de plantas, y *Cestrum auriculatum* "Hierba Santa" no es la excepción. Investigaciones han demostrado que su extracto etanólico contiene compuestos fenólicos, flavonoides y otros metabolitos secundarios con potencial actividad antibacteriana (2,7,8).

En ese sentido, el presente estudio tiene como objetivo evaluar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* "Hierba Santa" contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Los resultados obtenidos servirán como fundamento para futuras investigaciones y potenciales aplicaciones terapéuticas.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

En Perú, *Escherichia coli* se asocia principalmente a infecciones del tracto urinario, mientras que *Staphylococcus aureus* es la principal causa de infecciones de piel y tejidos blandos, ambas con una alta prevalencia. En este contexto, la resistencia antimicrobiana representa un desafío creciente para el tratamiento de estas infecciones, lo que limita las opciones terapéuticas y resalta la necesidad de fortalecer la vigilancia epidemiológica y promover el uso responsable de antibióticos.

Además, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas se ha consolidado como una estrategia clave para abordar este problema de salud pública. En este sentido, la literatura científica ha documentado de manera extensiva la actividad antibacteriana de productos naturales contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, entre los cuales se destaca la Hierba Santa.

En un estudio realizado por Cruz Ymata y Zapata Miranda (2016), se evaluó "in vitro" la actividad antioxidante, antibacteriana y antifúngica del extracto alcohólico de las hojas de *Cestrum auriculatum*. Se encontró que el extracto presentó actividad contra bacterias Gram positivas (*Streptococcus pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*), Gram negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*) y hongos (*Cándida albicans* y *Microsporum sp.*).

Otro estudio, realizado por Godos (9), determinó que las hojas de Hierba Santa contenían polifenoles, los cuales presentaron actividad antioxidante del método de Folin- Ciocalteu. No obstante, estudios señalan que los polifenoles también presentan actividad antibacteriana. (10)

Así, la investigación de Delgado et al (2) (2021), señaló que la Hierba Santa es una planta con potencial actividad antibacteriana para el tratamiento de enfermedades respiratorias, incluso aquellas que estén relacionadas con el COVID-19.

Expuesto lo anterior, el presente estudio busca evaluar la actividad antibacteriana de *Cestrum auriculatum* "Hierba Santa" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Esta

investigación se inicia a partir de la problemática de resistencia antibacteriana a fármacos y desde nuestro entorno tradicional la utilización de plantas medicinales que nos otorga una opción importante para el desarrollo científico de nuevos fitomedicamentos para tratar infecciones bacterianas.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

1.2.1. Problema principal

¿Tendrá actividad antibacteriana in vitro el extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* "Hierba Santa" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922 - Tacna 2024?

1.2.2. Problemas secundarios

- a) ¿Cuáles serán los metabolitos secundarios que están presentes en el extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* "Hierba Santa"?

- b) ¿Cuál será la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* “Hierba Santa” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922 - Tacna 2024?
- c) ¿Cuál será la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* “Hierba Santa” es efectiva contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922 - Tacna 2024?

1.3 JUSTIFICACIÓN

El presente estudio reviste gran importancia, ya que, en la ciudad de Tacna, no se han identificado investigaciones previas que evalúen la actividad antibacteriana de *Cestrum auriculatum* “Hierba Santa”. Esta planta se encuentra ampliamente distribuida en diversas regiones del Perú y su uso en la medicina tradicional está extendido gracias a su fácil acceso y bajo costo. Estas características la convierten en una potencial fuente de compuestos bioactivos que podrían ser utilizados como alternativas terapéuticas frente a infecciones bacterianas comunes.

Por otra parte, en el Perú algunos estudios a nivel nacional han reportado que *Cestrum auriculatum* posee actividad antibacteriana frente a ciertas cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas. Estos antecedentes constituyen una base valiosa y proporcionan sustento teórico para la presente investigación, aunque aún no se ha abordado específicamente su efecto sobre cepas de referencia estandarizadas (7,11).

Este estudio busca determinar si el extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* presenta actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (bacteria Gram positiva) y *Escherichia coli* ATCC 25922 (bacteria Gram negativa), utilizando métodos microbiológicos estandarizados como la difusión en disco y la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Esta aproximación permitirá determinar con mayor precisión la eficacia del extracto frente a cepas de relevancia clínica y microbiológica.

Los resultados permitirán establecer si esta planta medicinal representa una opción terapéutica alternativa y complementaria, especialmente relevante ante el aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos convencionales. De comprobarse su eficacia, los

hallazgos podrían contribuir significativamente al desarrollo de nuevos tratamientos basados en recursos naturales, con beneficios tanto en la salud pública como en la sostenibilidad del sistema de atención médica.

Por último, esta investigación se alinea con los objetivos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en relación con la promoción del uso racional de medicamentos de origen natural y el fortalecimiento de la investigación en medicina tradicional (12).

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo general

Determinar la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* “Hierba santa” frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922 - Tacna 2024

1.4.2. Objetivos específicos

- a) Identificar los metabolitos secundarios que están presentes en el extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* "Hierba Santa".
- b) Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* "Hierba Santa" frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922 - Tacna 2024.
- c) Determinar la concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* "Hierba Santa" es efectiva contra *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922 - Tacna 2024.

1.5. HIPÓTESIS

Hipótesis alterna (Ha): El extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* "Hierba santa" presenta actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922 - Tacna 2024.

Hipótesis nula (Ho): El extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* “Hierba santa” no presenta actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922 - Tacna 2024.

1.6. DETERMINACIÓN DE VARIABLES

1.6.1. Variable dependiente

Actividad antibacteriana

1.6.2. Variable independiente

Extracto etanólico de “Hierba Santa”

1.7. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLES	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	VALOR FINAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA
Variable dependiente	Capacidad de los compuestos bioactivos presentes en esa planta para inhibir el crecimiento o eliminar las bacterias patógenas	Se evaluará mediante tres pruebas microbiológicas: 1) método de difusión en disco (Kirby-Bauer), 2) concentración mínima inhibitoria (CMI), y 3) concentración mínima bactericida (CMB), aplicadas al extracto etanólico de <i>Cestrum auriculatum</i> frente a cepas ATCC.	Halos de inhibición Concentración mínima inhibitoria (CMI) Concentración mínima bactericida (CMB)	En mm. Porcentaje de la concentración (%) Porcentaje de la concentración (%)	Numérica Numérica Numérica	Continua Continua Continua
Variable independiente	Preparación concentrada obtenida mediante la maceración o extracción de los compuestos bioactivos presentes en la planta utilizando etanol (alcohol etílico) como solvente.	Preparación de la solución a través de la técnica de trituración de las hojas, macerado y filtrado.	Soluciones a diferentes concentraciones del activo. Metabolitos secundarios	Porcentaje (%) de diferentes concentraciones Presencia (+, ++, +++) Ausencia (-)	Numérica Nominal	Continua Dicotómica

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

2.1.1 Antecedentes internacionales

Trujillo-Santiago et al. (8), realizó en México la investigación titulada: ***“Efectos de la Hierba Santa (Piper auritum Kunth) sobre la inhibición de la oxidación lipídica en hamburguesas de res”*** (2021), en la cual se evaluaron los efectos antioxidantes y antimicrobianos de extractos etanólicos (HSEE) de Hierba Santa (Piper auritum Kunth) a partir de polvo vegetal de tamaños de partícula 425 µm (EPA) y 850 µm (EPB) en hamburguesas de carne de res crudas y crudas-cocidas almacenadas durante 9 días a 4 °C, así como hamburguesas de carne de res crudas-congeladas y crudas-congeladas-cocidas almacenadas durante 90 días a -20 °C. Se prepararon cuatro tratamientos, incluyendo control (sin extracto), solución de ascorbato de sodio (NaASC a 500 mg/kg), MEPA (carne con HSEE de EPA a 750 mg/kg) y MEPB (carne con HSEE de EPB a 750 mg/kg). Se estudiaron las actividades antioxidantes y

antimicrobianas in vitro, así como el contenido total de fenoles, clorofila y carotenoides de HSEE. La composición química se evaluó en la carne de res utilizada para las hamburguesas. Se evaluaron las hamburguesas de carne de res para sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), pH, color, contenido de metamioglobina y carga microbiana. Los resultados indicaron que HSEE mostró actividad antioxidante in vitro y su incorporación en hamburguesas de carne de res inhibió la oxidación de lípidos en comparación con NaASC, mientras que el pH fue menor que el límite máximo permitido. Sin embargo, ni EPB ni EPA fueron efectivos para reducir el recuento total de bacterias (TBC) en hamburguesas de carne de res cruda. Por lo tanto, HSEE podría recomendarse como un antioxidante natural en hamburguesas de carne de res. (6)

Delgado et al. (2), realizaron el estudio titulado: “**Plantas Medicinales Peruanas y Cosmopolitas con Potencial Uso en el Tratamiento de Enfermedades Respiratorias y COVID-19**” (2021), en el cual analizaron las alternativas del uso de plantas medicinales, especialmente aquellas plantas tradicionalmente utilizadas en el tratamiento de enfermedades de las vías respiratorias, tanto en el Perú como en el mundo, sin riesgos ni

problemas colaterales para el ser humano y validadas con estudios fitoquímicos y etnofarmacológicos. La flora del Perú es particularmente rica en estas especies y más aún en especies endémicas, potencialmente útiles contra el SARS-CoV-2. El objetivo fue destacar algunas plantas medicinales peruanas y especies introducidas y comercializadas en el Perú (especies Cosmopolitan) potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades respiratorias y COVID-19. Entre las plantas que resaltaron por su uso en este tipo de enfermedades fue la Hierba Santa de las especies *Centrum hediondinum* Dun y *Cestrum auriculatum* L'Hér.

Bussmann et al. (13), realizaron la investigación: **“Demostrando que el conocimiento tradicional funciona: La actividad antibacteriana de las plantas medicinales del norte del Perú”** (2011), que tuvo como objetivo comprobar si las plantas tradicionalmente utilizadas para tratar infecciones mostraban efectividad antibacteriana y, a partir de ello, identificar posibles candidatas para estudios más avanzados sobre concentración mínima inhibitoria (CMI) y toxicidad. La evaluación se realizó frente a cuatro bacterias de importancia clínica: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhi y *Pseudomonas*

aeruginosa. Los resultados mostraron que 193 extractos etanólicos y 31 extractos acuosos fueron activos contra *S. aureus*, siendo esta la bacteria más susceptible. En 21 casos, solo el extracto acuoso presentó actividad. Sin embargo, ninguno de los extractos acuosos fue activo frente a las otras tres bacterias, y la actividad de los extractos etanólicos también fue limitada: solo 36 mostraron alguna inhibición frente a *E. coli*, y apenas 3 frente a *S. Typhi* y *P. aeruginosa*. Del total de extractos analizados, 225 procedían de plantas que se emplean tradicionalmente para tratar infecciones bacterianas. De estos, 166 (equivalente al 73.8%) mostraron actividad contra al menos una de las bacterias evaluadas. En contraste, entre los 300 extractos de especies sin uso antibacteriano tradicional, solo 96 (32%) evidenciaron alguna actividad. Entre las plantas que presentaron actividad antibacteriana, se encontró la hierba santa.

2.1.2 Antecedentes nacionales

Bendezu et al. (14), realizaron la investigación: **“Efecto antidiarrelco del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Cestrum auriculatum* “hierba santa” en ratones albinos”** (2022),

Se evaluaron seis cohortes de seis ratones cada una, sometidas a las siguientes intervenciones orales: G1 (control negativo) recibió solución fisiológica (10 ml/kg), G2 loperamida (0,2 ml), G3 aceite de ricino (0,2 ml) y G4, G5 y G6 el extracto hidroalcohólico de *Cestrum auriculatum* a 50, 150 y 300 mg/kg, respectivamente. Transcurridos 60 minutos, se administró 0,2 ml de carbón activado por vía oral a todos los grupos. El análisis fitoquímico reveló la presencia de alcaloides, taninos, flavonoides y compuestos fenólicos. El extracto presentó buena solubilidad en agua y etanol, menor en metanol, e insolubilidad en cloroformo, acetona, hexano y éter de petróleo. La dosis de 300 mg/kg alcanzó la mayor inhibición de la motilidad intestinal (35,5 %), seguida de 150 mg/kg (22,5 %) y 50 mg/kg (20,0 %). La loperamida mostró un efecto inhibitorio del 29,6 %, comparable al de 300 mg/kg ($p > 0,05$), pero significativamente superior a las demás dosis del extracto. En conclusión, el extracto hidroalcohólico de hojas de *Cestrum auriculatum* evidenció actividad antidiarreica dosis-dependiente en ratones.

Rodríguez (11), realizó la investigación titulada: ***“Determinación del efecto antibacteriano in vitro del aceite esencial de hojas de piper auritum (hierba santa) sobre cultivos***

de *Staphylococcus aureus*" (2021). El estudio, de enfoque experimental, explicativo y cuantitativo, fue de corte transversal y observacional. Su objetivo fue evaluar la eficacia antibacteriana in vitro del aceite esencial de hojas de *Piper auritum* (hierba sagrada) frente a *Staphylococcus aureus*, medida por el diámetro de los halos de inhibición. Los cultivos bacterianos se reactivaron y el material vegetal, recolectado en Lucma (Gran Chimú, La Libertad), se procesó mediante hidrodestilación con aparato Clevenger, obteniéndose 1,3 ml de aceite esencial (rendimiento: 0,028 ml/100 g de hojas). Este se diluyó en dimetilsulfóxido para preparar concentraciones al 25 % y 50 %. La actividad antibacteriana se determinó con el método de Kirby-Bauer en 20 placas de Petri distribuidas en tres grupos: control (solución salina), experimental 1 (25 %) y experimental 2 (50 %). El análisis estadístico (ANOVA y t de Student) mostró halos de inhibición de $13,45 \pm 0,60$ mm para el 25 % y $16,65 \pm 0,74$ mm para el 50 %, con significancia $< 0,05$. La investigación concluyó que el aceite esencial de *Piper auritum* presenta actividad antibacteriana in vitro contra *S. aureus*, siendo más efectiva la concentración al 50 %.

