



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA**

TESIS

**“EFECTO ANTIBACTERIANO IN VITRO DEL EXTRACTO
ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Tarasa capitata* (MALVA)
SOBRE *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*”**

**PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

BACHILLER: CARCAUSTO MAMANI, Nelly Zuley.

ASESOR: Q.F BARRETO YAYA, Danilo Arturo.

LIMA – PERÚ

2016

Dedicatoria

A Dios porque sin su fuerza y aliento constante para llegar hasta este punto. A mis padres por el apoyo económico y moral que me dieron constantemente sin dudar que lograría mi objetivo.

Agradecimientos

Ante todo agradezco a Dios por haberme dado la sabiduría y fortaleza. A mis padres por ser el soporte de todo paso dado. A mi Asesor QF. Barreto Yaya, Danilo Arturo por sus conocimientos.

RESUMEN

En la actualidad podemos observar con frecuencia que los medicamentos que se aplican para las infecciones urinarias son medicamentos semisintéticos en su mayoría, estos muchas veces con reacciones adversas, contraindicaciones. Existen numerosas plantas medicinales que en su uso en medicina tradicional ha salvado muchas vidas y al parecer no presentan efectos nocivos. La presente investigación es un estudio de tipo experimental y tuvo como objetivo general determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de *Tarasa capitata* “malva” frente a cepas ATCC de *Escherichia coli* 25922 y *Staphylococcus aureus* 25923, mediante el método de difusión en agar sólido. El material utilizado en la presente investigación fueron las hojas de Malva y cepas de *Staphylococcus aureus* 25923 y *Escherichia coli* 25922. El método a utilizar fue el de difusión en agar sólido. Se evaluó el efecto antibacteriano del extracto acuoso de la Malva (*Tarasa capitata*) a diferentes concentraciones de 100mg, 50mg y 25mg frente a bacterias *Staphylococcus aureus* 25923 y *Escherichia coli* 25922. Los resultados mostraron que la concentración del extracto acuoso sobre la bacteria *Staphylococcus aureus* 25923 se vio a las concentraciones de 100mg. El extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Tarasa capitata* “malva” tiene actividad antibacteriana sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Conclusión La actividad antibacteriana fue evidenciada en los ensayos realizados, Anova, prueba de tukey y los halos en los que se demuestra la inhibición del crecimiento producida por el extracto de acuoso liofilizado de *Tarasa capitata* “malva” sobre el crecimiento de estas bacterias

Palabras Clave: Malva, Bactericida, Medicina tradicional.

ABSTRACT

Today we can see that drugs often applied for urinary tract infections are mostly semisynthetic drugs, these often with adverse reactions, contraindications. There are many medicinal plants in use in traditional medicine has saved many lives and apparently have no harmful effects. This research is an experimental study and had as its overall objective to determine the antibacterial effects of aqueous extract of *Tarasa capitata* "mauve " against strains of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Staphylococcus aureus* 25923, by the method of diffusion in solid agar. The material used in this investigation was the leaves of Malva and strains of *Staphylococcus aureus* 25923 and *Escherichia coli* 25922. The method used was the solid agar diffusion. The antibacterial effect of aqueous extract of mallow (*Tarasa capitata*) at different concentrations of 100mg, 50mg and 25mg was evaluated against *Staphylococcus aureus* 25923 and *Escherichia coli* 25922. The results showed that the concentration of the aqueous extract of the bacterium *Staphylococcus aureus* 25923 I was at concentrations of 100mg. Conclusion The antibacterial activity was evidenced in tests performed, Anova, Tukey and halos where the growth inhibition produced by the aqueous extract lyophilized *Tarasa capitata* "mallow " on growth of these bacteria is demonstrated

Keywords: mauve, bactericide, traditional medicine.

ÍNDICE

CARÁTULA	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE GRÁFICOS	viii
INTRODUCCIÓN	ix
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
1.1. Descripción de la Realidad Problemática.....	16
1.2. Formulación del Problema	17
1.2.1. Problema General	17
1.2.2. Problemas Específicos	17
1.3. Objetivos de la Investigación	18
1.3.1. Objetivo General.....	18
1.3.2. Objetivos Específicos	18
1.4. Hipótesis de la Investigación:.....	19
1.4.1. Hipótesis General	19
1.4.2. Hipótesis Secundarias	19
1.5. Justificación e Importancia de la Investigación	19
1.5.1.- Justificación de la Investigación	19

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	21
2.1. Antecedentes de la Investigación	21
2.1.1. Antecedentes Nacionales	21
2.1.2. Antecedentes Internacionales.....	22
2.2. Bases Teóricas	24
2.2.1.- Medicina tradicionales	24
2.2.1.1.- Definición	24
2.2.2.- Historia del Uso Medicinal de las Plantas.....	24
2.2.3.- Aspectos Botánicos de la Especie en Estudio.....	25
2.2.3.1.- Clasificación Taxonómica	25
2.2.3.2.- Descripción Botánica	25
2.2.3.3.- Hábitat y Ecología	27
2.2.3.4.- Partes Útiles de la Planta.....	28
2.2.3.5.- Composición Química	28
2.2.3.6.- Usos Tradicionales.....	29
2.2.4.- Descripción del Microorganismo en Estudio.....	29
2.2.4.1.- Bacteria Gram Negativa	29
2.2.4.2.- Taxonomía	30
2.2.4.3.- <i>Escherichia coli</i>	30
2.2.4.4.- Reconocimiento de la Bacteria.....	33
2.2.4.5.- <i>Staphylococcus aureus</i>	35
2.2.4.6.- Morfología	37
2.2.4.7.- Reconocimiento de la Bacteria.....	37
2.2.5.- Extractos de Plantas	38

2.2.6.- Ensayos Antimicrobianos	38
2.2.6.1.- Método de Difusión en Agar.....	39
2.3. Definición de Términos Básicos.....	39
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	41
3.1. Tipo de Investigación	41
3.2. Nivel de Investigación	41
3.3. Método de Investigación	41
3.4. Diseño de Investigación.....	41
3.5. Población y Muestreo de la Investigación	42
3.5.1. Población.....	42
3.5.2. Muestra.....	42
3.6. Variables e Indicadores	43
3.6.1. Variable Independiente.....	43
3.6.2. Variable Dependiente	44
3.6.3. Variable Implicada	45
3.7. Procedimiento, Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos	47
3.7.1. Procedimiento.....	47
3.7.2. Técnicas	47
A) Material Vegetal.....	47
B) Recolección de la Muestra Vegetal	47
C) Identificación de la Muestra Vegetal.....	47
D) Limpieza, Secado y Molienda de la Muestra Vegetal .	47

E) Preparación del Extracto Acuoso	48
F) Liofilización	48
G) Determinación de Extracción en Caliente de las Hojas de <i>Tarasa capitata</i> (Malva)	48
H) Preparación del Estándar (0,5 Mc. Farland).....	49
I) Preparación del Agar Nutritivo	50
J) Preparación del Agar Mueller Hinton.....	50
K) Selección del Disco de Sensibilidad Antibiótica.....	51
L) Preparación del Inóculo	52
M) Método de Excavación-Placa-Cultivo.....	52
N) Aplicación del Disco	53
O) Incubación.....	53
P) Lectura de las Placas e Interpretación de Resultados	54
3.7.3. Instrumentos.....	56

CAPÍTULO IV: PRESENTACION, ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS	57
4.1. Analisis e Interpretacion de Resultados	57
DISCUSIÓN.....	66
CONCLUSIONES	68
RECOMENDACIONES.....	69
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
ANEXOS.....	74

INDICE DE TABLAS

Tabla N°1: Clasificación Taxonómica	25
Tabla N°2: <i>Escherichia coli</i>	30
Tabla N°3: Tabla de Variable Independiente.....	45
Tabla N°4: Tabla de Variable Dependiente	46
Tabla N°5: Tabla de Variable Implicada	46
Tabla N°6: Clasificación de la Actividad Antimicrobiana Según el Porcentaje de Inhibición	55
Tabla N°7: Resultados de Determinación de la Presencia de Metabolitos Secundarios Según la Metodología thin layer chromatography (TLC).....	57
TABLA N°8: Diámetros de los Halos de Inhibición Producido por el Extracto Acuoso Liofilizado de <i>Tarasa capitata</i> (Malva) Sobre <i>Stahylococcus aureus</i>	58
TABLA N°9: Diámetros de los Halos de Inhibición Producido por el Extracto Acuoso Liofilizado de <i>Tarasa capitata</i> (Malva) Sobre <i>Escherichia coli</i>	58
Tabla N°10: Resultados de los Diámetros de los Halos de Inhibición de la Actividad Antibacteriana del Extracto de las Hojas de <i>Tarasa capitata</i> (Malva) Sobre Cepas ATCC 25922 de <i>Escherichia coli</i> y ATCC 25923 de <i>Staphylococcus aureus</i> 100mg	74
Tabla N°11: Resultados de los Diámetros de los Halos de Inhibición de la Actividad Antibacteriana del Extracto de las Hojas de <i>Tarasa capitata</i> (Malva) Sobre Cepas ATCC 25922 de <i>Escherichia coli</i> y ATCC 25923 de <i>Staphylococcus aureus</i> a 50mg	75

Tabla N°12: Resultados de los Diámetros de los Halos de Inhibición de la Actividad Antibacteriana del Extracto de las Hojas de *Tarasa capitata* (Malva) Sobre Cepas ATCC 25922 de *Escherichia coli* y ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus* a 25mg 76