Godos (9), realizó el estudio: **“Actividad antioxidante y contenido de polifenoles en hojas de *Cestrum auriculatum* L’her (hierba santa)”** (2018), cuyo objetivo era evaluar la actividad antioxidante y la concentración de polifenoles en las hojas de *Cestrum auriculatum* L’Her. Las hojas de *Cestrum auriculatum* L’Her se extrajeron meticulosamente utilizando el método de eliminación de radicales libres DPPH para evaluar la actividad antioxidante y el método Folin-Ciocalteu para cuantificar el contenido de polifenoles. La investigación tenía como objetivo determinar la actividad antioxidante y el contenido de polifenoles en las hojas de *Cestrum auriculatum* L’Her. El estudio llevó a cabo una extracción exhaustiva de las hojas de *Cestrum auriculatum* L’Her. Se empleó el método de eliminación de radicales libres DPPH para evaluar la actividad antioxidante, mientras que se utilizó el método Folin-Ciocalteu para determinar la concentración de polifenoles.

Zapata (7), en Arequipa, realizó el estudio: **“Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica “in vitro” del extracto hidro-alcoholico de *cestrum hediondinum* dun. “hierba santa” en bacterias patógenas gram negativas, gram positivas y hongos”** (2017), que tuvo como

objetivo evaluar in vitro la actividad antibacteriana y antifúngica del extracto hidroalcohólico de *Cestrum hediondinum* Dun (“hierba sagrada”) frente a bacterias Gram positivas (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*), Gram negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi*) y hongos (*Candida albicans*, *Microsporum* sp.). Los microorganismos, procedentes del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de San Agustín, fueron evaluados mediante el método de dilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI), seguido de siembra en agar para establecer las concentraciones mínimas bactericidas y fungicidas (CMB/CMF). Los valores de CMI fueron: 50 mg/ml para *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *S. typhi*; 25 mg/ml para *S. pneumoniae* y *S. aureus*; y 12,5 mg/ml para *C. albicans* y *Microsporum* sp. Las CMB fueron de 100 mg/ml para *E. coli*, *P. aeruginosa* y *K. pneumoniae*; 50 mg/ml para *S. typhi* y *S. aureus*; y 25 mg/ml para *S. pneumoniae*.

2.2. BASES TEÓRICAS

2.2.1. *Cestrum auriculatum* “Hierba Santa”

2.2.1.1. Datos ambientales

La especie hierba santa (*Cestrum auriculatum*) se encuentra en áreas tropicales con una temperatura media anual de 23 a 26.5 °C, con una temperatura mínima anual de 20 a 26 °C aproximadamente, soportando temperaturas cercanas a 10°C, una humedad relativa del 80 al 90%, una media anual de 2 500 mm de precipitación, y altitudes de hasta 3 400 msnm.

Está predispuesta en terrenos de textura arenosa y arenolímica, pero también florece en terrenos arcillosos (15).

2.2.1.2. Descripción general

La planta conocida como *Cestrum auriculatum*, se desarrolla entre 500 y 3.400 metros sobre el nivel del mar en las proximidades de las acequias, riberas de ríos y arroyos. Se distingue como un

arbusto de aproximadamente tres metros de altura, con hojas de ápice agudo y flores tubulares de color amarillo. No obstante, el rasgo que más la resalta son sus características medicinales (16).

2.2.1.3. Clasificación taxonómica

- “Dominio: Eukaryota
- Reino: Plantae
- Filo: Magnoliophyta
- Clase: Magnoliopsida (= Dicotyledoneae)
- Orden: Solanales
- Familia: Solanaceae
- Género: *Cestrum*
- Especie: *auriculatum*” (17)

2.2.1.4. Composición química

De acuerdo a una investigación presentan (3,18)

- “Flavanonas
- Alcaloides
- Saponinas
- Digitotegina

- Solasodina
- Flavonas.
- Trazas de aceite esencial.
- Taninos, gomas, ácidos orgánicos (fórmico y acético)".

2.2.1.5. Propiedades medicinales

La hierba santa reduce el reumatismo, la temperatura alta (fiebre), los cólicos, los resfríos, el sarampión, las lesiones cutáneas, la diarrea, la bronquitis, el insomnio y las otitis. Además, combate el salpullido infantil, hemorroides, estomatitis, dispepsia, caspa, y inflamaciones bucofaríngeas. Además, actúa como emenagogo, astringente, sudorífico, ocular, sedante, analgésico muscular, depurativo y digestivo (19).

2.2.2. *Staphylococcus aureus*

2.2.2.1. Descripción

Los estafilococos son bacterias aeróbicas Gram-positivas. El *Staphylococcus aureus* es el más virulento de todos ellos, y suele

provocar infecciones cutáneas y, en ocasiones, neumonía, endocarditis y osteomielitis. Se asocia frecuentemente a la formación de abscesos. Ciertas cepas generan toxinas que provocan gastroenteritis, eritrodermia y síndrome de shock tóxico. El diagnóstico se establece mediante técnicas de tinción de Gram y cultivo. El tratamiento suele incluir betalactámicos resistentes a la penicilinasas; sin embargo, debido a la prevalente resistencia a los antibióticos, puede ser necesario recurrir a la vancomicina o a nuevos agentes alternativos (5).

2.2.2.2. Infecciones en la piel (20)

- “Forúnculos. Los forúnculos son el tipo de infección por estafilococo más común. Se trata de una acumulación de pus que se forma en un folículo piloso o una glándula sebácea. La piel que se encuentra por encima de la zona infectada suele enrojecerse e hincharse.
- Si un forúnculo se revienta, probablemente el pus se drenará. Los forúnculos aparecen, con mayor frecuencia, debajo de los brazos o alrededor de la ingle o de los glúteos.

- Impétigo. Esta erupción cutánea contagiosa, a menudo dolorosa, puede ser causada por estafilococos. El impétigo suele presentar ampollas grandes que pueden secretar líquido y formar una costra de color miel.
- Celulitis. La celulitis es una infección de las capas más profundas de la piel. Produce enrojecimiento e hinchazón en la superficie de la piel. También se pueden formar llagas o áreas de supuración de secreciones.
- Dermatitis exfoliativa estafilocócica. Las toxinas liberadas por los estafilococos pueden provocar dermatitis exfoliativa estafilocócica. Esta afección, que afecta principalmente a bebés y niños, se caracteriza por fiebre, sarpullido y a veces ampollas. Cuando la ampolla se revienta, la capa superior de piel se desprende. Queda una superficie roja y en carne viva que parece una quemadura.”

2.2.2.3. Intoxicación alimentaria (21)

Los *Staphylococcus spp.*, en particular *Staphylococcus aureus*, constituyen una de las principales etiologías de las intoxicaciones alimentarias de origen bacteriano. Esta bacteria puede proliferar en alimentos contaminados y producir enterotoxinas termoestables que, al ser ingeridas, desencadenan un cuadro clínico caracterizado por una gastroenteritis aguda de inicio súbito. Los síntomas suelen manifestarse en un lapso breve, típicamente entre 1 a 6 horas posteriores a la ingestión del alimento contaminado, e incluyen náuseas, vómitos intensos, dolor abdominal tipo cólico y, en algunos casos, diarrea. La sintomatología suele ser autolimitada y de corta duración, con resolución espontánea en un período aproximado de 12 a 24 horas en la mayoría de los casos.

Comúnmente, la infección alimentaria por estafilococos no genera cuadros febriles. No obstante, el cuadro sintomatológico incluye:

- Náuseas y vómitos
- Diarrea
- Deshidratación
- Presión arterial baja

2.2.2.4. Mecanismo de patogenicidad (20)

El *Staphylococcus aureus* alberga una serie de factores que explican su patogenicidad y su resistencia a los mecanismos de defensa del huésped y a los agentes antimicrobianos.

Examinamos su genoma, la pared de la bacteria, su cápsula, las proteínas de superficie, las toxinas producidas, las enzimas y otros componentes, junto con sus factores y determinantes de virulencia.

El genoma del estafilococo consiste en un cromosoma circular (de aproximadamente 2800 pares de bases), junto con profagos, plásmidos y transposones. Los genes asociados con la virulencia y la resistencia a los antibióticos se encuentran en el cromosoma y en elementos extracromosómicos. Estos genes pueden diseminarse entre diversas cepas de estafilococos, especies distintas y otras bacterias Gram-positivas mediante elementos extracromosómicos.

La pared celular de *Staphylococcus* contiene aproximadamente un 50 % de mureína (peptidoglicano) en peso

seco, formada por subunidades alternas de *N*-acetilglucosamina y ácido *N*-acetilmurámico unidas por enlaces β -1,4. Las cadenas de polisacáridos se enlazan mediante tetrapéptidos asociados al ácido *N*-acetilmurámico y un puente de pentaglicina característico de *Staphylococcus aureus*. El peptidoglicano presenta actividad endotóxica, estimulando la liberación de citocinas por macrófagos, la activación del complemento y la agregación plaquetaria. Sus variaciones estructurales entre cepas pueden influir en la capacidad de inducir coagulación intravascular diseminada.

Otros componentes relevantes incluyen ácidos teicoicos, como el ribitol, covalentemente unidos al peptidoglicano, y ácido lipoteicoico, un polímero de glicerol y fosfato anclado a la membrana citoplasmática mediante un glicolípido terminal.

La mayoría de los estafilococos poseen microcápsulas; se han identificado 11 tipos de polisacáridos capsulares, siendo los tipos 5 y 8 responsables de cerca del 75 % de las infecciones humanas. La mayoría de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina corresponden al tipo 5. La composición química de cuatro polisacáridos antifagocíticos, incluidos los tipos 5 y 8, ha sido

descrita, evidenciando una estrecha relación estructural entre ellos.

(17)

2.2.3. *Escherichia coli*

2.2.3.1. Descripción general

Normalmente, la bacteria *Escherichia coli* habita en los intestinos tanto de individuos como de animales saludables. La mayor parte de los tipos de *Escherichia coli* son inofensivos o provocan una diarrea breve. No obstante, ciertas cepas, como la *Escherichia coli* O157:H7, tienen la capacidad de provocar fuertes cólicos abdominales, diarrea con sangre y vómitos.

Es posible que te expongas a la *Escherichia coli* debido a la contaminación del agua o de alimentos, principalmente de las verduras crudas y de la carne de vacuno molida poco cocida. Los adultos en buen estado generalmente se recuperan de la infección por *Escherichia coli* O157:H7 en un periodo de una semana. Los niños y las personas de edad avanzada tienen un riesgo más

elevado de desarrollar una forma de insuficiencia renal que les pone en peligro. (18)

2.2.3.2. Fuentes de transmisión

La mayor evidencia sobre *Escherichia coli*, que produce una toxina de tipo Shiga se asocia con el serotipo 0157: H7, debido a su caracterización diferenciada respecto a otras cepas de *Escherichia coli*. Este patógeno se encuentra principalmente en fuente bovina (22).

La contaminación fecal del agua y de otros alimentos, así como la contaminación cruzada durante la preparación de estos (con carne de vacuno y otros productos cárnicos, superficies y utensilios de cocina contaminados), también es causa de infecciones. Ejemplos de alimentos implicados en brotes de *Escherichia coli* 0157: H7 son las hamburguesas poco cocidas, el salami curado, la sidra fresca no pasteurizada, el yogur y el queso elaborado con leche cruda. (22)

El incremento de brotes se asocia al consumo de frutas y hortalizas —como coles de Bruselas, espinacas, lechuga, ensalada de col y mezclas vegetales— contaminadas por contacto con heces de animales domésticos o silvestres durante la producción o el procesamiento. *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC) se ha detectado en hábitats acuáticos (estanques, arroyos), pozos y sistemas de riego, mostrando capacidad de persistir durante meses en estiércol y sedimentos de contenedores de agua. Se han reportado casos de transmisión hídrica tanto por consumo de agua potable contaminada como por uso de fuentes recreativas. (22)

El contacto persona a persona constituye una vía relevante de transmisión fecal-oral. Se han descrito portadores asintomáticos capaces de contagiar sin presentar síntomas. La excreción de STEC en adultos suele durar alrededor de una semana, aunque en niños puede prolongarse. Asimismo, las visitas a granjas u otros entornos con contacto directo con ganado se reconocen como un factor de riesgo importante para la infección. (19)

2.2.3.3. Clasificación

Existen seis grupos patotípicos de *Escherichia coli* asociados a cuadros gastroentéricos y otras infecciones:

- Enteropatógena (EPEC): Principal agente de diarrea infantil en países de bajos recursos. Su patogenicidad, mediada por más de 40 genes, implica adherencia al epitelio del intestino delgado y destrucción de microvellosidades.
- Enterotoxigénica (ECET): Responsable de aproximadamente 650 millones de casos anuales, principalmente en países en desarrollo. Afecta a niños y viajeros, transmitiéndose por alimentos o agua contaminados con materia fecal. No se transmite persona a persona.
- Enterohemorrágica (ECEH): Frecuente en países desarrollados. Produce desde diarrea leve hasta colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH), especialmente en niños <5 años y en meses cálidos.

- Enteroinvasiva (ECEI): Endémica en regiones en desarrollo, con presentación similar a la shigelosis. Invade y destruye el epitelio colónico, causando diarrea acuosa que en algunos casos progresa a disentería con fiebre, dolor abdominal, heces sanguinolentas y leucocitos fecales.
- Enteroagregativa (ECEA): Asociada a diarrea acuosa persistente y deshidratación en niños menores de dos años en países de bajos recursos, así como en viajeros. También vinculada a diarrea crónica.
- Uropatógena (UPEC): Principal agente causal de infecciones del tracto urinario (cistitis, pielonefritis, urosepsis) y de elevada carga de morbilidad y costes sanitarios. Pertenece al subgrupo de E. coli extraintestinales. (20)

2.2.4. Medios de cultivo

- **Descripción**

Los medios de cultivo son compuestos empleados en el cultivo y preservación de microorganismos en el laboratorio, con

la finalidad de fomentar el crecimiento de microorganismos como bacterias, virus y hongos, en particular. En ciertos casos, también se emplean para tejidos o células, aunque en menor medida. Los medios de cultivo suministran los nutrientes requeridos para la multiplicación y crecimiento de los microorganismos. (23)

Estos nutrientes pueden abarcar desde carbohidratos hasta proteínas, minerales y vitaminas.