INDICE DE GRAFICOS

GRAFICO N°1: <i>Tarasa capitata</i> “Malva”	27
GRAFICO N°2: <i>Escherichia coli</i>	32
GRAFICO N°3: <i>Staphylococcus aureus</i>	36
GRAFICO N°4: Interpretación de los Diámetros de los Halos de Inhibición Producido por el Extracto Acuoso Liofilizado de las Hojas de <i>Tarasa capitata</i> (Malva) a 100mg/ml, 50mg/ml y 25mg/ml Sobre el Crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> con el Control Positivo Mediante la Prueba del ANOVA.....	77
GRAFICO N°5: Interpretación Mediante la Prueba de Tukey de <i>Staphylococcus aureus</i>	78
GRAFICO N°6: Interpretación de los Diámetros de los Halos de Inhibición Producido por el Extracto Acuoso Liofilizado de las Hojas de <i>Tarasa capitata</i> (Malva) a 100mg/ml, 50mg/ml y 25mg/ml Sobre el Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> con el Control Positivo Mediante la Prueba del ANOVA	79
GRAFICO N°7: Interpretación Mediante la Prueba de Tukey de <i>Escherichia coli</i>	80
GRAFICO N°8: <i>Tarasa capitata</i> “Malva”	81
GRAFICO N°9: Recolección de <i>Tarasa capitata</i> “Malva” en el Distrito de Chiguata.....	81
GRAFICO N°10: Secado de <i>Tarasa capitata</i> “Malva”	82
GRAFICO N°11: Liofilizado de <i>Tarasa capitata</i> “Malva”	82
GRAFICO N°12: Incubación de Placas	83

GRAFICO N° 13: Placa Control Negativo y Positivo para <i>Staphylococcus aureus</i>	83
GRAFICO N° 14: Placa a la Concentración de 100mg de <i>Tarasa capitata</i> “Malva” Sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	84
GRAFICO N° 15: Placa a la Concentración de 50mg de <i>Tarasa capitata</i> “Malva” Sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	84
GRAFICO N° 16: Placa a la Concentración de 25mg de <i>Tarasa capitata</i> “Malva” Sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	85
GRAFICO N° 17: Placa Control Negativo y Positivo Para <i>E. coli</i>	85
GRAFICO N° 18: Placa a la Concentración de 100mg de <i>Tarasa capitata</i> “Malva” Sobre <i>Escherichia coli</i>	86
GRAFICO N° 19: Placa a la Concentración de 50mg de <i>Tarasa capitata</i> “Malva” Sobre <i>Escherichia coli</i>	86
GRAFICO N° 20: Placa a la Concentración de 25mg de <i>Tarasa capitata</i> “Malva” Sobre <i>Escherichia coli</i>	87

INTRODUCCIÓN

Se sabe que los antiguos peruanos empleaban las plantas de forma alimenticia, sino que además lo empleaban para curar los males que los aquejaban.

Existen informaciones bibliográficas^{1, 2} y folklóricas en la que se da a conocer el empleo de plantas para estos fines.

En la actualidad podemos observar con frecuencia que los antibióticos o antibacterianos, ya no son tan eficaces contra bacterias patógenas, debido a la resistencia que ellas crean para tales medicamento, se conoce infinidad de antibióticos que poseen diferente mecanismo de acción, entonces vemos que el principal problema es la resistencia bacteriana.

Por tales motivos es necesario pensar en alternativas terapéuticas seguras y eficaces, es por eso que se propone a la fitoterapia, que pertenece a la medicina alternativa ya que los efectos de las plantas medicinales por lo general son poco nocivas, guardando siempre las excepciones.

Los productos de la medicina tradicional tienen muy pocos efectos nocivos sobre nuestro organismo, a no ser que sean usadas en grandes dosis¹, el problema general recae en que esta medicina no es avalada científicamente.

En la fitoterapia existen numerosas plantas con efectos antibacterianos como por ejemplo: Ruda (*Ruta graveolens*), Romero (*Rosmarinus officinalis*) y Tomillo (*Thymus vulgaris*).

La importancia de la presente investigación radica en que de comprobarse el efecto antibacteriano del extracto acuoso de la malva, podría representar una buena base de investigación futura buscando el desarrollo de una alternativa terapéutica para el tratamiento de infecciones urinarias e infecciones respiratorias, ya que estos productos son seguros y eficaces.

La presente investigación tuvo como objetivo general evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de *Tarasa capitata* “malva” frente a cepas de *Eschericha coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

La determinación de la actividad antibacteriana in vitro del extracto acuoso de las hojas de malva se realizó por el método de Kirby bauer difusión en agar sólido.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1.- Descripción de la Realidad Problemática

En las últimas décadas, con la importancia que empezó a cobrar la medicina natural y los productos naturales, la malva se rescató por sus múltiples usos como actividad antiespasmódica, antiinflamatorio, actividad sedante, actividad antibacteriana. etc. En la actualidad podemos observar con frecuencia que los antimicrobianos ya no son eficaces contra bacterias patógenas debido a diversos mecanismos de resistencia que estas “ingenian” para tal producto farmacéutico, por otro lado, observamos que los medicamentos convencionales es decir pertenecientes a la medicina ortodoxa. Pueden tener reacciones adversas peligrosas, contraindicaciones numerosas e interacciones medicamentosas de cuidado, inclusive hay casos en los que se debe evaluar el riesgo beneficio.

Por último y por eso no menos importante que los demás; es la accesibilidad por parte de la población de escasos recursos y zonas alejadas a la gran urbe a los medicamentos ya que por lo general estos son caros o de difícil acceso. Por tales motivos es que se ve la necesidad de pensar en otras alternativas que sean seguras y eficaces, es por eso que se propone a la fitoterapia perteneciente al campo de la medicina alternativa, ya que se ha observado que el empleo de plantas medicinales constituye menores efectos perjudiciales para quienes las utilizan, además de representar bajos costos y gran aceptación por la población de escasos recursos. Por otro lado las infecciones urinarias e infecciones respiratorias son causadas por infecciones bacterianas.

Las principales bacterias causantes de estas patologías son *Escherichia coli* 25922 y *Staphylococcus aureus* 25923.

Las infecciones urinarias e infecciones respiratorias, se presentan hoy en día muy a menudo, por lo que resultaría una alternativa natural para el tratamiento de dichas afecciones.

Así mismo existen numerosas investigaciones de las variedades de estas especies, pero como extracto alcohólico los cuales no presentaron efecto antibacteriano frente a diferentes microorganismos, es por ello que se busca realizar el efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de *Tarasa capitata* “malva” frente a una bacteria presente en las infecciones urinarias.

1.2.-Formulación del Problema

1.2.1.- Problema General

- ¿El Extracto acuoso de *Tarasa capitata* “malva” presentara actividad antibacteriana sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923?

1.2.2.- Problema Específicos

- ¿A qué concentración el extracto acuoso de *Tarasa capitata* “malva” presentará actividad antibacteriana sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922?

- ¿A qué concentración el extracto acuoso de *Tarasa capitata* “malva” presentará actividad antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* 25923?

1.3.- Objetivos de la Investigación

1.3.1.- Objetivo General

- Determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de *Tarasa capitata* “malva” frente a cepas ATCC de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

1.3.2.- Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de las hojas de *Tarasa capitata* “malva” frente *Escherichia coli* 25922 mediante el método de difusión en agar sólido.
- Determinar el efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de *Tarasa capitata* “malva” frente a cepas ATCC de *Staphylococcus aureus* 25923, mediante el método de difusión en agar sólido.

1.4.- Hipótesis de la Investigación

1.4.1.- Hipótesis General:

El extracto acuoso de las hojas de *Tarasa capitata* “malva” tendrá un efecto significativo antibacteriano in vitro frente a cepas ATCC de *Escherichia coli* 25922 y *Staphylococcus aureus* 25923, al ser evaluado mediante el método de difusión en agar sólido.

1.4.2.- Hipótesis Secundarias:

- El extracto acuoso de las hojas de *Tarasa capitata* “malva” tendrá efecto antibacteriano frente a *Escherichia coli* 25922, al ser evaluado mediante el método de difusión en agar sólido.
- El extracto acuoso de las hojas de *Tarasa capitata* “malva” tendrá efecto antibacteriano frente a *Staphylococcus aureus* 25923, al ser evaluado mediante el método de difusión en agar sólido.

1.5.- Justificación e Importancia de la Investigación

1.5.1.- Justificación de la Investigación

a. Justificación Económica.

El presente proyecto de investigación tendrá como alcance beneficiar en primera instancia al público en general con una alternativa natural, de costo no elevado y sencillo de utilizar, para el tratamiento de las infecciones urinarias y respiratorias, cuya bacterias causantes son *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

b. Justificación Social

La malva es una planta perenne con atractivas flores de color rosa intenso y como se encuentra muy diseminada en el distrito de Chiguata-Arequipa, sus propiedades curativas para múltiples enfermedades pueden ser aprovechadas en casi todas las regiones geográficas.

Los beneficios de la malva abarcan las hemorroides, vaginitis, y afecciones del aparato urinario como inflamación de uretra, inflamación de la garganta, tos, inflamación de riñones, vejiga y cuando hay producción escasa de orina.

c. Justificación Académica

El trabajo de investigación será de mucha importancia ya que pretende justificar una alternativa natural para el tratamiento patológico de las infecciones urinarias y respiratorias, y que a su vez se evidencian diversos estudios científicos que aseveran que la malva presenta actividad antibacteriana frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, por ello se pretende demostrar que el extracto acuoso de la malva presenta actividad antibacteriana frente a la bacteria causante de las infecciones urinarias e infecciones respiratorias, vale decir *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1.- Antecedentes de la Investigación

2.1.1.- Antecedentes Nacionales

En el año (2009), Condori Pauca, Juana Victoria en la investigación “EFECTO DE LOS EXTRACTOS DE MALVA PARVIFLORA L. (MALVA) EN ÚLCERAS GÁSTRICAS INDUCIDAS POR ETANOL EN RATTUS ALBINUS AREQUIPA”. Hace referencia del efecto regenerador de tres extractos de *Malva parviflora L* “malva” empleados como tratamiento sobre la mucosa gástrica ulcerada experimentalmente con etanol absoluto. A 36 ratas albinas *Rattus albinus* variedad wistar,

Los resultados demostraron un mejor efecto regenerador que se observó con 5% de extracto etanolico que alcanzo regenerar la mucosa mientras que 5% del extracto acetato de etilo presento un efecto antiulceroso altamente significativo logrando a las 48 horas. La cicatrización casi total En conclusión, se demostró que el extracto acetato de etilo de *Malva parviflora L*. “malva” tiene un excelente efecto regenerador de la mucosa gástrica injuriada con etanol.¹

En el año (2011), Vigo Tejada, Katherine en la investigación “EFICACIA DEL USO DE LA MALVA EN EL TRATAMIENTO DE LA GINGIVITIS LEVE-MODERADA EN PACIENTES QUE ACUDEN AL CENTRO DE SALUD DE SANTA RITA DE SIGUAS AREQUIPA” Hace referencia que la Malva ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de gingivitis leve – moderada por la disminución de la inflamación gingival y del índice gingival después de la aplicación como un Enjuagatorio Bucal, por sus propiedades antiinflamatorias.²

2.1.2.- Antecedentes Internacionales

En el año (2014), M. Ramos. Y V. Aguilera en la investigación “EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS BIOACTIVOS A PARTIR DE FUENTES NATURALES” Hace referencia la extracción de compuestos bioactivos a partir del árbol de Fuentes naturales *Dorstenia brasiliensis*, *Schinus molle* y *Malva sylvestris* para evaluar la Actividad antimicrobiana frente a *Listeria monocytogenes*. Extractos de *Schinus molle* y *Malva sylvestris* mostraron un efecto inhibitorio contra el patógeno *Listeria monocytogenes*.³

En el año (2011), Calderón Hernández y Johana Andrea en la investigación “CARACTERIZACIÓN FITOQUÍMICA, ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES UTILIZADAS EN PEREIRA Y SANTA ROSA DE CABAL (RISARALDA)”

Hace referencia al uso de las especies vegetales estudiadas las cuales determinó que las especies cidrón (*Aloysia triphylla*), malva (*Malva sylvestris*), toronjil (*Melissa officinalis*), perejil (*Petroselinum sativum*) y ortiga (*Urtica dioica*) eran las que más se

comercializaban. De estas plantas se obtuvieron los extractos de n-hexano, diclorometano y metanol, sobre los cuales se evaluó la actividad antibacteriana frente a *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* usando la metodología de perforación en placa de agar. Pero ninguno de los extractos presentó actividad significativa a las concentraciones evaluadas (250-4000 mg/L).⁴

En el año (2010), Alvarado Alvarado, Maria Fernanda; Rodas Mancheno, Gabriela Mercedes en la investigación “INFLUENCIA DE LA ALTITUD SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS DE MALVA OLOROSA, ORTIGA Y AJENJO MEDIANTE EL MÉTODO DE DILUCIÓN SERIADA EN TUBO DE ENSAYO” Las pruebas mostraron, frente a *S. aureus*, una CIM de 2mg/ml para la malva olorosa y de 8mg/ml para la ortiga y el ajeno con porcentajes de inhibición de 99.99%-100%. Frente a *E. coli*, ninguno de los extractos presentó efecto inhibitorio a las concentraciones empleadas. Sin embargo, vale destacar, que conforme revela el análisis estadístico realizado, la altitud posiblemente influye en la actividad antibacteriana de los extractos de malva olorosa frente a *S. aureus*, sin embargo, no se puede descartar la posible influencia de la altitud sobre la actividad antibacteriana de estas plantas.⁵

2.2 Bases Teóricas

2.2.1.- Medicina Tradicional

2.2.1.1.- Definición

La medicina tradicional de los nativos de la costa, la selva y la sierra del Perú. Constituye el patrimonio más grande de la cultura inca y pre incas que ha permanecido vivo a través del tiempo. El Perú y casi todos los países de Latinoamérica en los cuales la medicina tradicional a permanecido viva a través de los siglos, pueden brindar una colaboración invaluable para el alivio de miles de personas del país y todo el mundo, a este legado prehispánico es necesario agregar una gran cantidad de plantas útiles que los emigrantes europeos, africanos y asiáticos han traído al Perú después del siglo XVI.

Las plantas medicinales representan la categoría de mayor expansión en los últimos tiempos. Son cada vez más populares por varias razones, entre ellas por su fácil obtención y porque muchas personas consideran que son inocuas y eficaces y que están libres de efectos adversos.²

2.2.2.- Historia del Uso Medicinal de las Plantas

En países industrializados, las investigaciones de las plantas medicinales han tenido sus altibajos durante las últimas décadas. Sin embargo, las sustancias derivadas de plantas constituyen aproximadamente el 25 % de las medicinas prescritas.

Además la necesidad de buscar cada vez nuevas fuentes para la obtención de antibióticos es de vital importancia en la salud pública, debido a la resistencia bacteriana que se produce con el transcurso del tiempo, por lo tanto cualquier fuente en la obtención de nuevos fármacos sería provechosa en el tratamiento de las enfermedades.⁶

2.2.3.- Aspectos Botánicos de la Especie en Estudio.

2.2.3.1.- Clasificación Taxonómica de *Tarasa capitata* (Malva)

Tabla N°1: Clasificación Taxonómica

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Malvales
Familia	Malvaceae
Subclase	Dillenidae
Género	Tarasa
Especie	<i>Tarasa capitata</i> (Cav.) Bates

Fuente: *Herbarium Arequipense (Husa)*

2.2.3.2.- Descripción Botánica.

Arbusto perenne, erecto hasta 2 m de altura, pubescente en su totalidad, cubierto de pelos estrellados.

Hoja de lámina 3 – 5 lobada, triangular, lóbulos de borde entero, crespo, ambas superficies incanas.

Alcanzan de 3 – 8 cm de largo y 2 – 4 cm de ancho, pecioladas, estipulas filiformes de menos de 5 mm de ancho.

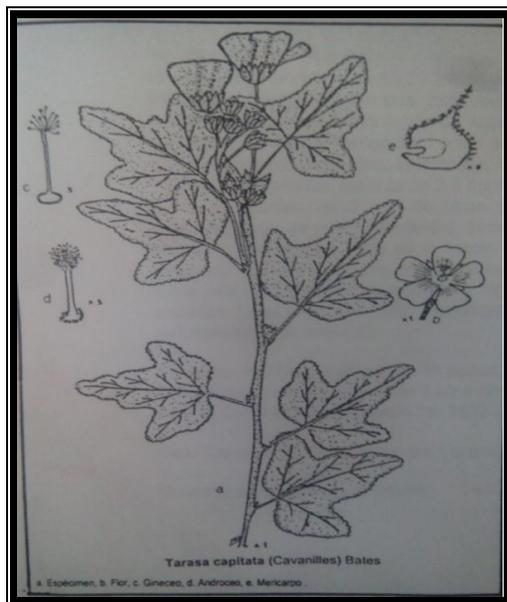
Flores dispuestas en cincinos axilares, plurifloros mucho más largos que la hoja con brácteas anchas.

Calículo de 2 – 3 bractéolas oval – lanceoladas, de hasta 10 mm de largo por 3 mm de ancho algo acrescente en la madurez, provista de 5 nectarios basales más o menos isodiamétricos, pequeños.

Pétalos liláceos, de hasta 2 cm de largo, auriculados, uña pilosa, levemente asimétricos, tubo de la corola glabro, de menos de 1 mm de largo, tubo estaminal más corto que los pétalos, anteras reniformes, estigmas capitados, carpelos uniovulados, óvulo erecto.

Fruto esquizocarpo con mericarpos dehiscentes con dos aristas apicales largas verticales de igual largo o más corto que el mericarpo, generalmente oblicuas, paredes laterales lisas, dorso y aristas cubiertas de pelos estrellados. Semilla reniforme, parda.⁷

GRAFICO N°1: *Tarasa capitata* “Malva”



FUENTE: RIQUEZA FLORISTICA DEL DISTRITO DE
CHIGUATA – AREQUIPA 2007 MARITZA
GLADYS RODRIGUEZ DIAZ UNAS

2.2.3.3.- Hábitat y Ecología

Arbusto perenne que desarrolla en áreas disturbadas, pendientes rocosas, laderas de cerros, cerca de los cultivos y caminos.

Brako y Zaruchi indican que es arbusto, crece en los Andes II – III, en áreas disturbadas, pendientes rocosas, desde los 1500 – 4000 m,

En la zona de estudios se encontró desde los 2600 – 3700 m en Tilumpaya, San Bernardo, Chiguata, la Rinconada, Miraflores, Cari Cari, Arenales Contune, Cachamarca y Espíritu Santo.⁷

2.2.3.4.- Partes Útiles de la Planta

Hojas y flores.²

2.2.3.5.- Composición Química

La malva tiene una importante cantidad de mucílagos.⁸ Estas sustancias corresponden a polisacáridos heterogéneos, los cuales posee varias aplicaciones medicinales. Entre otras, son responsables de las propiedades emolientes que posee la malva. Los mucílagos se encuentran tanto en las flores como en las hojas de esta planta.

Esta planta posee propiedades nutritivas, esto se debe a que posee una abundante cantidad de vitaminas entre sus componentes. La malva es rica en vitaminas A, B, C (ácido ascórbico) y posee pequeñas cantidad de vitamina E.

También contiene una importante cantidad de flavonoides. Estas sustancias poseen importantes propiedades antioxidantes. Debido a lo anterior ayudan a eliminar radicales libres del organismo, previniendo de esta forma la aparición de cáncer.

Las principales sustancias flavonoides que contiene la malva son las antocianinas, destacándose entre ellas, la malvidina.

La planta de la malva posee pequeñas cantidades de taninos en su composición, estas sustancias tienen propiedades antioxidantes.⁹

2.2.3.6.- Usos Tradicionales.

A) Propiedades Medicinales

Antiinflamatorio de la mucosa del estómago, de la vejiga, del intestino, boca, encías, la garganta y las amígdalas. También contra sequedad bucal, las úlceras estomacales e intestinales.

Estimula la producción de orina y combate la cistitis, pielitis, nefritis, uretritis.²

Es buena para la piel, los tractos gastrointestinales y respiratorios. Culturas ancestrales solían usarla en sus baños, por ejemplo. Sus hojas son comestibles y tiene un sabor muy suave.¹⁰

2.2.4.- Descripción de los Microorganismos en Estudio

2.2.4.1.- Bacteria Gram Negativa

En microbiología se denomina bacteria Gram Negativas a aquellas bacterias que no se tiñen de violeta por la tinción de Gram. Esta característica está íntimamente ligada a la estructura celular.¹¹

2.2.4.2.- Taxonomía.

Tabla N° 2: *Escherichia coli*

Dominio :	Bacteria.
Filo :	Proteobacteria.
Clase :	Gammaproteobacteria.
Orden :	Enterobacteriales.
Familia :	Enterobacteriaceae.
Género :	Escherichia.
Especie :	Escherichia coli. Migula, 1895.