Asimismo, al suministrar nutrientes, los medios de cultivo pueden incluir indicadores que facilitan la detección de diversos tipos de microorganismos. Por ejemplo, un medio de cultivo selectivo podría incluir ciertos elementos que favorecen el desarrollo de una especie específica de bacterias, al mismo tiempo que impiden el desarrollo de otras especies. Por otro lado, los medios diferenciales facilitan la diferenciación entre distintas especies de microorganismos. Este enlace permite visualizar algunos ejemplos de ambos tipos de medios. (21)

- **Habituales medios de cultivo**

- Agar: Polisacárido extraído principalmente de algas marinas, empleado como agente gelificante en medios de cultivo. Su ventaja radica en que, salvo para ciertos microorganismos marinos, no constituye una fuente nutritiva. Un gel al 1–2 % se funde a ~100 °C y solidifica a ~40 °C, dependiendo de su pureza.
- Extractos: Preparados obtenidos mediante la extracción y concentración de órganos o tejidos animales o vegetales, utilizados en forma deshidratada (pasta o polvo) en la formulación de medios. Destacan los extractos de carne, levadura y malta.
- Peptonas: Mezclas complejas de compuestos orgánicos, nitrógeno y sales minerales, resultantes de la digestión enzimática o química de proteínas animales o vegetales (soja, caseína, carne). Ricas en péptidos y aminoácidos, aunque con posible deficiencia de vitaminas y minerales.
- Fluidos corporales: Incluyen sangre total, sangre desfibrinada, plasma o suero, añadidos para el aislamiento

primario de ciertos patógenos. Deben obtenerse en condiciones asépticas de animales sanos y adicionarse al medio tras la esterilización del resto de componentes. Además de factores de crecimiento, aportan sustancias que neutralizan inhibidores bacterianos.

- Sistemas amortiguadores: Componentes añadidos para mantener el pH dentro del rango óptimo de crecimiento microbiano.
- Indicadores de pH: Sustancias ácido-base incorporadas para detectar cambios de pH derivados de procesos como la fermentación.
- Agentes reductores: Compuestos que generan condiciones microaerófilas o anaerobias en el medio, favoreciendo el crecimiento de microorganismos sensibles al oxígeno.
- Agentes selectivos: Sustancias como cristal violeta, sales biliares, azida sódica, telurio potásico o antibióticos que, a concentraciones específicas, inhiben selectivamente el

crecimiento de determinados grupos bacterianos.

- **Tipos de medios de cultivo**

- Medios Generales. Son los que facilitan el desarrollo de una amplia diversidad de microorganismos.
- Medios de Enriquecimiento. Se refieren a aquellos que promueven el desarrollo de un tipo específico de microorganismos sin alcanzar a restringir completamente el crecimiento de los demás.
- Medios Selectivos. Son los que facilitan el desarrollo de un tipo específico de microorganismos, restringiendo el crecimiento de los demás.
- Medios Diferenciales. Son aquellos donde se evidencian las características que un cierto tipo de microorganismos. (23)

2.3. DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

- **Actividad antibacteriana:** Capacidad de una sustancia, natural o sintética, para inhibir el crecimiento o destruir bacterias. Esta actividad puede ser bacteriostática (inhibición del crecimiento) o bactericida (eliminación de las bacterias), y se evalúa mediante métodos in vitro estandarizados.
- **ATCC:** American Type Culture Collection.
- **Bacterias Gram positivas / Gram negativas:** Clasificación basada en la tinción de Gram, que refleja diferencias estructurales en la pared celular. Las Gram positivas poseen una pared gruesa de peptidoglicano y tiñen de violeta; las Gram negativas tienen una pared delgada y una membrana externa, tiñendo de rosado. Esta distinción influye en su susceptibilidad a los antimicrobianos.
- **Concentración Mínima Inhibitoria (CMI):** Es la menor concentración de un agente antimicrobiano capaz de inhibir visiblemente el crecimiento bacteriano tras un periodo

determinado de incubación. Es un parámetro fundamental para evaluar la potencia de un antimicrobiano.

- **Concentración Mínima Bactericida (CMB):** Es la concentración más baja de un agente antimicrobiano que logra eliminar el 99.9% de las bacterias viables en una población bacteriana. Se determina tras la prueba de CMI mediante el subcultivo de los pozos sin crecimiento.
- **Difusión en disco (método de Kirby-Bauer):** Técnica microbiológica cualitativa que permite evaluar la susceptibilidad bacteriana frente a un antimicrobiano, mediante la medición del halo de inhibición alrededor de un disco impregnado con el extracto o antibiótico, colocado sobre una placa de agar inoculada.
- **Extracto etanólico:** Fracción líquida concentrada obtenida al macerar o percolar material vegetal con etanol como disolvente. Este tipo de extracto permite aislar compuestos polares y semipolares con posible actividad biológica, incluidos alcaloides, flavonoides, taninos, entre otros.

- **Efecto antibacteriano:** Compuesto que elimina las bacterias o les evita el crecimiento y la producción de afecciones.
- **Extracto etanólico de Hierba Santa (EHS):** Preparación concentrada obtenida mediante la maceración o extracción de los compuestos bioactivos presentes en la planta utilizando etanol (alcohol etílico) como solvente.
- **Fitocompuesto:** Sustancia química de origen vegetal con actividad biológica. Muchos fitocompuestos, como flavonoides, terpenoides, alcaloides y compuestos fenólicos, han demostrado potencial antimicrobiano, siendo objeto de estudio en farmacognosia y microbiología.
- **Halo de inhibición:** Zona circular clara que se forma alrededor del disco impregnado con el agente antimicrobiano, en un medio de cultivo donde crecen bacterias. Su diámetro, medido en milímetros, es un indicador cuantitativo indirecto de la actividad antibacteriana del agente evaluado.

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

3.1. TIPO, DISEÑO Y NIVEL DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.1. Tipo de investigación

Aplicada: Porque de acuerdo a la evidencia científica sobre las propiedades antibacterianas de la Hierba Santa, se pretende evaluar el potencial antimicrobiano de una planta medicinal frente a bacterias de importancia clínica, con vistas a posibles aplicaciones terapéuticas o preventivas (24).

Cuantitativa: Porque se recolectan datos medibles numéricamente (diámetros de halos de inhibición, concentraciones de CMI y CMB en mg/mL). Asimismo, se emplean procedimientos estandarizados, replicables y controlados. Por último, el análisis se realiza mediante estadística descriptiva e inferencial (24).

Prospectivo: Porque la información de las variables se recolecta desde el presente hacia el futuro, es decir, la parte

experimental y las respectivas mediciones se realizan después del planteamiento del estudio. Asimismo, no se usan datos retrospectivos ni registros clínicos previos (24).

Transversal: Porque se mide la actividad antibacteriana una sola vez por cepa y concentración en condiciones controladas de laboratorio. Además, no hay seguimiento de evolución, cambios temporales ni monitoreo longitudinal (24).

3.1.2. Diseño de investigación

Experimental: Porque se sometió las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* a diferentes concentraciones del extracto etanólico de Hierba Santa para determinar la actividad antibacteriana. Asimismo, se emplearon controles positivos y negativos (24).

3.1.3. Nivel de la investigación

Explicativo: Porque busca determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de Hierba Santa, basándose en

la evaluación de los halos de inhibición y en el planteamiento de una hipótesis estadística (24).

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

3.2.1. Población

La población está conformada por las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.2.2. Muestra

Conformada por 56 placas Petri donde se realizó el cultivo de las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

3.3. TÉCNICAS, INSTRUMENTOS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

3.3.1. Materiales y/o instrumentos

MATERIALES

- ✓ Probeta 250ml
- ✓ Probeta 50ml
- ✓ Placas Petri 10x100mm
- ✓ Placas Petri 10x150mm
- ✓ Placas Petri 20x200mm
- ✓ Pipetas calibradas
- ✓ Matraces Erlenmeyer 250ml
- ✓ Algodón 500g marca CKF Perufarma
- ✓ Tubos de ensayo 15x125mm
- ✓ Vasos de precipitados
- ✓ Balón 2000ml
- ✓ Micropipeta (0,5-10 μ l)
- ✓ Micropipeta (10 - 100 μ l)
- ✓ Micropipeta (100 - 1000 μ l)
- ✓ Puntas para micropipeta de (0,5-10 μ l)
- ✓ Puntas para micropipeta de (10 - 100 μ l)
- ✓ Puntas para micropipeta de (100 - 1000 μ l)
- ✓ Frasco de boca ancha de color ámbar

- ✓ Frasco transparente con tapa
- ✓ Pinzas
- ✓ Mango de bisturí n° 3
- ✓ Hoja de bisturí n°15
- ✓ Gradillas
- ✓ Mechero
- ✓ Embudos
- ✓ Piseta
- ✓ Succionador de pipetas
- ✓ Viales con tapa de goma
- ✓ Papel filtro

REACTIVOS

- ✓ Agar Müeller Hinton marca Hi media
- ✓ Caldo BHI (Infusión Cerebro Corazón) marca Merck
- ✓ Agar BHI marca Merck
- ✓ Alcohol etílico de 70° marca Alkofarma
- ✓ Alcohol de 96° marca Alkofarma
- ✓ Tintura de yodo marca Alkofarma
- ✓ Cloruro férrico (FeCl₃) marca Eisen-Golden

- ✓ Cobre(II) acetato monohidrato marca Merck
- ✓ Acetato de plomo $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ marca Biopack
- ✓ Cloruro de mercurio HgCl_2 marca Merck
- ✓ Tungstato de sodio $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ marca Biopack
- ✓ Fosfato disódico Na_2HPO_4 marca Biopack
- ✓ Ácido pícrico $\text{C}_6\text{H}_3\text{N}_3\text{O}_7$ marca Biopack
- ✓ Yodo I_2 marca Adbaquim
- ✓ Nitrato de bismuto (III) pentahidratado marca Merck
- ✓ Ácido nítrico HNO_3 marca Biopack
- ✓ Yoduro de potasio KI marca Merck
- ✓ Ron
- ✓ Hipoclorito de sodio (NaClO)
- ✓ Ampollas de agua destilada 5 ml

DISCOS DE ANTIBIÓTICOS

- ✓ Vancomicina (VA) marca Oxoid
- ✓ Cefuroxima (CXM) marca Oxoid

EQUIPOS Y OTROS

- ✓ Molino manual marca Corona
- ✓ Autoclave 121°C por 15 libras de presión
- ✓ Balanza analítica marca Kern modelo AES 200-4C
- ✓ Balanza de precisión marca Kern modelo PBS6200-MZ
- ✓ Estufa marca Merwert U50
- ✓ Incubadora 35±2°C. marca Merwert IF75plus
- ✓ Refrigerador 4- 8°C. marca Biobase BPR-5V588
- ✓ Rotador magnético 125rpm marca VWR Minivortex
- ✓ Cocina eléctrica
- ✓ Espátula
- ✓ Asa bacteriológica
- ✓ Asa digralsky
- ✓ Papel kraft
- ✓ Nefelómetro de Mac Farland
- ✓ Vernier digital Marca Truper
- ✓ Guardapolvo
- ✓ Guantes de nitrilo marca Golden Glove
- ✓ Mascarillas marca R&G
- ✓ Guantes de protección térmica

- ✓ Bandejas de plásticos
- ✓ Gorro marca R&G
- ✓ Marcador
- ✓ Lapicero
- ✓ Papel aluminio
- ✓ Pavilo
- ✓ Tijera
- ✓ Sobre de manila
- ✓ Hoja de turbidimetria

3.3.1. Procedimientos

3.3.1.1. OBTENCIÓN DE LA ESPECIE VEGETAL *Cestrum auriculatum* (Hierba santa)

Recolección

La planta *Cestrum auriculatum* “Hierba santa” fue recolectada en el distrito de Pocollay, provincia y departamento Tacna, fue recolectada en el mes de noviembre del 2024. Una vez recolectadas se llevó con cuidado en una bolsa de papel (ver Anexo 1).

Selección

Se procedió a la separación de las ramas con las hojas de *Cestrum auriculatum* “Hierba santa”. Escogiendo aquellas hojas que estén en buen estado (ver Anexo 2).

Lavado

Se empezó a lavar en dos procesos para quitar cualquier tipo de impurezas, primero se pasó por un recipiente con agua y gotas de lejía, luego en otro recipiente con solo agua. Posteriormente se sacudió un poco y se colocaron encima del papel kraft (ver Anexo 3).

Secado

Para evitar la proliferación de microorganismos se secó la planta de forma natural en un ambiente fresco y seco en donde no caiga nada de luz ni este húmedo el ambiente en donde no se pueda alterar los metabolitos secundarios de las hojas de *Cestrum*

auriculatum “Hierba santa”, además se volteaban las hojas todos los días (ver Anexo 4).

3.3.1.2. OBTENCIÓN DE LA CERTIFICACIÓN

Una muestra de *Cestrum auriculatum* “Hierba santa” fue llevada a la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann – Facultad de Ciencias de la Escuela de Biología y microbiología para validar su taxonomía (Anexo 5).

3.3.1.3. PREPARACIÓN DEL MATERIAL

Se empezó a seleccionar y envolver todos los materiales con papel kraft que se van a utilizar, para esterilizarlos en la estufa (ver Anexo 6).

3.3.1.4. ELABORACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO

Trituración

Pasaron los días de secado y se empezó a triturar en un molino manual las hojas durante una hora, obteniendo las hojas trituradas, se agregó 250.18 g *Cestrum auriculatum* “Hierba santa” al frasco de color ámbar (ver Anexo 7).

Macerado

Estando las hojas trituradas de *Cestrum auriculatum* “Hierba santa” dentro del envase de vidrio ámbar. Se añadió 4.5 L de alcohol 70° que cubrió por completo el contenido de las hojas trituradas, luego fue sellado y se envolvió con papel aluminio. Se coloca el envase de vidrio ámbar en un lugar sin luz ni humedad, este frasco se agitó tres veces al día (ver Anexo 8).

Filtrado

Se procedió a realizar la doble filtración para que el extracto no presente residuos y obtener un extracto puro, para el procedimiento se utilizó papel filtro, embudo y probetas de 50ml previamente esterilizados. De la filtración se midió una cantidad de 50ml del extracto en una probeta y la otra se procedió a guardar en un envase de vidrio con tapa (ver Anexo 9) y envuelto con papel aluminio y se colocó en la refrigeradora. Se vertió los 50ml del extracto en una placa Petri de 20x200mm y se pesó. Posteriormente se llevó a la estufa a una temperatura de 45°C por 24horas, obteniéndose, de esta manera los principios activos.

3.3.1.5. MARCHA FITOQUÍMICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO

Los procedimientos para la marcha fitoquímica y la preparación de los reactivos fueron realizados en el laboratorio de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna.

Identificación de taninos

- **Prueba de Cloruro férrico:** Se agregó al tubo de ensayo 6ml del filtrado de la muestra y se añadió 5 gotas del reactivo. Para darnos como resultado una coloración azul.