Fuente: Maita Vásquez, Jessica Jeaneth; Guerra Davila, Percy Jonathan. Actividad Antibacteriana In Vitro Del Extracto Etanólico De Las Hojas De Ruta Graveolens (Ruda), Mediante El Método De Macrodilución Frente A Staphylococcus Aureus Y Escherichia Coli. [Tesis].

2.2.4.3.- *Escherichia coli*

Es uno de los habitantes más comunes del tracto intestinal de los humanos y tal vez el microorganismo más familiar en microbiología. Su presencia en el agua o en los alimentos es una indicación de contaminación fecal. *E. coli* no suele ser un microorganismo patógeno pero puede causar infecciones urinarias y ciertas cepas segregan enterotoxinas que producen la diarrea del viajero y en ocasiones enfermedades muy graves transmitidas por los alimentos.¹²

Escherichia coli es un bacilo corto de extremos redondeados, Gram negativos, presenta movilidad, sin cápsula, anaerobio facultativo.

La morfología típica de las colonias con brillo iridiscente, forman colonias convexas no viscosas, aplanadas con bordes definidos.

Escherichia coli es la causa más común de infección en las vías urinarias y constituye cerca del 90% de las infecciones de estas vías en mujeres jóvenes. Los síntomas y signos consisten en micción frecuente, disuria y a veces piuria. La mortalidad por septicemia debida a *Escherichia coli*, depende de la fuente de infección y la enfermedad subyacente del paciente y es significativamente más alta en los enfermos inmunodeprimidos.

A menudo para su identificación se emplea la diferenciación bioquímica, utilizando patrones de los aminoácidos y otras enzimas. Se emplea a menudo algunas pruebas como por ejemplo producción de indol a partir de triptófano. *Escherichia coli*, produce de manera típica pruebas positivas de indol, descarboxila la lisina, fermenta el manitol, producción de gas a partir de glucosa y fermenta la lactosa.¹³

GRAFICO N°2: *Escherichia coli*



Fuente:<http://skorpiomenlamedicina.blogspot.pe/2013/01/infeccion-urinaria-y-uropatia.html>

- Infecciones del Aparato Urinario:

E. coli es la principal causa de infección del aparato urinario, sobre todo en mujeres jóvenes. Los síntomas y signos incluyen poliuria, disuria, hematuria y piuria. El dolor en el flanco se asocia con infección de la parte superior del aparato urinario. Las infecciones de las vías urinarias pueden provocar bacteriemia con signos clínicos de septicemia.⁵

La población microbiana de la vagina es muy heterogénea y se ve influida en gran medida por diversos factores hormonales.

Las recién nacidas están colonizadas ya por lactobacilos desde su nacimiento los cuales predominan aproximadamente 6 semanas. Después de ese periodo los valores de estrógeno maternos han disminuido y la flora vaginal se modifica e incluye *estafilococcus* y *streptococcus* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae*.¹⁴

2.2.4.4.- Reconocimiento de la Bacteria

A) PRUEBA DE LA OXIDASA

Fundamento: La prueba de oxidasa se basa en la producción de la enzima oxidasa intracelular.

La reacción de la oxidasa se debe a un sistema de citocromo oxidasa que activa la oxidación del citocromo reducido por el oxígeno molecular, el que a su vez actúa como un aceptor de electrones en la fase terminal del sistema de transferencia de electrones.⁵

B) KLIGLER

Fundamento: Determina capacidad de un microorganismo para atacar un carbohidrato específico incorporado en un medio de desarrollo basal, con producción de gas o sin ella, junto con la determinación de la posible producción de ácido sulfhídrico.⁵

C) LISINA DESCARBOXILASA (LIA)

Fundamento: Determina la capacidad enzimática de un microorganismo de descarboxilar un aminoácido (L-lisina) para formar una diamina (cadaverina) con la resultante alcalinidad.⁵

D) CITRATO

Fundamento: Determina si un microorganismo es capaz de utilizar el citrato como única fuente de carbono para el metabolismo y el crecimiento con alcalinidad resultante.⁵

E) UREASA

Fundamento: Se basa en la capacidad de un microorganismo de hidrolizar la urea en dos moléculas de amoníaco por la acción de la enzima ureasa, con la resultante alcalinidad.⁵

F) ROJO DE METILO – VOGUES PROSKAUER (MRVP)

ROJO DE METILO (MR)

Fundamento: Esta prueba está basada en el uso de un indicador de pH, el rojo de metilo, para determinar la concentración de ión hidrógeno (pH) cuando un microorganismo fermenta la glucosa.

VOGUES PROSKAUER (VP)

Fundamento: Determina la capacidad de algunos microorganismos para producir un producto final neutro, acetil-metilcarbinol (AMC, acetoína), a partir de la fermentación de la glucosa.⁵

G) SULFURO, INDOL

SULFURO

Inoculación: Se siembra por picadura en el centro del medio, introduciendo la aguja con cuidado hasta unos 0.6 cm del fondo y extrayéndola siguiendo el mismo recorrido de entrada.

Formación de H₂S (S): Se manifiesta por un ennegrecimiento del medio en la línea de inoculación. *E. coli*: H₂S negativo

H) INDOL (I)

Fundamento: Determina la capacidad de las bacterias de degradar el triptófano dando indol.⁵

2.2.4.5.- *Staphylococcus aureus*

Es una bacteria anaerobia facultativa, gram positiva, productora de coagulasa, catalasa, inmóvil y no esporulada que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo, estimándose que una de cada tres personas se hallan colonizadas, que no infectadas, por ella. Puede producir una amplia gama de enfermedades, que van desde infecciones cutáneas y de las mucosas relativamente benignas, tales como foliculitis, forunculosis o conjuntivitis, hasta enfermedades de riesgo vital, como celulitis, abscesos profundos, osteomielitis, meningitis, sepsis, infecciones urinarias, endocarditis o neumonía.

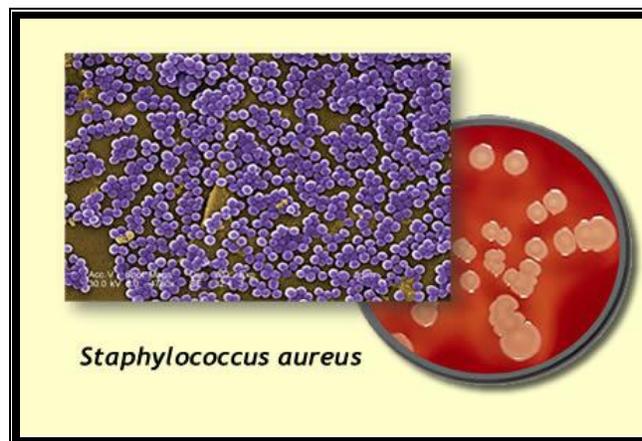
Además, también puede afectar al aparato gastrointestinal, ya sea por presencia física de *Staphylococcus aureus* o por la ingesta de la enterotoxina estafilocócica secretada por la bacteria. En la actualidad, este microorganismo se encuentra como el principal causante de las infecciones nosocomiales.

Esta situación se ve favorecida por el hecho de que esta especie habita tanto en las mucosas como en la piel de los seres humanos.

Lo que permite que a través de las heridas quirúrgicas pueda penetrar en el torrente sanguíneo del paciente por medio del contacto directo o indirecto con el personal sanitario, con un objeto contaminado o incluso con otro paciente.

Las cepas habituales de *Staphylococcus aureus* son resistentes a la penicilina, dejando como los antibióticos más eficaces para combatirlos a los aminoglucósidos, las cefalosporinas, la oxacilina o la nafcilina. Además de la administración del tratamiento antimicrobiano correspondiente, puede ser conveniente, en función del caso, la eliminación de puertas de entradas como catéteres venosos permanentes o drenajes quirúrgicos.¹⁵

GRAFICO N°3: *Staphylococcus aureus*



Fuente:<https://analizacalidad.wordpress.com/2014/07/17/caracteristicas-del-staphylococcus-aureus/>

2.2.4.6.- Morfología

S. aureus es un coco inmóvil, de 0,5 a 1 μm de diámetro, que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas.

En extendidos de pus los cocos aparecen solos, en pares, en racimos o en cadenas cortas.

Los racimos irregulares son característicos de extendidos tomados de cultivos que se desarrollan en medios sólidos, mientras que en otros cultivos son frecuentes las formas de diplococos y en cadenas cortas.¹⁵

2.2.4.7.- Reconocimiento de la Bacteria

A) Prueba de Catalasa

La catalasa funciona para catalizar la destrucción de peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua, y es de utilidad para evitar la formación de radicales tóxicos formados por el sistema de la mieloperoxidasa en las células fagocíticas.¹⁵

B) Prueba de Coagulasa

El *S. aureus* coagula el plasma descalcificado debido a la producción de una enzima conocida por estafilocoagulasa que actúa como un agente activo en la coagulación capaz de convertir el fibrinógeno en fibrina. Existe una correlación positiva entre la presencia de la misma y la virulencia del patógeno en humanos.¹⁵

La enzima se encuentra presente en dos formas.

- **Coagulasa Libre:** Es una proteína extracelular, que se encuentra presente en los filtrados de cultivos, la misma reacciona con el factor reactivo de la coagulasa (FRC) presente en el plasma, para formar una sustancia similar a la trombina (estafilotrombina), actúa indirectamente en la conversión del fibrinógeno en fibrina.
- **Coagulasa Ligada:** La coagulasa ligada o factor de aglutinación no está presente en filtrado de cultivos. Convierte el fibrinógeno en fibrina insoluble de forma directa sin intervención de los factores plasmáticos.¹⁵

2.2.5.- Extractos de Plantas

Los extractos de drogas, animales o vegetales, plantas o trozos de plantas pertenecen a las formas farmacéuticas más antiguas.

Tanto las plantas medicinales, como sus extractos, sirvieron en principio como medicamento, cuyo objetivo era el aislamiento de sustancias puras y exactamente definidas, a partir de drogas de diferentes procedencias.¹⁶

2.2.6.- ENSAYOS ANTIMICROBIANOS

Existe una gran variedad de métodos para detectar actividad antibacteriana.

Dependiendo del método los resultados pueden ser grandemente influenciados una vez que ellos no son igualmente sensitivos o no se basan en los mismos principios. Normalmente, esos métodos son clasificados en tres grandes grupos: métodos de difusión, dilución y antibiograma.

Estos son los más comúnmente utilizados por los grupos de búsqueda de antibacteriano de origen vegetal y serán descritos abajo.¹⁷

2.2.6.1.- Método de Difusión en Agar

El principio de las pruebas de difusión por disco ha sido utilizado por más de 70 años en los laboratorios de microbiología. Alexander Fleming utilizó una variante de esta técnica cuando trabajaba con la penicilina en los años cincuenta. En ese tiempo, había tantos procedimientos diferentes en uso como microbiólogos.

Los doctores Bauer, Kirby, Sherris y Turck probaron minuciosamente todas las variables involucradas en el proceso, tales como los medios de cultivo, la temperatura y el espesor del agar. En 1966, ellos publicaron su estudio cimero describiendo la prueba que se usa en la actualidad.

El NCCLS adoptó los pasos básicos del procedimiento descritos en el estudio de Bauer como el método de referencia para difusión por disco.¹⁸

2.3.- Definición de Términos Básicos:

- **Antibacteriano.-** Dícese del fármaco capaz de inhibir el crecimiento y desarrollo de bacterias o su eliminación sin dañar el organismo infectado, como los antibióticos.

- **Extracto Acuoso.-** Preparación en agua de la sustancia de una planta o un animal que contiene la porción biológicamente activa sin el residuo celular, separación de una mezcla de sustancias por disolución de cada componente, sirviéndose de uno o varios disolventes.

- **Liofilización.-** Método de conservación de una cosa que consiste en deshidratarla sometiéndola a una rápida congelación y eliminando el hielo posteriormente mediante un ligero calentamiento al vacío que lo transforma en vapor.

- **Infeción.-** Es un término clínico que indica la contaminación, con respuesta inmunológica y daño estructural de un hospedero, causada por un microorganismo patógeno, es decir, que existe invasión con lesión tisular por esos mismos gérmenes, sus productos o ambos a la vez

- **Cepas Certificadas:** Es un material biológico de referencia certificado. La colección certifica que se suministra una determinada cepa, que es un cultivo puro, y que se han observado las convenientes pruebas morfológicas, bioquímicas y moleculares correspondientes.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1.- Tipo de Investigación

- Aplicativa

3.2.- Nivel de Investigación

- Explicativo: Porque se busca explicar el efecto antibacteriano in vitro del extracto acuoso de las hojas de Malva (*Tarasa Capitata*) sobre cepas de *Eschericha Coli* y *Staphylococcus aureus*.

3.3.- Método de Investigación

- Análisis: El objeto de estudio es la determinación de la actividad antibacteriana del extracto de Malva sobre las cepas de *Eschericha Coli* y *Staphylococcus aureus*.
- Inductivo: Se partirá de algo particular para luego poder generalizarlo.
- Método estandarizado de difusión en disco descrito por el Laboratorio Internacional de Referencia: National Committee for Clinical Laboratory Standars (NCCLS).

3.4.- Diseño de Investigación

- **Experimental** porque se pueden manipular las variables y pueden ser controladas.

3.5.- Población y Muestreo de la Investigación

3.5.1.- Población

A) Población Vegetal.

- Constituido por el conjunto de plantas de *Tarasa capitata*.

B) Población Bacteriana.

- El estudio se realizó en cepas bacterianas puras de, *Escherichia coli* ATCC y *Staphylococcus aureus* ATCC, provenientes de la UNMSM, en la ciudad de Lima.

3.5.2.- Muestra

A) Muestra Vegetal.

- 500gr del pulverizado de la hoja de *Tarasa capitata*.

- **Criterios de Inclusión.**

- Plantas adultas.
- Plantas sanas.
- Plantas en buen estado de conservación.
- Plantas libre de excremento animal.

- **Criterios de Exclusión.**

- Plantas infestadas por microorganismos.
- Plantas secas o en mal estado de conservación.
- Plantas con resto de excremento animal.

B) Muestra Bacteriana.

- Colonias de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*; que se emplearán para la preparación del inóculo bacteriano.

- **Criterios de Inclusión.**

- Colonias que reúnan las características microscópicas y macroscópicas del microorganismo.
- Colonias con resultado positivo a las pruebas bioquímicas propias del microorganismo.

- **Criterios de Exclusión.**

- Colonias que no reúnan las características microscópicas y macroscópicas del microorganismo.
- Colonias con resultado negativo a las pruebas bioquímicas propias del microorganismo.
- Colonias con presencia de contaminantes.

3.6.- Variables e Indicadores

3.6.1.- Variable Independiente (Y)

- Extracto acuoso de las hojas de *Tarasa capitata* “malva”

Definición conceptual: Es la cantidad de extracto, producto seco obtenido por la liofilización, previa extracción de las hojas.

Definición operacional:

- Naturaleza: Cuantitativa.
- Medición: Directa
- Escala: De razón o proporción.
- Instrumento de medición: Balanza analítica.
- Procedimiento de medición: Se pesara el extracto seco (gr) luego se realizara su dilución con agua destilada.
- Indicadores: Diluciones seriadas porcentuales.
- Expresión final: %.

3.6.2.- Variable Dependiente (X)

- Efecto antibacteriano in vitro sobre cepas de *Eschericha coli* y *Staphylococcus aureus*.

Definición conceptual: Es la capacidad inherente a una sustancia de origen sintético o natural de inhibir el crecimiento de la bacteria.

Definición operacional:

- Naturaleza: Cualitativa
- Medición: Directa.
- Escala: De razón y nominal.
- Instrumento de medición: visual.
- Procedimiento de medición: Se midió los halos en las placas por las diferentes concentraciones del extracto.
- Indicador: Ausencia o presencia de la formación del halo del crecimiento bacteriano.

3.6.3.- Variable Implicada

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

- Variables Intervinientes.

De la planta:

- Lugar de recolección: Distrito de Chiguata
- Parte de la planta a estudiar: Hojas.
- Tipo de extracción: decocción
- Solvente usado: agua

Tabla N°3: Tabla de Variable Independiente (Y)

Variable	Dimensión	Indicadores	Unidad/Categoría
Extracto acuoso Liofilizado de la malva	Cantidad del extracto disuelto / cantidad de agua	Materia seca	Independiente Cuantitativa

FUENTE: Elaboración Propia

Tabla N°4: Tabla de Variable Dependiente (X)

VARIABLE	DIMENSIONES	INDICADORES	UNIDAD/CATEGORÍA
Efecto antibacteriano de <i>Tarasa capitata</i> “Malva” sobre <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	Método de difusión en agar solido por excavación	Diámetro en milímetros (mm) del halo inhibición.	Dependiente Cuali- Cuantitativa

FUENTE: Elaboración Propia

Tabla N°5: Tabla de Variable Implicada

Variable	Dimensiones	Indicadores	Unidad/Categoría
Cepas bacterianas puras de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>.	Observación	Crecimiento bacteriano	Cualitativa

FUENTE: Elaboración Propia

3.7.- Procedimiento, Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos

3.7.1.- Procedimiento

3.7.2.- Técnicas

A) Material Vegetal: Se utilizó las hojas de *Tarasa capitata* “Malva”.

B) Recolección de la Muestra Vegetal:

Las muestras de las hojas de *Tarasa capitata* “Malva”. Fueron recolectadas en la comunidad de Chiguata Departamento de Arequipa-Perú.

C) Identificación de la Muestra Vegetal:

Parte de la muestra vegetal de las hojas de *Tarasa capitata* “Malva”. Fue identificada en el “HERBARIUM AREQVIPENSE (HUSA)”.

D) Limpieza, Secado y Molienda de la Muestra Vegetal:

Limpieza y Esterilización: Primero se sometió a una clasificación por tamaño, seleccionando los de mejor desarrollo y uniformidad, eliminando las hojas en mal estado. Posteriormente se lavó para eliminar la tierra.

Secado: Las hojas fueron extendidas para facilitar el secado, que fue natural a medio ambiente.

Molienda: Se utilizó mortero hasta obtener un polvo impalpable.

Identificación Cromatografía: Se identificó sus metabolitos.¹⁷

E) Preparación de Extracto Acuoso.

- Se llevó a cabo mediante la cocción del pulverizado de la planta entera de 10 a 15 minutos, empleando como líquido extractivo el agua; luego se filtró con papel filtro rápido y luego con papel filtro lento, se congeló y se llevó a liofilizar.

F) Liofilización.

- Se colocó las muestras en un frasco especial que soporta grandes presiones.
- Se congeló las muestras a una temperatura de -4°C .
- Luego se colocó en el equipo de Liofilización por un tiempo de 72 horas.
- Se retiró para su conservación al medio ambiente.¹⁹

G) Determinación de Extracción en Caliente de las Hojas de *Tarasa capitata* (Malva)

- Se colocó 4.0gr de material seco de malva polvo grueso, pesado exactamente, en un matraz Erlenmeyer. Añadimos 100 ml de agua se pesó para obtener el peso total, incluido el matraz.

- Agitamos bien y dejamos reposar durante 1 hora. Adjuntamos un condensador de reflujo al matraz y se dejó hervir suavemente durante 1 hora; enfriamos y pesamos. Reajustamos al peso total original con el disolvente especificado en el procedimiento de prueba para el material de la malva.
- Agitamos bien y filtramos por succión a través de un filtro seco. Transferimos 25 ml del filtrado a un plato de fondo plano tarado y se evapora a sequedad en un baño de agua. Secamos a 105°C durante 6 horas, enfriamos en un desecador durante 30 minutos, a continuación, pesamos y sin demora.
- Calculamos el contenido de materia extraíble en mg por g de malva. Lo cual se hizo por duplicado dándonos así materia extraíble 0.80mg en promedio.¹⁵

H) Preparación del Estándar (0,5 Mc. Farland).

- Se agregó 0,5 ml de una solución de BaCl₂ 0,048 M (BaCl₂·2H₂O al 1,175% P/V) a 99,5mL de una solución de H₂SO₄ 0,18 M (0,36 N) (1% V/V) en constante movimiento para mantener la suspensión.
- Se verifico la densidad correcta del estándar usando un fotocolorímetro o espectrofotómetro, cuya absorbancia a 625nm sea de 0,08 a 0,10 para el estándar 0,5 de Mc. Farland.