Identificación de diterpenoides

- **Prueba con Acetato de cobre:** Se agregó al tubo de ensayo 6ml del filtrado de la muestra y se añadió 5 gotas del reactivo. Para darnos como resultado una coloración verde esmeralda.

Identificación de flavonoide

- **Prueba de acetato de plomo:** Se agregó al tubo de ensayo 6ml del filtrado de la muestra y se añadió 5 gotas del reactivo. Para darnos como resultado un precipitado amarillo.

Identificación de alcaloides

- **Prueba de Mayer:** Se agregó al tubo de ensayo 6ml del filtrado de la muestra y se añadió 5 gotas del reactivo. Para darnos como resultado una turbidez o coloración blanco a crema.
- **Prueba de Scheibler:** Se agregó al tubo de ensayo 6ml del filtrado de la muestra y se añadió 5 gotas del reactivo. Para darnos como resultado una coloración blanca.
- **Prueba de Hager:** Se agregó al tubo de ensayo 6ml del filtrado de la muestra y se añadió 5 gotas del reactivo. Para darnos como resultado una coloración amarilla.
- **Prueba de Wagner:** Se agregó al tubo de ensayo 6ml del filtrado de la muestra y se añadió 5 gotas del reactivo. Para darnos como resultado una coloración marrón.
- **Prueba de Dragendorff:** Se agregó al tubo de ensayo 6ml del filtrado de la muestra y se añadió 5 gotas del reactivo. Para darnos como resultado una coloración naranja.

3.3.1.6. PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Agar Müller-Hinton

Se pesó 34,2g el polvo de agar Müller-Hinton en una balanza analítica, se vertió al balón y se añadió 900ml de agua destilada, se llevó a calor y se agito frecuentemente hasta que la mezcla este bien homogénea. Se midió con una probeta 450ml y se vertió a un matraz y lo que queda en el balón se vertió a otro matraz. A cada matraz se colocó torundas de algodón, se envolvió con papel kraft y respectivamente se rotularon. Se llevó a esterilizar en autoclave a 121 °C a 15 libras de presión por 15 minutos (ver Anexo 10). Dejar enfriar entre 45-50°C y se vertió el agar Mueller Hinton a las placas estériles y almacenar en el refrigerador.

Caldo BHI

Se pesó 3,7g los gránulos del caldo BHI en una balanza analítica, se vertió al matraz y se añadió 100ml de agua destilada, se disolvió hasta que este homogéneo. Con una pipeta se empezó a medir 10ml del caldo BHI y verter en cada tubo de ensayo, se tapó a

cada tubo con torundas de algodón. Después los tubos de ensayo se colocaron en un envase, se envolvieron con papel kraft y respectivamente se rotularon. Finalmente se llevó a esterilizar en autoclave a 121 °C a 15 libras de presión por 15 minutos (ver Anexo 11). Dejar enfriar y almacenar en el refrigerador.

Agar BHI

Se pesó 7,28g el polvo de agar BHI en una balanza analítica, se vertió a un matraz y se añadió 140ml de agua destilada, se llevó a calor y se agito frecuentemente hasta que la mezcla este bien disuelta. Verter en cada vial y tapar a cada uno con torundas de algodón. Después los viales se colocan en un envase, se envuelven con papel kraft y se rotula. Esterilizar en autoclave a 121 °C a 15 libras de presión por 15 minutos. Al término de la esterilización se empezó a inclinar a un ángulo de 45° y dejar enfriar para almacenar al refrigerador (ver Anexo 12).

3.3.1.7. PREPARACIÓN DE LAS CEPAS BACTERIANAS

Los procedimientos fueron realizados en el “Laboratorio de Microbiología” de la “Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna”.

Activación

Obteniendo la bacteria por el laboratorio de microbiología, se comienza a activar la bacteria en caldo BHI por técnica de suspensión. Prendido el mechero pasamos el asa bacteriológica y se tomó una asada bacteriana en donde se activa la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y la cepa *Escherichia coli* 25922 en sus tubos de ensayo correspondientes con caldo BHI y luego se lleva a la incubadora por 24 horas a 35 ± 2 °C (ver Anexo 13). Después se sembró en agar BHI con la técnica de estría y agotamiento (ver Anexo 14), se llevó a la incubadora por 24 horas a 35 ± 2 °C para su posterior resembrado, de aquí en adelante las cepas bacterianas tanto para cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y la cepa *Escherichia coli* 25922 se encontraban en actividad metabólica.

Se tomó una asada bacteriana en donde se activa la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 6835 y la cepa *Escherichia coli* 25922 por la técnica de suspensión en sus tubos de ensayo correspondientes (ver Anexo 15) y se llevó a la incubadora por un espacio de 2 a 3 horas a 35 ± 2 °C. Transcurrido el tiempo con ayuda del Nefelómetro de McFarland, se midió la turbidez de cada tubo a 0,5 de la escala de McFarland que indica una concentración de $1,5 \times 10^8$ cel/ml de suspensión bacteriana (ver Anexo 16).

3.3.1.8. PREPARACION DE LOS DISCOS DE SENSIBILIDAD

Inactivación de los discos

Se utilizaron discos de vancomicina de 30 µL y cefuroxima de 30 µL, se llevó a un proceso de inactivación de las dos muestras de disco para tener discos en blanco sin actividad antibacteriana. Dejando unos cuantos discos para el control positivo.

En un Beaker de 1000 ml se agregaron 72 discos para luego agregar 800ml de agua destilada. Se agito despacio, se forro con papel kraft y se llevó a desnaturalizar en autoclave a 121 °C a 15 libras de presión por 15 minutos. Posteriormente pasado el tiempo

se desechó el agua destilada y con una pinza se empezó a ordenar los discos en filas a las paredes del beaker y luego se colocó a la estufa a una temperatura de 180°C por 30 minutos (ver Anexo 17). Este procedimiento se utilizó para los dos tipos de discos vancomicina de 30 μ L y cefuroxima de 30 μ L.

Preparación de los discos de sensibilidad con el principio activo

Con la ayuda de un bisturí empezamos a raspar la placa Petri para sacar el extracto seco, pesar 115.2 mg e hidratarlo con 8000 μ L de agua destilada. Luego utilizamos el agitador para obtener una mezcla homogénea. Con la ayuda de una micropipeta empezamos a distribuir a cada vial estéril de acuerdo al porcentaje correspondiente y lo tapamos (ver Anexo 18). Seguidamente empezamos a dividir las placas Petri a la mitad y escribimos los porcentajes en cada división.

Con ayuda de una pinza empezamos a sacar los discos del beaker y colocamos 12 discos en cada división. Empezamos a embeber con una micropipeta los 30 μ L a cada uno de los discos de acuerdo al porcentaje correspondiente (ver Anexo 19). Y se dejó por unas horas.

3.3.1.9. DETERMINACIÓN DEL HALO DE INHIBICIÓN POR EL MÉTODO DE LA DIFUSIÓN DEL DISCO (KIRBY BAUER)

Con una micropipeta se dispensaron 100 µL del inóculo bacteriano sobre la superficie del agar Mueller-Hinton de cada placa correspondiente, empleando la técnica de diseminación en superficie hasta lograr una distribución homogénea del inóculo (véase Anexo 20). Posteriormente, se dejó secar durante unos minutos a temperatura ambiente.

Utilizando pinzas estériles, se colocaron los discos impregnados con las diferentes concentraciones del extracto sobre la superficie de las placas de Mueller-Hinton inoculadas con *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922, ejerciendo una ligera presión para garantizar un contacto uniforme (ver Anexo 21).

Las placas se incubaron a 35 ± 2 °C durante 24 horas. Transcurrido el periodo de incubación, se procedió a la lectura midiendo el diámetro de los halos de inhibición con un calibrador

digital, registrando el tamaño de la zona libre de crecimiento microbiano alrededor de cada disco (ver Anexo 22).

3.3.1.10. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI)

Se volvieron a preparar las suspensiones bacterianas por 3 días. Una vez listos, se prepararon 24 tubos de ensayos (12 para cada cepa: 10 con diluciones de caldo BHI, cepa y *Cestrum auriculatum* “Hierba Santa”; 1 control positivo y 1 control negativo) con sus respectivas cantidades. Con *Staphylococcus aureus* se utilizó a partir del 40% a 60% y en el caso de *Escherichia coli.*, se utilizó a partir del 60% al 80% (ver Anexo 23).

3.3.1.11. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA BACTERICIDA (CMB)

Una vez determinada la concentración mínima inhibitoria (CMI), se procedió a establecer la concentración mínima bactericida (CMB). Para ello, se seleccionaron tres tubos correspondientes a las diluciones sin evidencia de turbidez.

Se preparó el medio Mueller-Hinton, el cual fue esterilizado en autoclave y posteriormente vertido en placas Petri previamente esterilizadas. Las placas fueron rotuladas según la enumeración de los tubos correspondientes a cada cepa.

Para *Staphylococcus aureus*, se inocularon 100 µL de los tubos 7, 8 y 9 (véase Anexo 24) en las placas asignadas; de manera análoga, para *Escherichia coli* se inocularon 100 µL de los tubos 6, 7 y 8 (véase Anexo 25). En todos los casos, el inóculo se distribuyó homogéneamente sobre la superficie del agar Mueller-Hinton empleando un asa de Drigalsky. Las placas se incubaron a 35 ± 2 °C durante 24 horas.

Finalizado el periodo de incubación, se realizó el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC). Para *S. aureus*, la CMB se obtuvo en la placa correspondiente al tubo 8 (ver Anexo 26), mientras que para *E. coli* se observó en la placa derivada del tubo 6, evidenciando una reducción del 99 % de las colonias (ver Anexo 27).

3.4. ANÁLISIS DE DATOS

Estadística descriptiva:

Dado que las variables consideradas en el presente estudio son exclusivamente de tipo numérico continuo, se emplearon medidas de tendencia central y dispersión para su descripción. En ese sentido, los datos obtenidos de los halos de inhibición (en milímetros) se resumieron mediante el cálculo de la media aritmética y la desviación estándar, permitiendo caracterizar la distribución y variabilidad de los efectos antibacterianos del extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* a distintas concentraciones.

Estadística inferencial:

Para evaluar si existían diferencias estadísticamente significativas en los halos de inhibición generados por las distintas concentraciones del extracto etanólico, se aplicó un análisis de varianza de un solo factor (ANOVA de un factor o ANOVA H), dado que la variable dependiente (diámetro del halo) es numérica continua y se compararon múltiples grupos independientes (concentraciones

del extracto). Posteriormente, se realizaron pruebas post hoc de comparaciones múltiples por pares a través de la prueba de Bonferroni, con el fin de identificar específicamente cuáles concentraciones presentaron diferencias significativas entre sí.

Adicionalmente, se emplearon diagramas de caja y bigotes (*boxplots*) para visualizar gráficamente la distribución de los halos de inhibición según las diferentes concentraciones del extracto, lo que permitió detectar tendencias, posibles valores atípicos y amplitud de variación intra e intergrupala.

Todos los contrastes de hipótesis fueron realizados considerando un nivel de significancia estadística (α) de 0.05, y el procesamiento de los datos se llevó a cabo utilizando el software STATA®, versión 18.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Tabla 1. Halos de inhibición por el método de difusión del disco Kirby Bauer del extracto etanólico de “Hierba Santa” frente a *Staphylococcus aureus*.

[EHS]	Halos de inhibición (HI, mm)												μ
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	
20%	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6
40%	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6
60%	16.64	14.23	14.19	17.34	15.99	14.19	13.53	15.22	15.18	16.13	15.7	16.35	15.39
80%	22.26	16.34	17.45	19.8	23.29	21.27	16.76	19.12	18.21	23.27	22.32	21.77	20.16
100%	26.89	26.77	27.04	26.73	21.9	19.51	26.98	26.95	29.99	33.33	22.36	22.38	25.9
C+	15.48	15.48	15.48	15.48	15.48	14.15	13.98	15.65	15.99	15.97	14.43	15.35	15.24
C-	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6

Fuente: Elaboración propia. Ficha de recolección de datos

[EHS]: Concentración del Extracto etanólico de *Hierba Santa*

μ: Media o promedio

Interpretación:

A través del método de difusión en disco de Kirby-Bauer, se observó que a partir de una concentración del 60% del extracto etanólico de Hierba Santa, comenzó a evidenciarse actividad antibacteriana, reflejada en un aumento progresivo del halo de inhibición en función de la concentración del extracto. Es así que, la mayor actividad antibacteriana se alcanzó con una concentración del 100%, cuyo halo de inhibición tuvo un promedio de

25.9 mm. Este valor fue incluso superior al obtenido con el control positivo, que en este caso fue la vancomicina.

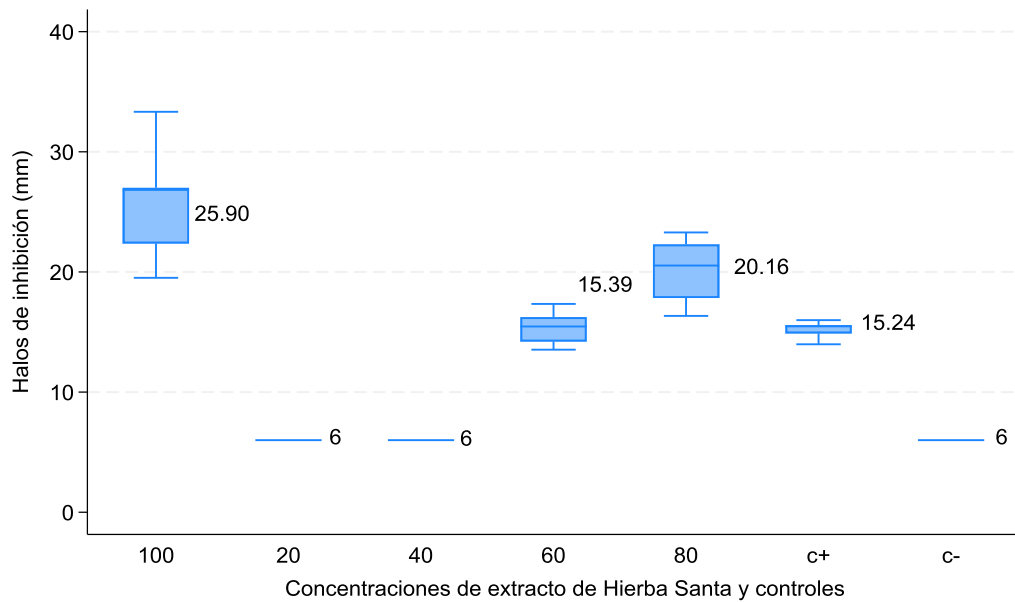


Gráfico 1. Promedios de los halos de inhibición del extracto etanólico de “Hierba Santa” frente a *staphylococcus aureus*.