- Luego se distribuyó de 4 ml a 6 ml en tubos de ensayo con tapa de rosca o tapón de jebe, similares a los que se usarán para preparar el inóculo.
- Se ajustó bien las tapas o tapones y almacenó en la oscuridad a temperatura ambiente.
- Antes de ser usado se agito vigorosamente utilizando un agitador mecánico.
- Se verifico la densidad de los estándares de sulfato de bario, para el control respectivo.¹⁵

I) Preparación del Agar Nutritivo.

- Se preparó el medio a partir de la base deshidratada, disolviendo 23gr en 1lt de agua destilada.
- Se calentó la suspensión en baño maría por unos minutos hasta disolver completamente el agar.
- A continuación se autoclavo a 121 °C y 1atm de presión durante 15min.
- Se dejó enfriar en baño de agua hasta que alcance los 45 – 50 °C.
- Luego se repartió el medio en tubos de ensayo y se dejó solidificar en forma de pico de flauta.
- Una vez esterilizado y solidificado se midió el pH, el valor del mismo se encontrara entre 6.8 ± 0.2 a temperatura ambiente.¹⁵

J) Preparación del Agar Mueller Hinton.

- Se preparó el medio a partir de la base deshidratada, disolviendo 34gr en 1lt de agua destilada.

- Se calentó la suspensión en baño maría por unos minutos hasta disolver completamente el agar.
- A continuación se autoclavó a 121 °C y 1atm de presión durante 15min.
- Se dejó enfriar en baño de agua hasta que alcance los 45 – 50 °C.
- Luego se repartió el medio en placas Petri colocando entre 25 a 30ml del medio para las placas de 100mm de diámetro interno junto con el inóculo de manera que el grosor del agar en la placa será de 4mm.
- Se dejó solidificar a temperatura ambiente.
- Una vez esterilizado y solidificado se midió el pH, el valor del mismo se encontrara entre 7.2 – 7.4 a temperatura ambiente.¹⁵

K) Selección del Disco (Control Positivo)

- La selección del antibiótico que se utilizara como control positivo se realizó teniendo en cuenta los siguientes criterios:
 - Eficacia clínica documentada.
 - Representatividad de una familia de antibióticos.
 - Disponibilidad de criterios técnicos fiables para la determinación *in vitro* de su eficacia clínica.
 - Presencia en el mercado nacional.
 - Importancia para la vigilancia de la resistencia bacteriana.¹⁵

L) Preparación del Inóculo.

- Se seleccionó cinco colonias bien aisladas, del mismo tipo morfológico, del cultivo en placa.
- Se procedió a tocar la superficie de cada colonia con un asa de siembra y se transfirió a un tubo que contiene de 4 a 5ml de Caldo Trypticasa de Soya.
- Se incubo el caldo a una temperatura entre 35°C a 37°C, hasta alcanzar la turbidez del estándar 0,5 de la escala de Mc. Farland (por lo general de 2 a 6 horas).
- Luego se ajustó la turbidez del inóculo con una solución salina o caldo apropiado hasta el tubo 0.5 de la escala de Mc. Farland, por comparación visual con el estándar. Para realizar este paso correctamente se usó una luz apropiada y se observó los tubos contra un fondo blanco con líneas negras como contraste.
- La suspensión que se preparada contiene aproximadamente $1 \text{ a } 2 \times 10^8 \text{ UFC/mL}$.¹⁶

M) Método de Excavación-Placa-Cultivo

- Se utilizó placas Petri estéril descartable de 90 x 15 mm las cuales fueron preparadas con agar Muller Hinton (MH Merck)
- Se agregó 1ml de suspensión del inoculo (Mac Farland 0.5 = $3 \times 10^8 \text{ UFC/ml}$) por cada 100ml de medio de cultivo, se mezcló asépticamente.
- Luego se repartió en las placas a razón de 25ml por placa y se dejó solidificar.

- Una vez que el agar solidificó se hicieron pozos con la ayuda de un sacabocado de 10 mm de diámetro externo.
- Se agregaron 100 µl de las tres concentraciones del liofilizado de la planta medicinal las cuales fueron 100 mg/ml, 50 mg/ml y 25 mg/ml.
- Se agregó 100 µl de Dimetilsulfoxido (DMSO Merck) como control negativo.
- Luego de 15 minutos de reposo las placas fueron incubadas a 35° C por 24h.
- Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado.

N) Aplicación Del Disco.

- Se colocó el disco individual sobre la superficie del agar con la ayuda de una pinza estéril presionando suavemente sobre cada disco para asegurar un contacto completo con la superficie del agar siendo este el control positivo.
- Se distribuyó los discos uniformemente, de modo que estén a una distancia mínima de 25 mm uno del otro (el diámetro de los discos según las normas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) debe ser de 6 mm.¹⁵

O) Incubación.

- Se incubó las placas en posición invertida entre 35°C – 37°C dentro de los 15 minutos posteriores a la aplicación de los discos.

- Luego del tiempo recomendado de incubación se examinó cada placa y se midió los diámetros de los halos de inhibición alrededor de cada disco.¹⁵

P) Lectura de las Placas e Interpretación de los Resultados.

- Se midió los diámetros de las zonas de inhibición completa (incluyendo el diámetro del disco), usando una regla o calibrador.
- Se mantiene iluminada la parte posterior de la placa petri con una luz reflejada localizada a unos cuantos centímetros sobre un fondo negro. Se observó la placa siguiendo una línea vertical directa para evitar una lectura errónea de las marcas de la regla por efecto de paralelismo.
- El punto final se tomara como el área que no muestra un crecimiento obvio, visible, que puede ser detectado mediante observación visual, no incluyendo velo de crecimiento o colonias muy pequeñas que puedan ser detectadas solo con mucha dificultad en el borde de la zona.¹⁵

Fórmula para Determinar del Porcentaje de Inhibición.

$$\%INHIBICIÓN: \frac{\text{Diámetro de la muestra} \times 100}{\text{Diámetro del control}}$$

Tabla N° 6: Clasificación de la Actividad Antimicrobiana según el Porcentaje de Inhibición

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	PORCENTAJE DE INHIBICIÓN
Inactivo	<40%
Poco activo	40 – 50%
Moderado activo	51 – 75%
Buena actividad	>76%

Concentración	Medida de halos <i>E. coli</i>	Medida de halos <i>S. aureus</i>	Control positivo	Porcentaje De Inhibición <i>E. coli</i>	Porcentaje De Inhibición <i>S. aureus</i>
100mg	23mm	27mm	25mm	92%	108%
	21mm	28mm	25mm	84%	112%
	22mm	28mm	25mm	88%	112%
50mg	18mm	22mm	25mm	72%	88%
	18mm	21mm	25mm	72%	84%
	17mm	22mm	25mm	68%	88%
25mg	14mm	18mm	25mm	56%	72%
	15mm	18mm	25mm	60%	72%
	15mm	19mm	25mm	60%	76%

Fuente: Actividad Antibacteriana IN VITRO de *Geranium ayavacense* sobre *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*, IMET-ESSALUD-2013.

3.7.3.- Instrumentos

- Libros
- Recolección de Datos
- Revistas
- Páginas de internet

CAPÍTULO IV

PRESENTACION, ANALISIS E INTERPRETACION DE RESULTADOS

4.1. Analisis e Interpretacion de Resultados

Tabla N°7: Resultados de Determinación de la Presencia de Metabolitos Secundarios Según la Metodología thin layer chromatography (TLC).

Determinación de Metabolitos secundarios	
Metabolitos secundarios	Resultados
Taninos	Positivo
Flavonoides	Positivo
Alcaloides	Negativo
Sesquiterpenlactonas	Positivo
Saponinas terpenoidales	Positivo
Mono terpenos	Positivo
Di terpenos	Positivo

Fuente: Elaboración propia

INTERPRETACIÓN: Los metabolitos secundarios que se encontraron presentes fueron: Taninos, flavonoides, Sesquiterpenlactonas, Saponinas Terpenoidales. Mono terpenos, Di terpenos.

TABLA N°8: Diámetros de los Halos de Inhibición Producido por el Extracto Acuoso Liofilizado de *Tarasa capitata* (Malva) Sobre *Stahylococcus aureus*.

Concentración del extracto acuoso liofilizado	CONTROL POSITIVO (Gentamicina)	DROGA (mm)		CONTROL NEGATIVO (Dimetil sulfoxido)
		X	DS	
25 mg/ml	25 mm	18,3mm ± 1,07		0 mm
50 mg/ml	25 mm	21,6mm ± 0,58		0 mm
100 mg/ml	25 mm	27,6mm ± 0,58		0 mm

Fuente: Elaboración propia

Interpretación: En la siguiente tabla se observa que en las diferentes concentraciones hubo halos de inhibición igual y más elevada que la muestra patrón

TABLA N°9: Diámetros de los Halos de Inhibición Producido por el Extracto Acuoso Liofilizado de *Tarasa capitata* (Malva) Sobre *Escherichia coli*.

Concentración del extracto acuoso liofilizado	CONTROL POSITIVO (Gentamicina)	DROGA (mm)		CONTROL NEGATIVO (Dimetil sulfoxido)
		X	DS	
25 mg/ml	25 mm	14,6mm ± 0,58		0 mm
50 mg/ml	25 mm	17,6mm ± 0,58		0 mm
100 mg/ml	25 mm	22mm ± 1		0 mm

Fuente: Elaboración propia

Interpretación: En la siguiente tabla se observa que en las diferentes concentraciones hubo halos de inhibición casi similares a la muestra patrón.

ANOVA

A fin de verificar la performance del compuesto propuesto (malva) en las bacterias *E. coli* y *S. aureus* será considerado un estudio ANOVA. Así, fueron considerados 3 réplicas ($i = 1; 2; 3$) y 3 niveles de concentración de Malva, 100, 50 y 25 así como un grupo control (gentamicina) ($j = 1; 2; 3; 4$).

El modelo ANOVA es dado por

$$y_{ij} = \mu + \alpha_j + \epsilon_{ij}, \quad i = 1, 2, 3 \quad j = 1, 2, 3, 4 \quad (1)$$

En que

- y_{ij} representa las medidas observadas que en este trabajo es el diametro del disco
- μ es una constante e indica la respuesta media de todos los niveles.
- α_j es el efecto del nivel j .
- ϵ_{ij} es el error no observado y es considerado una variable aleatoria con distribucion normal con media cero y varianza σ^2

El análisis ANOVA descompone la variación total de la muestra, en dos componentes:

$$\text{Variación Total} = \text{Variación Entre} + \text{Variación Intra}$$

La igualdad anterior indica que la variación total es igual a la suma de la variación o dispersión entre los grupos, más la variación o dispersión dentro de cada grupo. Los grupos están definidos por los niveles de factor.

Los grados de libertad (número de observaciones – parámetros a estimar) correspondientes a cada uno de los componentes de la variación total son:

- Variación Entre: 4 – 1
- Variación Intra: 12 – 4
- Variación Total: 12 – 1

El ANOVA busca saber si los distintos niveles de un factor influye en los valores de una variable continua (diámetro del disco), para que efectivamente sí haya diferencias en los valores de la variable continua según el nivel del factor, se tiene que dar simultáneamente que el comportamiento de la variable continua sea lo más distinto posible para los distintos niveles del factor, y a su vez, que dentro de cada grupo (determinado por los niveles del factor) los valores sean lo más homogéneos posibles. Por tanto, se espera observar que la variación intragrupos sea mínima, y que la variación entre-grupos sea máxima.

En este contexto, en el ANOVA se tiene que la hipótesis nula a contrastar establece la igualdad de efectos

$$H_0 : \alpha_1 = \alpha_2 = \alpha_3 = \alpha_4 = 0 \quad (2)$$

Siendo la hipótesis alternativa (H_1) que alguno de los efectos diferenciales sea distinto de cero El estadístico utilizado para realizar la prueba de hipótesis es dado por

$$E \left[\frac{\text{Variación entre}/(4 - 1)}{\text{Variación intra}/(12 - 4)} \right] \approx F_{3,8}, \quad (3)$$

A continuación en la tabla a seguir se muestra la estadística F calculada. Nótese que $F_{3;8} = 196.89$ y el p-valor es menor que 0; 05. De acuerdo con el p-valor, se tiene que existe evidencia para rechazar H_0 y considerar H_1 , esto indica que los efectos de cada nivel son diferentes en la longitud de cada diámetro.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Niveles	3	147.67	49.22	196.89	0.0000
Residuals	8	2.00	0.25		

VERIFICACIÓN DE LA HOMOGENEIDAD DE LA VARIANZA

A fin de verificar la homogeneidad de la varianza entre los diferentes grupos (3 niveles de concentración 100, 50 y 25) será considerado una prueba de hipótesis para tener evidencia sobre la homogeneidad de la varianza de los errores no observados. Recordemos que el modelo ANOVA es dado por

$$y_{ij} = \mu + \alpha_j + \epsilon_{ij}, \quad i = 1, 2, 3 \quad j = 1, 2, 3, 4 \quad (1)$$

En que:

- y_{ij} representa las medidas observadas que en este trabajo es el diámetro del disco (E. coli y S. aureus)
- μ es una constante e indica la respuesta media de todos los niveles.
- α_j es el efecto del nivel j , osea, las diferentes concentraciones.
- ϵ_{ij} es el error no observado y es considerado una variable aleatoria con distribución normal con media cero y varianza σ^2

Se debe notar que se está asumiendo que la varianza σ^2 es igual para todos los grupos. Una vez que se asume esto, será verificado esta suposición utilizando el test de Levene's. Las hipótesis para este test son:

$$H_0 : \sigma_1 = \sigma_2 = \sigma_3 = \sigma_4$$

H_1 : Las varianzas no son iguales,

En que el nivel de significancia generalmente es fijada en $\alpha = 0.05$. Caso el p-valor del test de Levene's sea menor que 0.05 entonces se tiene evidencia para rechazar la hipótesis de homogeneidad de la varianza, esto es, los grupos tienen diferentes varianzas σ_i^2 $j = 1, 2, 3, 4$. Sin embargo, si el p-valor es mayor que 0,05 entonces de acuerdo con los datos no se tienen evidencia para afirmar que las varianzas son diferentes. Nota: Fue utilizado el software R para el análisis estadístico junto con la librería car. Además, el valor del p-valor en este software es dado en Pr (>F).

Table 1: Resultados para aureus con malva.

	Df	F value	Pr(>F)
group	3	0.33	0.8018
	8		

Table 2: Resultados para coli con malva

	Df	F value	Pr(>F)
group	3	0.89	0.4872
	8		

Interpretación: Se puede observar que el p-valor para el caso de aureus (0.8018) y para el caso de coli (0.4872) son mayores que 0.05. Esto indica que no se tiene evidencia para rechazar la hipótesis nula, esto es, suponer que la homogeneidad de la varianzas es plausible. Por tanto, el ANOVA proporcionó resultados coherentes.

A fin de saber si existe diferencia entre los diferentes niveles (comparaciones) será considerado la prueba HSD de Tukey. Será denotado por A al nivel 100, B al nivel 50, C al nivel 25 y por D al grupo control.

	diff	lwr	upr	p dj
B-A	-6	-7.30736	-4.69265	2.2E-06
C-A	-9.33333	-10.6407	-8.02598	0
D-A	-2.66667	-3.97402	-1.35931	0.00083
C-B	-3.33333	-4.64069	-2.02598	0.00017
D-B	3.33333	2.02598	4.64069	0.00017
D-C	6.66667	5.35931	7.97402	1E-06

De acuerdo con la tabla anterior se puede observar que existen diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de Malva y el grupo control. En este sentido, cuando se tiene una concentración de 100 se observa que este supera el efecto del grupo control.

Así, estadísticamente se tiene evidencia que la concentración de malva al 100 tiene un mejor desempeño al del grupo control (diámetro del disco). Las otras concentraciones no se muestran este comportamiento.

Para el caso de la bacteria *E. Coli* se tiene los siguientes resultados

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Niveles	3	188.33	62.78	150.67	0.0000
Residuals	8	3.33	0.42		

Así, de acuerdo con la tabla anterior se tiene que el p-valor es menor que 0; 05 y por tanto se tiene evidencia para rechazar la hipótesis H_0 y considerar la hipótesis alternativa, ósea, que los diferentes niveles de malva tienen efectos diferentes (diámetros en el disco).

	diff	lwr	upr	p
B-A	-4.33333	-6.02112	-2.64555	0.00017
C-A	-7.33333	-9.02112	-5.64555	3.3E-06
D-A	3	1.31221	4.68779	0.00205
C-B	-3	-4.68779	-1.31221	0.00205
D-B	7.33333	5.64555	9.02112	3.3E-06
D-C	10.3333	8.64555	12.0211	2E-07

A la luz de los resultados anterior, será considerada las comparaciones de Toker. De acuerdo con la tabla a continuación, se tiene que ninguna de las concentraciones tiene un desempeño mejor que el de grupo control.

Observación: Puede ser considerado una comparación de Duncan, sin embargo el objetivo es comparar los diferentes niveles en la relación con el grupo control, y en esa perspectiva es más conveniente utilizar la comparación de Tukey o de Dunnett.

DISCUSIÓN

- Los resultados de la prueba de excavación-placa-cultivo nos demuestran que esta planta posee actividad antibacteriana contra *Escherichia coli* ATCC 25922 con un halo de inhibición máximo de 23mm en 24 horas y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con un halo de inhibición máximo de 27mm en 24 horas, esto es respaldado por el trabajo realizado por Condori Pauca (2009), donde analizan el Efecto De Los Extractos De *Malva Parviflora L.* (Malva) En Úlceras Gástricas Inducidas Por Etanol En *Rattus Albinus* Arequipa.
- De acuerdo al Grafio N° 4 y Gráfico N° 5 los halos de inhibición hallados fueron de 28 mm a las 24 horas, para una concentración de 100 mg/ml, la misma que indica que los extractos tiene componentes bioactivos frente a *Staphylococcus aureus*, esto respaldado por Vigo Tejada, Katherine (2011), en su trabajo de Eficacia Del Uso De La Malva En El Tratamiento De La Gingivitis Leve-Moderada En Pacientes Que Acuden Al Centro De Salud De Santa Rita De Sigwas Arequipa.
- El resultado de la prueba de identificación de compuestos de *Tarasa capitata* (Malva) se evidencian en la tabla N° 7 tales como metabolitos secundarios, taninos y flavonoides, esto respaldado por M. Ramos y V. Aguilera (2014), en su trabajo Extracción de Compuestos Bioactivos a partir de Fuentes Naturales.

- Los resultados esperados como lo demuestran las tablas N^o8 y N^o9 se ve el efecto antibacteriano como extracto acuoso de *Tarasa capitata* sobre cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, lo cual es distinto los resultados por la diferencia de extractos como lo respalda Calderon Hernandez y Johana Andrea (2011), en su trabajo Caracterización Fitoquímica, Actividad Antibacteriana Y Antioxidante De Extractos De Plantas Medicinales Utilizadas En Pereira Y Santa Rosa De Cabal (Risaralda).
- De acuerdo a las Tablas N^o 6 y N^o 7 los halos de inhibición de Gentamicina, son de 25mm a las 24 horas, se observa que los extractos de *Tarasa capitata* a la concentración de 100 mg/ml y 50mg/ml tienen halos de inhibición de 28mm y 22mm valores superiores y cercanos a la gentamicina, lo que respalda el trabajo de Alvarado Alvarado, Maria Fernanda; Rodas Mancheno (2010), en su trabajo de Influencia De La Altitud Sobre La Actividad Antibacteriana De Extractos De Malva Olorosa, Ortiga Y Ajenjo Mediante El Método De Dilución Seriada En Tubo De Ensayo.

CONCLUSIONES

- El extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Tarasa capitata* “malva” tiene actividad antibacteriana sobre el crecimiento de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. La actividad antibacteriana fue evidenciada en los ensayos realizados, Anova, prueba de tukey y los halos en los que se demuestra la inhibición del crecimiento producida por el extracto de acuoso liofilizado de *Tarasa capitata* “malva” sobre el crecimiento de estas bacterias
- El extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Tarasa capitata*, presenta moderados porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922. El mayor porcentaje de inhibición se obtuvo a una concentración de 100mg/ml del extracto, sobre el crecimiento de *Escherichia coli* ATCC 25922 el cual fue de 88% respecto a la inhibición producida por el control positivo tal como lo muestra el ANOVA y los halos de inhibición de 22mm.
- El extracto acuoso liofilizado de las hojas de *Tarasa capitata*, presenta elevados porcentajes de inhibición sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. El mayor porcentaje de inhibición se obtuvo a una concentración de 100mg/ml del extracto, sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 el cual fue de 110.66% respecto a la inhibición producida por el control positivo tal como lo muestra la prueba de ANOVA, tukey y los halos de inhibición de 27.66mm.