Evaluación de los halos de inhibición del extracto etanólico de *Hierba Santa* a diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus*

a) Planteamiento de hipótesis estadísticas:

- **Hipótesis nula (H₀):** Los promedios de los halos de inhibición no son diferentes según la concentración del extracto etanólico de *Hierba Santa* frente a *Staphylococcus aureus*.
- **Hipótesis alterna (H_a):** Los promedios de los halos de inhibición son diferentes según la concentración del extracto etanólico de *Hierba Santa* frente a *Staphylococcus aureus*

b) Prueba estadística y nivel de significancia:

ANOVA H de un Factor y Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples con un nivel de significancia de 0,05

c) Obtención del valor p:

- **Prueba de ANOVA H de un factor**

Tabla 2. Prueba de ANOVA H de un factor para la evaluación de la variabilidad de los halos de inhibición a diferentes concentraciones del extracto etanólico de Hierba Santa frente a *Staphylococcus aureus*.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de medias	F	Valor p
Entre los grupos	4481.64	6	746.94	229.50	0.000
Dentro de los grupos	250.61	77	3.25		
Total	4732.24	83	57.01		

Fuente: Elaborado en STATA versión 18.0

Interpretación:

Tras aplicar la prueba estadística ANOVA de un factor, se obtuvo un valor $p = 0.000$, que es inferior al nivel de significancia asintótica de 0.05. En consecuencia, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los promedios de los halos de inhibición varían según la concentración del extracto etanólico de *Hierba Santa* frente a *Staphylococcus aureus*.

Aunque se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los promedios de los halos de inhibición según las concentraciones del extracto, se procedió a realizar la prueba de Bonferroni para

comparaciones múltiples por pares, con el objetivo de identificar las concentraciones del extracto que presentan las mayores diferencias en los promedios de los halos de inhibición.

- **Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples por pares**

Tabla 3. Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples de los promedios de los halos de inhibición a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Hierba Santa* frente a *Staphylococcus aureus*.

[EHS]	100%	20%	40%	60%	80%	C+
20%	-19.91					
Valor p	0.000					
40%	-19.91	0				
Valor p	0.000	1				
60%	-10.51	9.39	9.39			
Valor p	0.000	0.000	0.000			
80%	-5.75	14.16	14.16	4.76		
Valor p	0.000	0.000	0.000	0.000		
C+	-10.66	9.24	9.24	-0.15	-4.91	
Valor p	0.000	0.000	0.000	1	0.000	
C-	-19.91	0	0	-9.39	-14.16	-9.24
Valor p	0.000	1	1	0.000	0.000	0.000

Fuente: Elaborado en STATA versión 18.0

Interpretación:

Con la Prueba de Bonferroni se obtiene un valor $p = 0.000$ para todas las comparaciones por pares de las concentraciones de 80% y 100% del extracto etanólico de *Hierba Santa*. Se puede evidenciar, además, que estas concentraciones presentan mayor halo de inhibición frente a

Staphylococcus aureus que el control positivo, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 4. Nivel de sensibilidad según Duraffourd y Lapraz de los halos de inhibición del extracto etanólico de *Hierba Santa* frente a *Staphylococcus aureus*.

[EHS]	Media de los Halos de Inhibición (mm)	Nivel de sensibilidad
20%	6	Nula (-)
40%	6	Nula (-)
60%	15.39	Muy sensible (++)
80%	20.16	Sumamente sensible (+++)
100%	25.9	Sumamente sensible (+++)

Fuente: Elaboración propia. Ficha de recolección de datos

[EHS]: Concentración del Extracto etanólico de *Hierba Santa*

Nula (-) : menor igual a 8 mm

Muy sensible (++) : de 15 a 19 mm

Sumamente sensible (+++): de mayor igual a 20 mm

Interpretación:

De acuerdo al nivel de sensibilidad según la categorización de Duraffourd y Lapraz, el extracto etanólico muestra una actividad antimicrobiana dependiente de la concentración. A concentraciones bajas (20%, 40%, y 60%), no hay un efecto inhibitorio significativo, mientras que a concentraciones más altas (80% y 100%), la actividad antimicrobiana es mucho más evidente, alcanzando su máxima eficacia a la concentración del 100%.

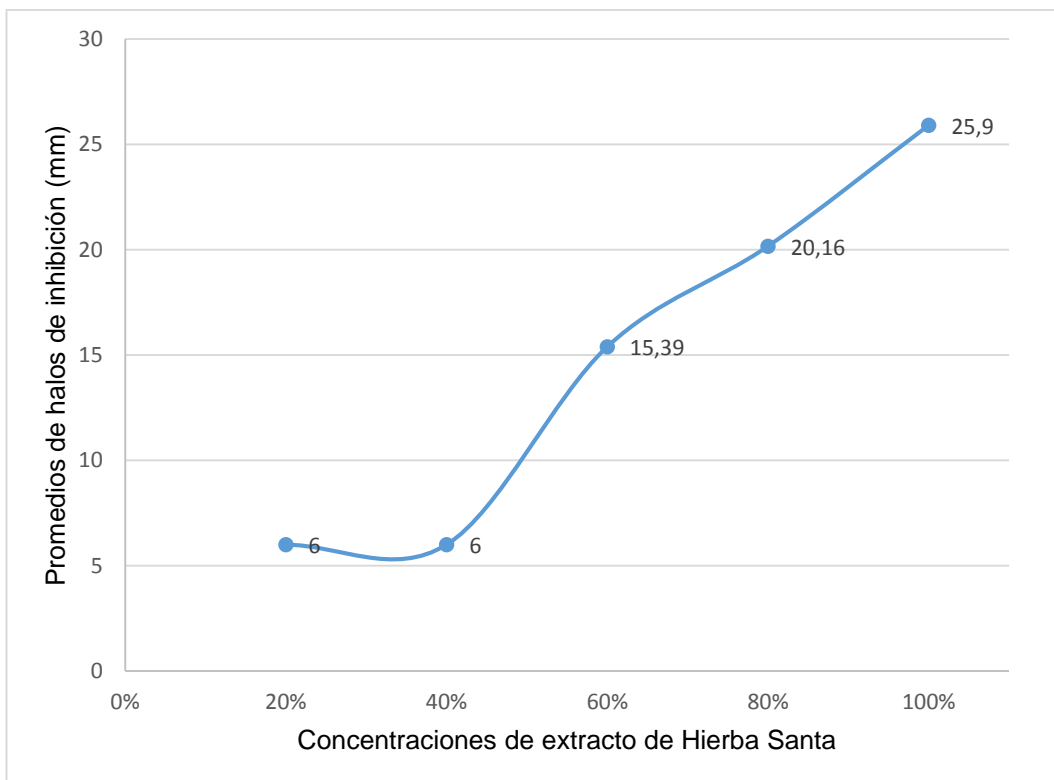


Gráfico 2. Relación entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Hierba Santa* y el nivel de sensibilidad frente a *Staphylococcus aureus*.

Interpretación:

Se observa que, a mayor concentración de extracto etanólico de Hierba Santa, mayor es la sensibilidad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*. Esto evidencia direccionalidad positiva en la relación de ambas variables.

Tabla 5. Halos de inhibición por el método de la difusión del disco Kirby Bauer para determinar la actividad antibacteriana del extracto etanólico de *Hierba Santa* frente a *Escherichia coli*.

[EHS]	Halos de inhibición (HI, mm)												μ
	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	
20%	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6
40%	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6
60%	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6
80%	18.63	20.24	20.03	19.49	15.56	16.66	17.29	17.38	16.74	18.43	16.75	17.32	17.88
100%	21.14	23.57	22.94	21.76	23.37	22.72	23.65	22.91	21.82	20.97	23.18	24.25	22.69
C+	20.13	22.16	19.3	20.3	18.7	21.6	22.03	20.09	19.99	21.03	20.9	19.5	20.48
C-	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6	<6

Fuente: Elaboración propia. Ficha de recolección de datos

[EHS]: Concentración del Extracto etanólico de "Hierba Santa"

μ: Media o promedio

Interpretación:

A través del método de difusión en disco de Kirby-Bauer, se observó que a partir de una concentración del 80% del extracto etanólico de *Hierba Santa*, comenzó a reflejarse actividad antibacteriana, manifestada en un incremento progresivo del halo de inhibición en función de la concentración del extracto. En esa línea, la mayor actividad antibacteriana se alcanzó con una concentración del 100%, cuyo halo de inhibición tuvo un promedio de 22.69 mm. Este valor fue incluso superior al obtenido con el control positivo, que para este caso fue cefuroxima.

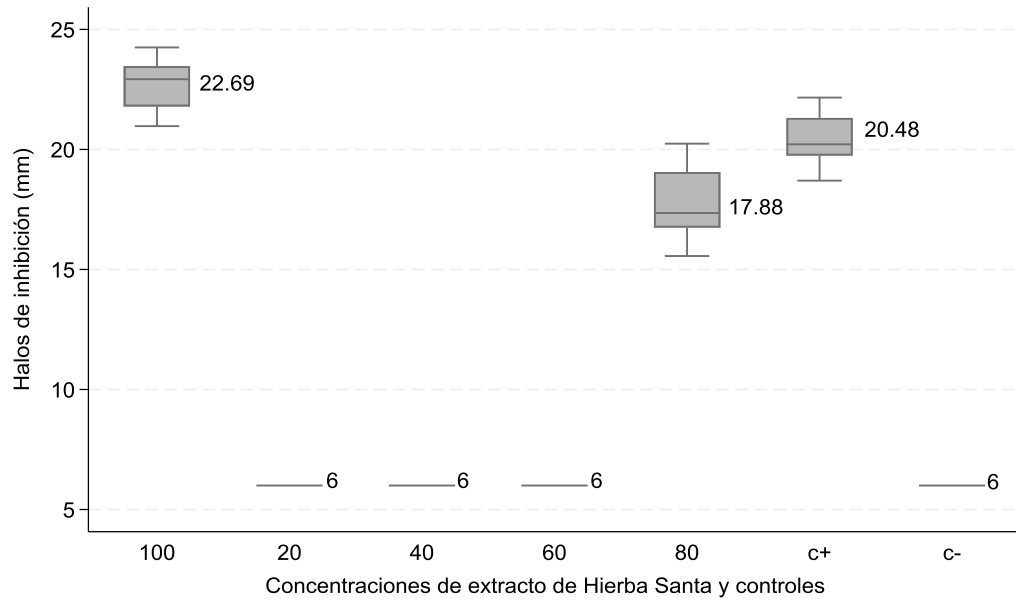


Gráfico 3. Promedios de los halos de inhibición del extracto etanólico de *Hierba Santa* frente a *Escherichia coli*.

Evaluación de los halos de inhibición del extracto etanólico de “Hierba Santa” a diferentes concentraciones frente a *Escherichia coli*

a) Planteamiento de hipótesis estadísticas:

- **Hipótesis nula (H₀):** Los promedios de los halos de inhibición no son diferentes según la concentración del extracto etanólico de “Hierba Santa” frente a *Escherichia coli*
- **Hipótesis alterna (H_a):** Los promedios de los halos de inhibición son diferentes según la concentración del extracto etanólico de “Hierba Santa” frente a *Escherichia coli*

b) Prueba estadística y nivel de significancia:

ANOVA H de un factor y prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples con un nivel de significancia de 0,05

c) Obtención del valor p:

- **Prueba de ANOVA H de un factor**

Tabla 6. Prueba de ANOVA H de un factor para la evaluación de la variabilidad de los halos de inhibición a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Hierba Santa* frente a *Escherichia coli*.

Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Suma de medias	F	Valor p
Entre los grupos	4374.28	6	729.04	1146.56	0.000
Dentro de los grupos	48.96	77	0.63		
Total	4423.24	83	53.29		

Fuente: Elaborado en STATA versión 18.0

Interpretación:

Luego de aplicar la prueba estadística ANOVA de un factor, se obtuvo un valor $p = 0.000$, que es inferior al nivel de significancia asintótica de 0.05. En consecuencia, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que los promedios de los halos de inhibición varían según la concentración del extracto etanólico de *Hierba Santa* frente a *Escherichia coli*.

A pesar de que se observaron diferencias estadísticas significativas entre los promedios de los halos de inhibición según las concentraciones

del extracto, se procedió a realizar la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples por pares, con el objetivo de identificar las concentraciones del extracto que presentan las mayores diferencias en los promedios de los halos de inhibición.

- **Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples por pares**

Tabla 7. Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples de los promedios de los halos de inhibición a diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Hierba Santa* frente a *Escherichia coli*.

[EHS]	100%	20%	40%	60%	80%	C+
20%	-16.69					
Valor p	0.000					
40%	-16.69	0				
Valor p	0.000	1				
60%	-16.69	0	0			
Valor p	0.000	1	1			
80%	-4.81	11.87	11.87	11.87		
Valor p	0.000	0.000	0.000	0.000		
C+	-2.21	14.47	14.47	14.47	2.6	
Valor p	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
C-	-16.69	0	0	0	-11.87	-14.47
Valor p	0.000	1	1	1.000	0.000	0.000

Fuente: Elaborado en STATA versión 18.0

Interpretación:

Con la Prueba de Bonferroni se obtiene un valor $p = 0.000$ para todas las comparaciones por pares de las concentraciones de 80% y 100% del

extracto etanólico de *Hierba Santa*. Se puede evidenciar, además, que estas concentraciones presentan mayor halo de inhibición frente a *Escherichia coli* que el control positivo, siendo esta diferencia estadísticamente significativa.

Tabla 8. Nivel de sensibilidad según Duraffourd y Lapraz de los halos de inhibición del extracto etanólico de Hierba Santa frente a *Escherichia coli*.

[EHS]	Media de los Halos de Inhibición (mm)	Nivel de sensibilidad
20%	6	Nula (-)
40%	6	Nula (-)
60%	6	Nula (-)
80%	17.88	Muy sensible (++)
100%	22.69	Sumamente sensible (+++)

Fuente: Elaboración propia. Ficha de recolección de datos

[EHS]: Concentración del Extracto etanólico de *Hierba Santa*

Nula (-) : menor igual a 8 mm

Muy sensible (++) : de 15 a 19 mm

Sumamente sensible (+++): de mayor igual a 20 mm

Interpretación:

De acuerdo al nivel de sensibilidad según la categorización de Duraffourd y Lapraz, el extracto etanólico muestra una actividad antimicrobiana dependiente de la concentración. A concentraciones bajas (20%, 40%, y 60%), no hay un efecto inhibitorio significativo, mientras que a concentraciones más altas (80% y 100%), la actividad antimicrobiana es

mucho más evidente, alcanzando su máxima eficacia a la concentración del 100%, siendo a esta concentración sumamente sensible.

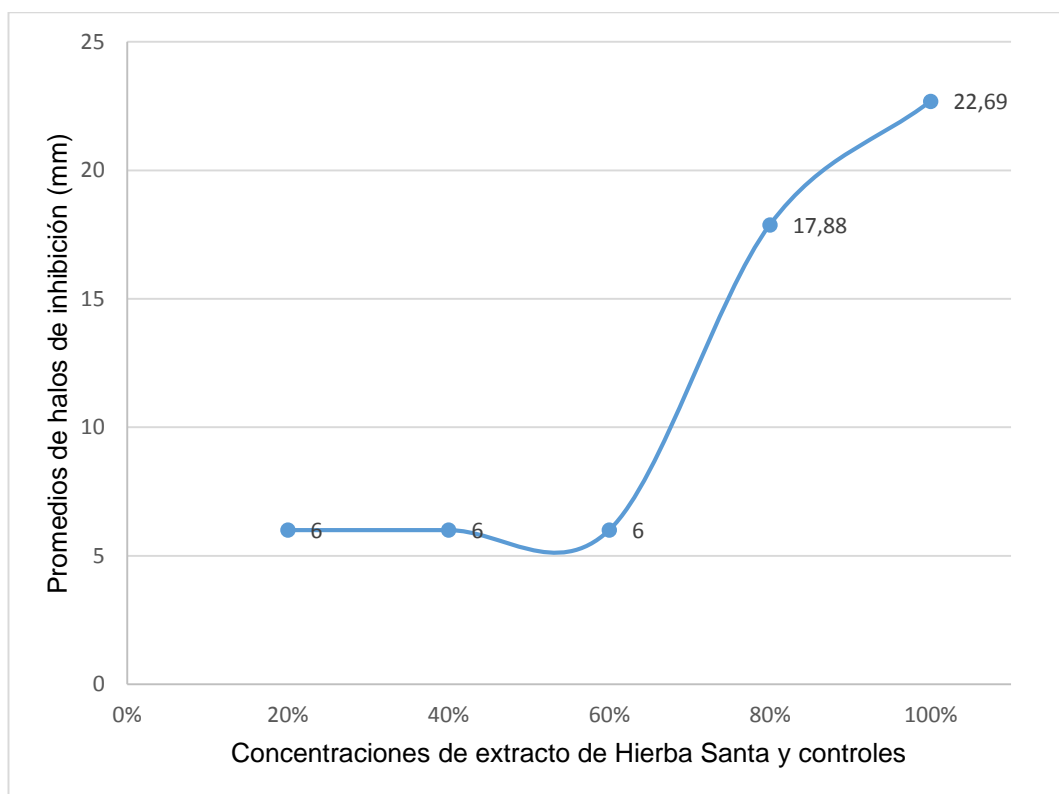


Gráfico 4. Relación entre las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Hierba Santa* y el nivel de sensibilidad frente a *Escherichia coli*.

Interpretación:

Se observa que, a mayor concentración de extracto etanólico de Hierba Santa, mayor es la sensibilidad antibacteriana frente a *Escherichia*

coli. Esto evidencia direccionalidad positiva en la relación de ambas variables.

Tabla 9. Identificación colorimétrica de metabolitos en el extracto etanólico de *Hierba Santa*.

Metabolito	Reactivo	Identificación	Resultados
Taninos	Cloruro férrico 10%	Coloración azul	+++
Diterpenoides	Acetato de cobre	Verde esmeralda	+++
Flavonoides	Acetato de plomo 10%	Precipitado amarillo	+++
Alcaloides			
	Mayer	Turbidez o coloración blanco a crema	++
	Scheibler	Coloración blanca	++
	Hager	Coloración amarillo	+
	Wagner	Coloración marrón	++
	Dragendorff	Coloración naranja	+++

Fuente: Elaboración propia

Interpretación:

Tras la identificación colorimétrica de metabolitos en el extracto etanólico de *Hierba Santa*, se detectaron altas concentraciones de taninos, diterpenoides, flavonoides y alcaloides, evidenciadas por la intensidad máxima de la reacción colorimétrica (+++). La presencia conjunta de estos metabolitos sugiere un alto potencial farmacológico de la Hierba Santa.

Tabla 10. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Hierba Santa* frente a *Staphylococcus aureus*.

Concentración del extracto (mg)	Cantidad (µL)	[EHS]	Turbidez
0.5184	60	40%	Presenta
0.5472	63.33	42.22%	Presenta
0.576	66.66	44.44%	Presenta
0.6051	70.02	46.67%	Presenta
0.6336	73.35	48.89%	Presenta
0.6624	76.68	51.11%	Presenta
0.6912	80.01	53.33%	No presenta
0.72	83.34	55.56%	No presenta
0.7488	86.67	57.78%	No presenta
0.7776	90	60%	No presenta
Control + (Bacterias + Caldo BHI)			Presenta
Control - (solo tiene Caldo BHI)			No presenta

Fuente: Elaboración propia. Ficha de recolección de datos

[EHS]: Concentración del Extracto etanólico de *Hierba Santa*

Interpretación:

La CMI del extracto etanólico de *Hierba Santa* frente a *Staphylococcus aureus* se encuentra en 53.33%, ya que es la concentración más baja en la que no se observa turbidez. En ese sentido, las concentraciones inferiores al CMI, no son efectivas para inhibir el crecimiento bacteriano.

Contrariamente, las concentraciones superiores al 53.33% (55.56%, 57.78% y 60%) muestran ausencia de crecimiento bacteriano (ausencia de turbidez), lo que confirma la actividad antibacteriana del extracto a partir del CMI.

Tabla 11. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto etanólico de *Hierba Santa* frente a *Escherichia coli*.

Concentración del extracto (mg)	Cantidad (µL)	[EHS]	Turbidez
0.7776	67.5	60%	Presenta
0.806	69.99	62.22%	Presenta
0.834	72.51	64.44%	Presenta
0.864	75	66.67%	Presenta
0.8928	77.49	68.89%	Presenta
0.9216	80.01	71.11%	No presenta
0.9504	82.5	73.33%	No presenta
0.9792	84.99	75.56%	No presenta
1.008	87.51	77.78%	No presenta
1.0368	90	80%	No presenta
Control + (Bacterias + Caldo BHI)			Presenta
Control - (solo tiene Caldo BHI)			No presenta

Fuente: Elaboración propia. Ficha de recolección de datos

[EHS]: Concentración del Extracto etanólico de *Hierba Santa*

Interpretación:

La CMI del extracto etanólico de *Hierba Santa* frente a *Escherichia coli* se encuentra en 71.11%, ya que es la concentración más baja en la que no se observa turbidez. En ese sentido, las concentraciones inferiores al CMI, no son efectivas para inhibir el crecimiento bacteriano.

Por otro lado, las concentraciones superiores al 71.11% (73.33%, 75.56% y 77.78%) muestran ausencia de crecimiento bacteriano (ausencia de turbidez), lo que confirma la actividad antibacteriana del extracto a partir del CMI.

Tabla 12. Concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de Hierba Santa frente a *Staphylococcus aureus*.

N° Placas	N° Tubo	% [EHS]	UFC/placa	Resultados
1	7	53.33	8	
2	8	55.56	0	CMB
3	9	57.78	0	

Fuente: Elaboración propia. Ficha de recolección de datos

% [EHS]: Concentración del Extracto etanólico de *Hierba Santa*

Interpretación:

Se observa que a una concentración de 53.33% de extracto etanólico de Hierba Santa, aún se observan 8 unidades formadoras de colonias (UFC), lo que indica que no se ha eliminado completamente el *Staphylococcus aureus*.

Por otra parte, a partir de la concentración de 55.56%, no se detecta crecimiento bacteriano (0 UFC), lo que significa que esta es la CMB del extracto etanólico de Hierba Santa, ya que redujo el 99% de la población bacteriana.

Tabla 13. Concentración mínima bactericida (CMB) del extracto etanólico de Hierba Santa frente a *Escherichia coli*.

N° Placas	N° Tubo	% [EHS]	UFC/placa	Resultados
1	6	71.11	0	CMB
2	7	73.33	0	
3	8	75.56	0	

Fuente: Elaboración propia. Ficha de recolección de datos

% [EHS]: Concentración del Extracto etanólico de *Hierba Santa*

Interpretación:

Se observa que a partir de la concentración de 71.11%, no se detecta crecimiento bacteriano (0 UFC), lo que significa que esta es la CMB del extracto etanólico de Hierba Santa, ya que redujo el 99% de la población bacteriana *Escherichia coli*.

DISCUSIÓN

Esta investigación determinó la actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* “Hierba santa” [EHS] a diferentes concentraciones, frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922.

Para ello, se consideraron esenciales abarcar los siguientes parámetros: la medición de los halos de inhibición, la determinación del nivel de sensibilidad, así como la identificación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB). La medición de los halos de inhibición permitió observar la efectividad del extracto en el control del crecimiento bacteriano, mientras que la determinación del nivel de sensibilidad proporcionó información sobre la resistencia o susceptibilidad de las cepas bacterianas evaluadas (18,25).

De manera complementaria, el presente estudio realizó la identificación colorimétrica de los metabolitos del EHS, detectando altas concentraciones de taninos, diterpenoides, flavonoides y alcaloides. Estos compuestos fueron evidenciados por la intensidad máxima de la reacción colorimétrica (+++) con cada reactivo específico. Este hallazgo sugiere un

notable potencial farmacológico antibacteriano de la Hierba Santa, puesto que diversos estudios han evidenciado que los metabolitos detectados tienen actividad antibacteriana en diversos patógenos grampositivos y negativos, especialmente *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. De manera particular, diversos estudios han señalado que los flavonoides y terpenoides presentan una mayor actividad antibacteriana en comparación con otros metabolitos secundarios. Esto se debe a que los flavonoides tienen la capacidad de inhibir la síntesis de componentes bacterianos y alterar la permeabilidad de las membranas celulares. Por su parte, los terpenoides comparten esta capacidad, ya que provocan la fuga del contenido celular bacteriano, lo que conduce a la muerte de la célula. (26–28).

En Huancayo, Bendezú et al. (14), identificaron metabolitos secundarios en un extracto hidroalcohólico de Hierba Santa utilizando la misma técnica colorimétrica empleada en el presente estudio. Los resultados mostraron tinciones positivas para alcaloides, taninos, flavonoides y compuestos fenólicos. Un estudio similar realizado por Cruz et al. (29) en Arequipa también detectó flavonoides, taninos y terpenos en el mismo tipo de extracto, aunque en este caso los resultados fueron negativos para alcaloides. Es relevante señalar que el trabajo de Cruz et al.

(29) difiere del nuestro principalmente en la técnica de análisis fitoquímico, ya que utilizó Cromatografía de capa fina. Aunque esta técnica no es cuantitativa, tiene mayor sensibilidad para detectar alcaloides al separarlos de una mezcla (27). En cambio, la técnica colorimétrica aplicada en nuestra investigación, mediante el reactivo de Dragendorff, tiene un enfoque *cuasi* cuantitativo, ya que la intensidad de la coloración de la solución refleja la cantidad o concentración de alcaloides presentes.

En otro estudio, Godos (9), en Chimbote, cuantificó los polifenoles presentes en las hojas de Hierba Santa utilizando el método de Folin-Ciocalteu, aunque no realizó una marcha fitoquímica para identificar individualmente los principales metabolitos de la planta. Sin embargo, se toma en cuenta que los polifenoles forman parte de la estructura química de flavonoides y taninos. En consecuencia, se desprende que en el estudio de Godos (9) no se identificaron alcaloides ni diterpenoides, a diferencia de los hallazgos obtenidos en nuestra investigación.

En cuanto a la evaluación de la actividad antibacteriana del EHS, se midieron los halos de inhibición generados por las dos cepas bacterianas estudiadas. Utilizando el método de difusión en disco de Kirby-Bauer, se observó que, a partir de una concentración del 60% de EHS, comenzó a

evidenciarse actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* (μ HI = 15.39 mm), con un aumento progresivo del halo de inhibición conforme aumentaba la concentración del extracto. A una concentración del 80% (μ HI = 17.88 mm), se manifestó actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli*. En ambos casos, las concentraciones de EHS al 100% produjeron halos de inhibición mayores a los controles positivos: vancomicina (μ HI: 25.9 mm vs. 15.24 mm) y cefuroxima (μ HI: 22.69 mm vs. 20.48 mm), respectivamente.

Además, se realizaron comparaciones múltiples por pares entre todas las concentraciones de EHS y los controles positivos y negativos. Se observó que las concentraciones del 80% y 100% del extracto mostraron un mayor efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, presentando diferencias estadísticamente significativas en comparación con las demás concentraciones, así como con los controles positivos correspondientes (valor p para todas las comparaciones por pares = 0.000).

El estudio de Cruz et al. (29), reportó resultados similares a los obtenidos en nuestra investigación, observando un halo de inhibición de 23 mm con una concentración máxima del 100% de EHS. Sin embargo, a una

concentración del 12.5% de extracto (12.5 mg/mL), lograron un halo de inhibición de 18 mm, superior al encontrado en nuestro estudio para la concentración del 60% de EHS (μ HI: 15.39 mm).

Un hallazgo comparable al nuestro es el de Rodríguez (11), quien a una concentración del 25% de EHS (25 mg/mL) obtuvo un halo de inhibición de *Staphylococcus aureus* de 13.45 mm. No obstante, es relevante señalar que, aunque el halo de inhibición fue similar, Rodríguez (11) utilizó una concentración inferior a la nuestra (25% frente a 60%).

Por otro lado, el estudio de Zapata (7) reportó halos de inhibición menores a los nuestros. En su investigación, para *Escherichia coli* a una concentración de extracto del 25% (25 mg/mL), el halo de inhibición fue de 6 mm, mientras que para *Staphylococcus aureus*, el halo fue de 9 mm con una concentración del 100% de extracto.

Todos los estudios mencionados anteriormente realizaron comparaciones múltiples por pares, obteniendo valores p inferiores a 0.05, lo que demuestra que el extracto de Hierba Santa presenta actividad antibacteriana en función de su concentración. Sin embargo, al comparar los resultados con los estudios citados, se puede inferir que en nuestra

investigación la actividad antibacteriana se observó a concentraciones más altas en comparación con los otros estudios (60% EHS para *Staphylococcus aureus* y 80% EHS para *Escherichia coli*).

Para respaldar lo mencionado, esta investigación clasificó el nivel de sensibilidad antibacteriana frente al EHS según la categorización de Duraffourd y Lapraz. Los resultados mostraron que, a concentraciones más altas de EHS, la actividad antimicrobiana se vuelve más pronunciada, alcanzando su máxima eficacia al 100% frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

En cuanto a la CMI, este estudio determinó que la CMI del EHS frente a *Staphylococcus aureus* fue del 53.33%, ya que esta fue la concentración más baja en la que no se observó turbidez, indicando que es la concentración mínima efectiva para inhibir el crecimiento bacteriano. Por otro lado, la CMI del EHS frente a *Escherichia coli* fue del 71.11%.

Los estudios nacionales de Zapata (7), Cruz et al. (29), Rodríguez (11) y el estudio internacional de Trujillo et al. (8) coinciden en que la CMI de sus respectivos EHS fue del 50% para *Escherichia coli* y del 25% para *Staphylococcus aureus*. Todas estas CMI son inferiores a las observadas

en la presente investigación. Esto podría sugerir que la Hierba Santa recolectada para este estudio contiene una menor concentración de metabolitos secundarios con propiedad antibacteriana en comparación con las utilizadas en investigaciones previas. Sin embargo, esta es solo una conjetura, y sería necesario realizar un análisis fitoquímico cuantitativo para comparar los metabolitos de estas plantas según su origen. A pesar de esto, se puede deducir que, en todos los casos, incluida la presente investigación, la CMI del EHS es siempre mayor para *Escherichia coli* que para *Staphylococcus aureus*.

Por otra parte, en relación a la CMB, para *Staphylococcus aereus* se encontró que a partir de la concentración de 55.56%, no se detectó crecimiento bacteriano (0 UFC). Asimismo, el CMB para *Escherichia coli* fue de 71.11%.

Estudios como el de Zapata (7) y Cruz et al. (29), encontraron que la CMB del extracto hidroalcohólico de Hierba Santa frente a *Escherichia coli* fue del 100% (100 mg/mL), un hallazgo superior al obtenido en nuestro estudio. En cambio, para *Staphylococcus aureus*, la CMB fue del 25% (25 mg/mL), resultando ser inferior a la CMB encontrada en esta investigación.

Al igual que las CMI determinadas, la CMB del EHS muestra diferencias entre las dos cepas estudiadas. Es decir, la CMB es superior para *Escherichia coli* en comparación con *Staphylococcus aureus*. Una posible explicación para estas diferencias radica en la estructura de la pared celular y la permeabilidad de la membrana celular de ambas cepas. Por ejemplo, *Escherichia coli*, al ser una bacteria gramnegativa, posee una membrana externa adicional que actúa como barrera para los agentes antimicrobianos. Esta membrana está compuesta principalmente por lipopolisacáridos y contiene porinas que limitan el ingreso de antibacterianos, de acuerdo con su tamaño y estructura molecular. Esto sugiere que se necesita una mayor concentración de EHS para inhibir y eliminar el crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* en comparación con *Staphylococcus aureus*.

CONCLUSIONES

PRIMERA: El extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* “Hierba santa”, presentó actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 a partir de la concentración del 60%, mientras que para *Escherichia coli* ATCC 25922 fue a partir del 80%.

SEGUNDA: En el extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* “Hierba santa”, se detectaron altas concentraciones de taninos, diterpenoides, flavonoides y alcaloides, evidenciadas por la intensidad máxima de la reacción colorimétrica (+++).

TERCERA: La Concentración Mínima Inhibitoria del extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* “Hierba santa” para *Staphylococcus aureus* fue de 53.33%, mientras que para *Escherichia coli* fue de 71.11%.

CUARTA: La Concentración Mínima Bactericida del extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* “Hierba santa” para la cepa

Staphylococcus aureus fue de 55.56%, mientras que para *Escherichia coli* fue de 71.11%.

RECOMENDACIONES

Evaluación de la actividad antibacteriana del EHS en modelos in vivo: Se recomienda realizar ensayos clínicos o pruebas en modelos animales para confirmar la efectividad del extracto etanólico de *Cestrum auriculatum* en organismos vivos. Esto permitirá comprender mejor su biodisponibilidad, su potencial para prevenir o tratar infecciones bacterianas y su seguridad a largo plazo.

Aislamiento e identificación de compuestos bioactivos: Se recomienda realizar estudios adicionales para aislar y caracterizar los compuestos específicos responsables de la actividad antibacteriana en *Cestrum auriculatum*. Esto podría implicar el uso de técnicas como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y espectrometría de masas (MS), lo que ayudaría a identificar los metabolitos secundarios presentes que podrían ser los agentes activos.

Pruebas frente a otras cepas bacterianas: Ampliar el espectro de bacterias evaluadas, incluyendo cepas multirresistentes o patógenos más relevantes, podría proporcionar información más completa sobre la efectividad del extracto en diferentes contextos clínicos. Esto también incluiría la evaluación de su actividad frente a bacterias gram negativas y gram positivas adicionales.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. [citado 14 de abril de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
2. Delgado-Paredes GE, Delgado-Rojas PR, Rojas-Idrogo C. Peruvian Medicinal Plants and Cosmopolitan Plants with Potential use in the Treatment of Respiratory Diseases and COVID-19. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*. 24 de mayo de 2021;11(2):295-321. Disponible en: <http://www.fotunejournals.com/peruvian-medicinal-plants-and-cosmopolitan-plants-with-potential-use-in-the-treatment-of-respiratory-diseases-and-covid19.html>
3. El-Saadony MT, Yang T, Imam MS, Alghamdi S, Salem HM, Korma SA, et al. Medicinal plants as alternative antimicrobial agents to combating the multi-drug resistant human pathogens: A comprehensive review. *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2022.998425
4. Neto CC, Owens CW, Langfield RD, Comeau AB, Onge JSt, Vaisberg AJ, et al. Antibacterial activity of some Peruvian medicinal plants from the Callejon de Huaylas. *Journal of Ethnopharmacology*. 1 de febrero de 2002;79(1):133-8. doi: 10.1016/S0378-8741(01)00398-1
5. Cervantes-García E, García-González R, Salazar-Schettino PM. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Mex Patol Clin Med Lab*. 2014;61(1):28-40.
6. Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, Römling U, Dobrindt U, Cantón R, et al. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*. 1 de julio de 2016;40(4):437-63. doi: 10.1093/femsre/fuw005
7. Zapata-Miranda E. Determinación de la actividad antibacteriana y antifúngica “in vitro” del extracto hidro-alcoholico de *Cestrum hediondium* Dun. “Hierba santa” en bacterias patógenas gram negativas, gram positivas y hongos. 2017 [citado 29 de marzo de 2025]; Disponible en: <http://repositorio.unsa.edu.pe/handle/UNSA/4531>
8. Trujillo-Santiago E, Villalobos-Delgado LH, Guzmán-Pantoja LE, López MG, Zafra-Ciprián DI, Nevárez-Moorillón GV, et al. The effects of Hierba

Santa (*Piper auritum* Kunth) on the inhibition of lipid oxidation in beef burgers. *Food science & technology*. 2021;146:111428-. doi: 10.1016/j.lwt.2021.111428

9. Godos-Chinchayhuara YY. Actividad antioxidante y contenido de polifenoles en hojas de *Cestrum auriculatum* L'Her (hierba santa). Universidad Católica Los Ángeles de Chimbote [Internet]. 28 de noviembre de 2018 [citado 29 de marzo de 2025]; Disponible en: <https://repositorio.uladech.edu.pe/handle/20.500.13032/7804>
10. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*. 1 de abril de 2012;23(2):174-81. doi: 10.1016/j.copbio.2011.08.007
11. Rodríguez-Ortiz R, Merselito E, Vera L, Alfredo C. DETERMINACIÓN DEL EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL ACEITE ESENCIAL DE HOJAS DE *Piper auritum* (HIERBA SANTA) SOBRE CULTIVOS DE *Staphylococcus aureus*.
12. WHO global report on traditional and complementary medicine 2019 [Internet]. [citado 10 de julio de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/publications/i/item/978924151536>
13. Bussmann RW, Glenn A, Sharon D, Chait DD, Pourmand K, Jonat B, et al. Proving that Traditional Knowledge Works: The antibacterial activity of Northern Peruvian medicinal plants. 2011 [citado 28 de marzo de 2025]; Disponible en: <http://hdl.handle.net/10125/21019>
14. Bendezu-García EE, Aguila-Quispe N. Efecto antidiarreico del extracto hidroalcohólico de las hojas de *cestrum auriculatum* "Hierba Santa" en ratones Albinos. Antidiarrheal effect of the hydroalcoholic extract of the leaves of *cestrum auriculatum* "Hierba Santa" in Albino Mice [Internet]. 30 de noviembre de 2022 [citado 29 de marzo de 2025]; Disponible en: <http://repositorio.uoosevelt.edu.pe/handle/20.500.14140/1298>
15. Matos-Palomino OJ. Efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de las hojas de *cestrum auriculatum* heritier «hierba santa» en *rattus rattus* var. *albinus*. 23 de enero de 2024 [citado 30 de abril de 2025]; Disponible en: <https://repositorio.uladech.edu.pe/handle/20.500.13032/35415>
16. Infobae. Hierba santa, la planta nativa del Perú que sirve como analgésico, antiinflamatorio y antimicrobiano: *Cestrum auriculatum* -

- Infobae [Internet]. [citado 30 de abril de 2025]. Disponible en: <https://www.infobae.com/peru/2024/08/12/hierba-santa-la-planta-peruana-que-sirve-como-analgésico-antiinflamatorio-y-antimicrobiano/>
17. Fundación Charles Darwin. *Cestrum auriculatum* [Internet]. [citado 30 de abril de 2025]. Disponible en: <https://datazone.darwinfoundation.org/es/checklist/?species=765>
 18. Soler R, Esteve P. Evaluación de la actividad bactericida de un antimicrobiano de origen natural. Universitat Politècnica de València
 19. Perú-Ecológico. Cultivos de los Incas - Plantas Medicinales: HIERBA SANTA [Internet]. [citado 30 de abril de 2025]. Disponible en: https://www.peruecologico.com.pe/med_hierbasanta.htm
 20. J. Foster T. 39 - *Staphylococcus aureus*. En: Sussman M, editor. *Molecular Medical Microbiology* [Internet]. London: Academic Press; 2002 [citado 30 de abril de 2025]. p. 839-88. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780126775303502580>
 21. Figueroa G G, Navarrete W P, Caro C M, Troncoso H M, Faúndez Z G. Portación de *Staphylococcus aureus* enterotoxigénicos en manipuladores de alimentos. *Revista médica de Chile*. agosto de 2002;130(8):859-64. doi: 10.4067/S0034-98872002000800003
 22. WHO News. *E. coli* [Internet]. [citado 30 de abril de 2025]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>
 23. Solmeglas. Medios de cultivo: Qué son, Usos y Tipos - SOLMEGLAS [Internet]. 2023 [citado 30 de abril de 2025]. Disponible en: <https://solmeglas.com/medios-de-cultivo-que-son-funcionalidades-calidad/>
 24. Beatriz-Pineda, E. Scribd [Internet]. [citado 10 de julio de 2025]. Metodología Investigacion Pineda 3ed Elia Beatriz Pineda | PDF | Paradigma | Observación. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/851038335/Metodologia-Investigacion-Pineda-3ed-Elia-Beatriz-Pineda>
 25. IDEXX. Guía microbiológica para interpretar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Octubre 2023; Disponible en:

<https://www.idexx.es/files/mic-gui%CC%81a-microbiolo%CC%81gica-es.pdf>

26. Fraga-Corral M, Otero P, Echave J, Garcia-Oliveira P, Carpena M, Jarboui A, et al. By-Products of Agri-Food Industry as Tannin-Rich Sources: A Review of Tannins' Biological Activities and Their Potential for Valorization. *Foods*. enero de 2021;10(1):137. doi: 10.3390/foods10010137
27. Yan Y, Li X, Zhang C, Lv L, Gao B, Li M. Research Progress on Antibacterial Activities and Mechanisms of Natural Alkaloids: A Review. *Antibiotics (Basel)*. 19 de marzo de 2021;10(3):318. doi: 10.3390/antibiotics10030318
28. Khwaza V, Aderibigbe BA. Potential Pharmacological Properties of Triterpene Derivatives of Ursolic Acid. *Molecules*. 16 de agosto de 2024;29(16):3884. doi: 10.3390/molecules29163884
29. Cruz-Ymata L, Zapata E. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE, ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA "IN VITRO" DEL EXTRACTO ALCOHOLICO DE *Cestrum auriculatum* L'HÉR. "HIERBA SANTA" EN BACTERIAS PATÓGENAS GRAMPOSITIVAS, GRAMNEGATIVAS Y HONGOS 2016.
30. Lock de Ugaz O. Investigación Fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales. Segunda. Fondo Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1994.
31. Estrella A. Passei Direto. 2024 [citado 10 de julio de 2025]. Gratis: Qualitative tests - Marcha fitoquímica - Material PDF claro y objetivo para un estudio rápido. Disponible en: <https://www.passeidireto.com/es/content/132547062/qualitative-tests-marcha-fitoquimica>
32. Junaid R S. Qualitative tests for preliminary phytochemical screening: An overview. ResearchGate [Internet]. [citado 10 de julio de 2025]; Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/339876937_Qualitative_tests_for_preliminary_phytochemical_screening_An_overview
33. Domínguez XA. Método de investigación fitoquímica. Departamento de Química del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey: LIMUSA; 281 p.

ANEXOS

Anexo 1: Recolección de la planta *Cestrum auriculatum* “Hierba santa”



Anexo 2: Separación de las hojas con las otras partes de la planta
Cestrum auriculatum “Hierba santa”



Anexo 3: Proceso de lavado de las hojas *Cestrum auriculatum* “Hierba Santa”



Anexo 4: Secado de las hojas *Cestrum auriculatum* “Hierba Santa”



Anexo 5: Certificado de la planta *Cestrum auriculatum* “Hierba santa”



HERBARIO TAKANA (TKA)

Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann
Facultad de Ciencias
Ciudad Universitaria - Av. Miraflores s/n, Tacna - Perú



CONSTANCIA DE IDENTIFICACION TAXONOMICA

Yo Dr. Pablo Juan Franco León Docente de la Facultad de Ciencias, de la Cátedra de Botánica de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, dejo constancia que:

La muestra alcanzada al laboratorio de Botánica por **Maria Mercedes Paredes Mamani** con DNI 74560869; bachiller de la Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica, Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna, cuya determinación taxonómica servirá para la realización del proyecto de Tesis: “ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA IN VITRO DEL EXTRACTO ETANOLICO DE *Cestrum auriculatum* “HIERBA SANTA” FRENTE A *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 y *Escherichia coli* ATCC 25922 TACNA 2024”, ha sido estudiada y clasificada como: *Cestrum auriculatum* y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISIÓN MAGNOLIOPHYTA

CLASE MAGNOLIOPSIDA

ORDEN SOLANALES

FAMILIA SOLANACEAE

GÉNERO *Cestrum*

ESPECIE *Cestrum auriculatum*

Nombre vulgar: Hierba santa

Se expide la presente Constancia a solicitud de la parte interesada para los fines que hubiera lugar.

Tacna, 23 de enero del 2025

Blgo. Pablo Juan Franco León
C.B.P. 2097

Anexo 6: Realización de envoltura y esterilización de los materiales



**Anexo 7: Trituración y pesado de las hojas de *Cestrum auriculatum*
“Hierba santa”**



Anexo 8: Verter alcohol 70°, forrar la botella con papel aluminio y lo almacenamos.



Anexo 9: Filtrado



Anexo 10: Preparación del agar Müller Hinton



Anexo 11: Preparación del caldo Infusión Cerebro Corazón



Anexo 12: Preparación del agar Nutritivo



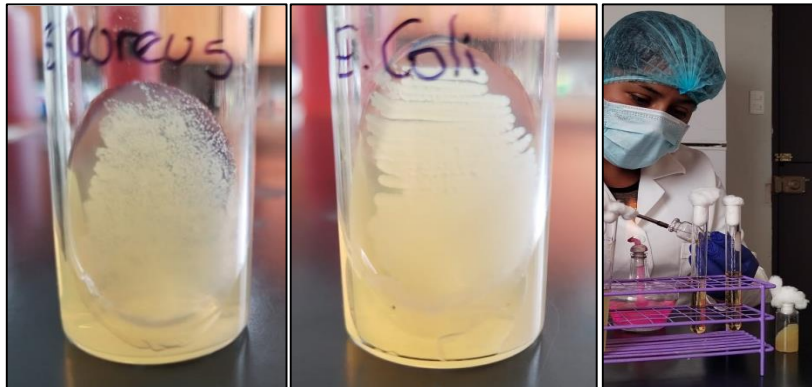
Anexo 13: Primer paso (se realizó la suspensión de ambos agentes bacterianos)



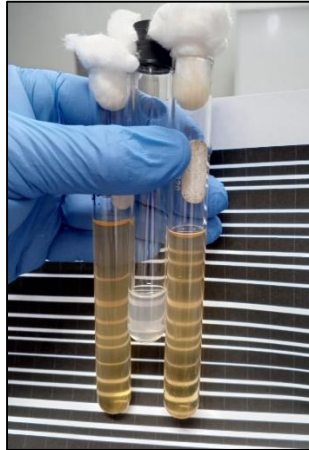
Anexo 14: Segundo paso (con la suspensión anterior del tubo de ensayo ahora se realiza el cultivo en viales por siembra en estría y agotamiento de ambos agentes bacterianos)



Anexo 15: Tercer paso (teniendo los viales con crecimiento bacteriano se realiza la última suspensión de ambos agentes bacterianos)



Anexo 16: Para ambos agentes bacterianos se realizó Nefelometría de McFarland (en los tres procedimientos se metieron en la incubadora)



Anexo 17: Inactivación de los discos



Anexo 18: Preparación de las concentraciones del extracto



Anexo 19: Embebiendo a cada disco con su respectiva concentración



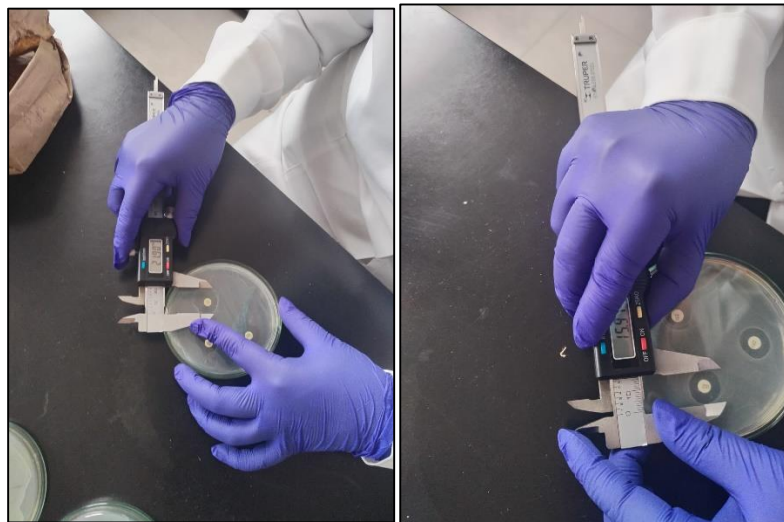
Anexo 20: Agregando la suspensión bacteria y realizando la siembre por
diseminación en superficie



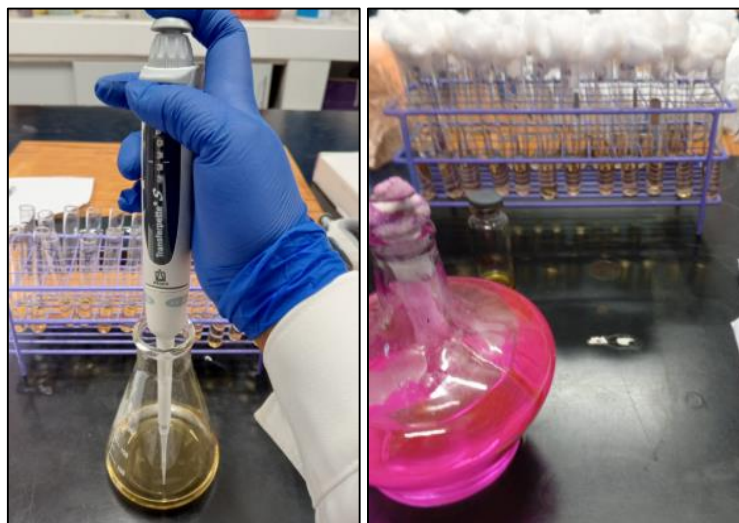
Anexo 21: Agregando los discos de sensibilidad con el respectivo
porcentaje del extracto en las placas



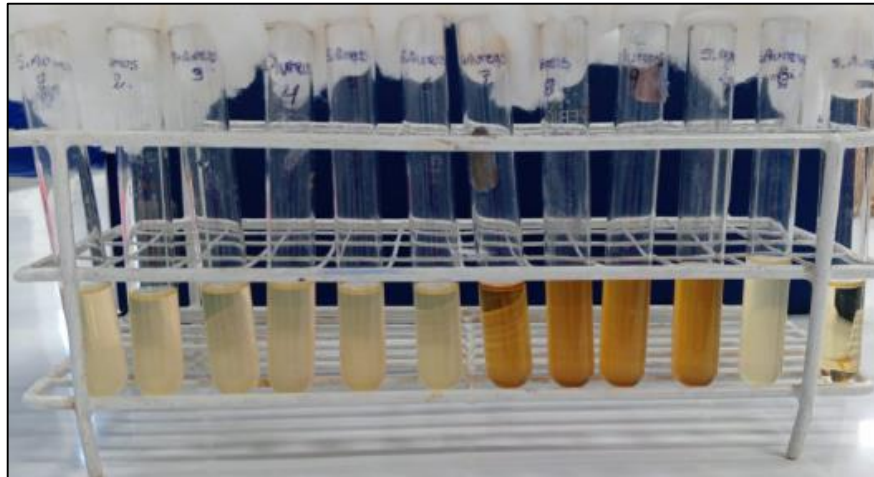
Anexo 22: Medición de los halos de inhibición



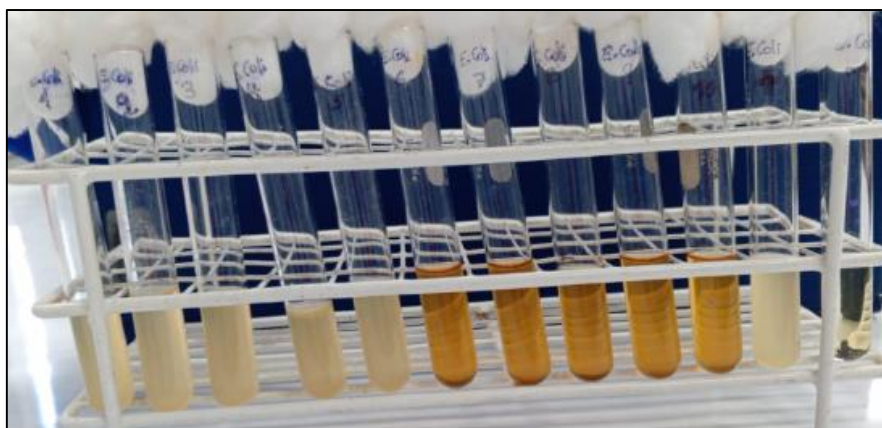
Anexo 23: Preparación de las diluciones para la determinación del CMI



Anexo 24: Resultados de la determinación de la CMI para *Staphylococcus aureus*



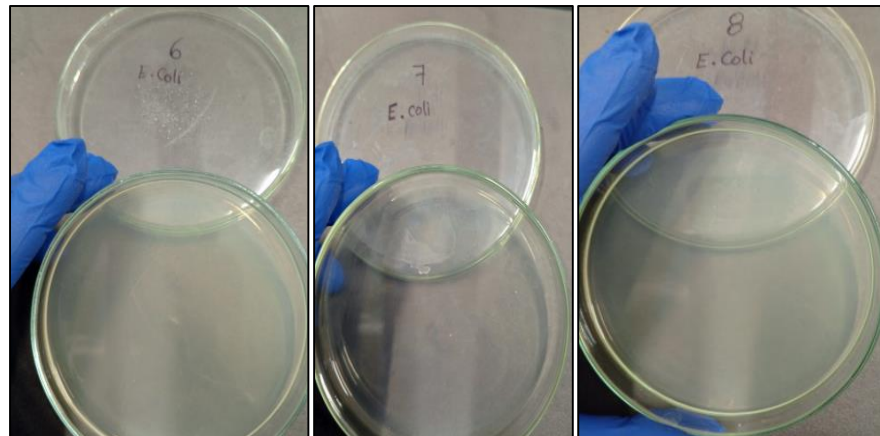
Anexo 25: Resultados de la determinación de la CMI para *Escherichia coli*



Anexo 26: Resultados de la determinación de la Concentración Mínima Bactericida para *Staphylococcus aureus*



Anexo 27: Resultados de la determinación de la Concentración Mínima Bactericida para *Escherichia coli*



Anexo 28: Preparación de los reactivos para la marcha fitoquímica

- **Reactivo de Cloruro férrico 1%:** Para preparar el reactivo se disuelve 1 gramo de cloruro férrico (FeCl_3) en 100 ml de agua destilada. Es importante agitar la solución hasta que el cloruro férrico se disuelva completamente. Se guardó la solución en un frasco ámbar, bien tapado, en un lugar fresco y oscuro para protegerla de la luz y la húmeda (30).
- **Reactivo de Acetato de cobre 10%:** Para preparar el reactivo se pesó con precisión 10 gramos de acetato de cobre (II) anhidro o dihidratado. Se debe disolver el acetato de cobre pesado en aproximadamente 80 ml de agua destilada caliente. Enfriar la solución y luego completar el volumen a 100 ml con agua destilada. Se guardó la solución en un frasco ámbar, bien tapado, en un lugar fresco y oscuro para protegerla de la luz y la húmeda (31).
- **Reactivo de Acetato de plomo 10%:** Para preparar el reactivo se pesó 10 gramos de acetato de plomo ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) en 100 ml de agua destilada. Se guardó la solución en un frasco ámbar, bien tapado, en un lugar fresco y oscuro para protegerla de la luz y la húmeda (32).
- **Reactivo Mayer:** Para obtener al reactivo se preparó dos soluciones la **Solución A:** 1,36 g de cloruro de mercurio HgCl_2 con 60ml de agua H_2O y la **Solución B:** se pesó 5g de yoduro de potasio KI en 10ml de agua H_2O . Ambas soluciones se diluyeron a 100ml. Se guardó la solución en un frasco ámbar, bien tapado, en un lugar fresco y oscuro para protegerla de la luz y la húmeda (30).

- **Reactivo Scheibler:** Para preparar el reactivo se pesó 100g tungstato de sodio más 70g Na_2HPO_4 y se diluyó a 500ml de agua H_2O . Y se acidificó con HNO_3 . Se guardó la solución en un frasco ámbar, bien tapado, en un lugar fresco y oscuro para protegerla de la luz y la húmeda (30).
- **Reactivo Hager:** Para preparar el reactivo se realizó una solución saturada de ácido pícrico. Se guardó la solución en un frasco ámbar, bien tapado, en un lugar fresco y oscuro para protegerla de la luz y la húmeda (30).
- **Reactivo Wagner:** Para preparar el reactivo se disuelven 1,27 gramos de yodo y 2 gramos de yoduro de potasio en 30 ml de agua, se disuelve bien y se afora hasta 100 ml con agua. Se guardó la solución en un frasco ámbar, bien tapado, en un lugar fresco y oscuro para protegerla de la luz y la húmeda (33).
- **Reactivo Dragendorff:** Para obtener al reactivo se preparó dos soluciones la Solución A: Disolver 8 gramos de nitrato de bismuto (III) pentahidratado en 20-25 ml de ácido nítrico al 25%. Y la Solución B: Disolver 27.2 gramos de yoduro de potasio en 50 ml de agua destilada. Se debe mezclar lentamente la solución A con la solución B, agitando constantemente. Dejar reposar la mezcla durante 24 horas. Luego, decantar el líquido sobrenadante y desechar el precipitado. Se realizó la dilución de la solución con agua destilada hasta un volumen final de 100 ml. Se guardó la solución en un frasco ámbar, bien tapado, en un lugar fresco y oscuro para protegerla de la luz y la húmeda (30)