RECOMENDACIONES

- Realizar bioensayos en animales de experimentación para determinar la toxicidad aguda de las hojas de *Tarasa capitata* (Malva)
- Realizar ensayos de la actividad anti fúngica de *Tarasa capitata* (Malva) con otros microorganismos patógenos para poder ampliar el espectro de acción de esta planta.
- Realizar ensayos con el aceite esencial de *Tarasa capitata* (Malva) con otros microorganismos patógenos para infecciones respiratorias.
- Realizar comparaciones con otro tipo de malvas para evaluar su efecto antibacteriano.
- Realizar estudios con la raíz y fruto de la *Tarasa capitata* (Malva) y ver si tiene efecto antibacteriano sobre estas cepas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Condori J. Efecto De Los Extractos De Malva Parviflora L. "Malva" En Úlceras Gástricas Inducidas Por Etanol En Rattus Albinus Arequipa 2008.[Tesis para optar el título de Farmacia y Bioquímica]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2009.
2. Vigo K. Eficacia Del Uso De La Malva En El Tratamiento De La Gingivitis Leve-Moderada En Pacientes Que Acuden Al Centro De Salud De Santa Rita De Siguaná Arequipa 2013. [Tesis para optar el grado de doctor de odontología].Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2014.
3. M. Ramos. Y V. Aguilera. Extracción De Compuestos Bioactivos A Partir De Fuentes Naturales [Tesis para optar el grado de ciencia y tecnología]. Guanajuato: ECORFAN; 2014.
5. Calderón A. Caracterización Fotoquímica, Actividad Antibacteriana Y Antioxidante De Extractos De Plantas Medicinales Utilizadas En Pereira Y Santa Rosa De Cabal (Risaralda) [tesis para optar el título de Tecnólogo Química]. Santa Rosa: Universidad tecnológica de Pereira; 2011.
6. Alvarado M, Rodas G. Influencia De La Altitud Sobre La Actividad Antibacteriana De Extractos De Malva Olorosa, Ortiga Y Ajenjo Mediante El Método De Dilución Seriada En Tubo De Ensayo [tesis para optar el título de Bioquímico Farmacéutico]. Cuenca – Ecuador: Universidad de cuenca; 2009.
7. Sarmiento L. Efecto Antibacteriano Del Extracto Alcoholico Y Del Extracto Acuoso De Té Verde (Camellia Sinensis) Sobre Bacterias Orales De Importancia Estomatologica, Streptococcus Mutans, Streptococcus Mitis Y Streptococcus Salivarius U.A.P [tesis para optar el título de odontología]. Arequipa: Universidad Alas Peruanas; 2010.

8. Rodriguez G. Riqueza Florística Del Distrito De Chiguata – Arequipa [Tesis para optar el título de Biólogo]. Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín; 2007.
9. kuklinski U. Farmacognosia estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen animal. 2^{da} Ed. Barcelona: Omega S.A.; 2003. p. 72-73.
10. <http://www.plantasparacurar.com/composicion-de-la-malva/>
11. <http://www.ecoosfera.com/2015/08/8-plantas-que-seguro-no-sabias-que-son-comestibles-y-deliciosas/>
12. Rodrigues G. Determinación Del Efecto Antibacteriano In Vitro De La Rivina Humilis L. (Flor Blanca) Sobre El Crecimiento De Escherichia Coli, Staphylococcus Aureus Y Pseudomonas Aeruginosa. [Tesis para optar título de Químico Farmacéutico]. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2012.
13. Tortora G, Berdell R, Cristine L. Introducción a la Microbiología. 9^o ed. Buenos Aires; 2009.
14. Martinez A. Aislamiento De Proteínas (Globulinas, Albuminas Y Glutelinas) De Semillas De Brassica Rapa L. “Nabo Silvestre” Con Propiedades Antibacteriana Y Antifúngica [Tesis para optar el título de Biólogo]. Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín; 2010.
15. Murray k, Pfaller M. Microbiología Médica. 5ta edición. Madrid España: editorial El sevier; 2009. p. 86.
16. Negroni M. Microbiología estomatológica Fundamentos y guía práctica. 2da edición. Buenos Aires: Editorial Médica Panorámica; 2009. p. 561–571.
17. Pareja K. efecto Antibacteriano In Vitro Del Extracto De *Origanum Vulgare* y, Del Gluconato De Clorhexidina Al 0.12% En Cepas Certificadas De Streptococcus Mutans, UCSM, Arequipa [Tesis para optar el título de odontología]. Arequipa: Universidad Nacional de San Agustín; 2011.

18. Maita J, Guerra P. Actividad Antibacteriana In Vitro Del Extracto Etanólico De Las Hojas De Ruta Graveolens (Ruda), Mediante El Método De Macrodilución Frente A Staphylococcus Aureus Y Escherichia Coli. [Tesis para optar el título de Químico Farmaceutico]. Iquitos – Perú: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; 2015.
19. Cavalieri S, Harbeck R, McCarter Y, Rankin I. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana [Revista en línea]. 2005.
20. Rios N, Davila R. Actividad Antibacteriana IN VITRO de Geranium ayavacense sobre Escherichia coli, Enterococcus faecalis y Staphylococcus aureus, IMET-ESSALUD-2013. [Tesis para optar el título de Químico Farmaceutico]. Iquitos – Perú: Universidad Nacional de la Amazonia Peruana; 2014.
21. Deza J, Muñoz S. Metodología de la investigación científica. 1ra Edición. Perú: Editorial Universidad Alas Peruanas. 2008.

ANEXOS

Tabla N° 10: Resultados De Los Diámetros De Los Halos De Inhibición De La Actividad Antibacteriana Del Extracto Acuoso De Las Hojas De *Tarasa capitata* (Malva) Sobre Cepas ATCC 25922 De *Escherichia coli* Y ATCC 25923 De *Staphylococcus aureus* A La Concentración De 100mg

100 mg					
E. coli	S. aureus	control +	control +	control -	control -
23mm	27mm	25mm	25mm	0 mm	0 mm
21mm	28mm	25mm	25mm	0 mm	0 mm
22mm	28mm	25mm	25mm	0 mm	0 mm

Fuente: Elaboración Propia

Tabla N°11: Resultados De Los Diámetros de los Halos De Inhibición De la Actividad Antibacteriana Del Extracto Acuoso de las Hojas De *Tarasa capitata* (Malva) Sobre Cepas ATCC 25922 De *Escherichia coli* Y ATCC 25923 De *Staphylococcus aureus* a la Concentración De 50mg

50 mg					
E. coli	S. aureus	control +	control +	control -	control -
18mm	22mm	25mm	25mm	0 mm	0 mm
18mm	21mm	25mm	25mm	0 mm	0 mm
17mm	22mm	25mm	25mm	0 mm	0 mm

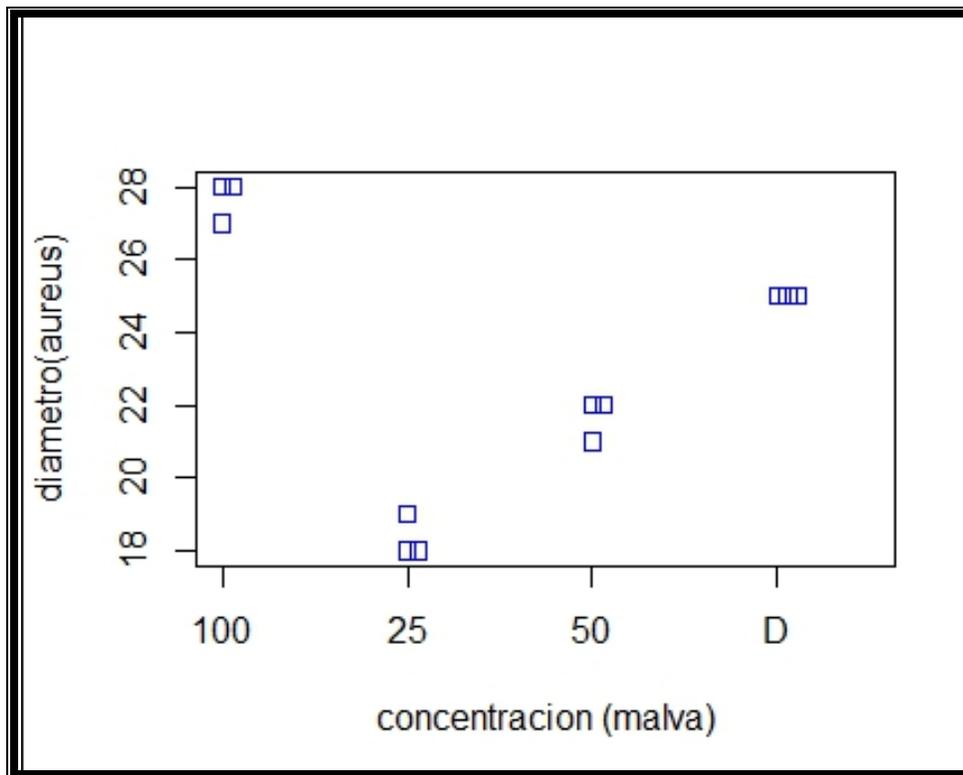
Fuente: Elaboración Propia

Tabla N° 12: Resultados De Los Diámetros de los Halos de Inhibición de la Actividad Antibacteriana Del Extracto Acuoso de las Hojas de *Tarasa capitata* (Malva) Sobre Cepas ATCC 25922 De *Escherichia coli* Y ATCC 25923 De *Staphylococcus aureus* a la Concentración De 25mg

25 mg					
E. coli	S. aureus	control +	control +	control -	control -
14mm	18mm	25mm	25mm	0 mm	0 mm
15mm	18mm	25mm	25mm	0 mm	0 mm
15mm	19mm	25mm	25mm	0 mm	0 mm

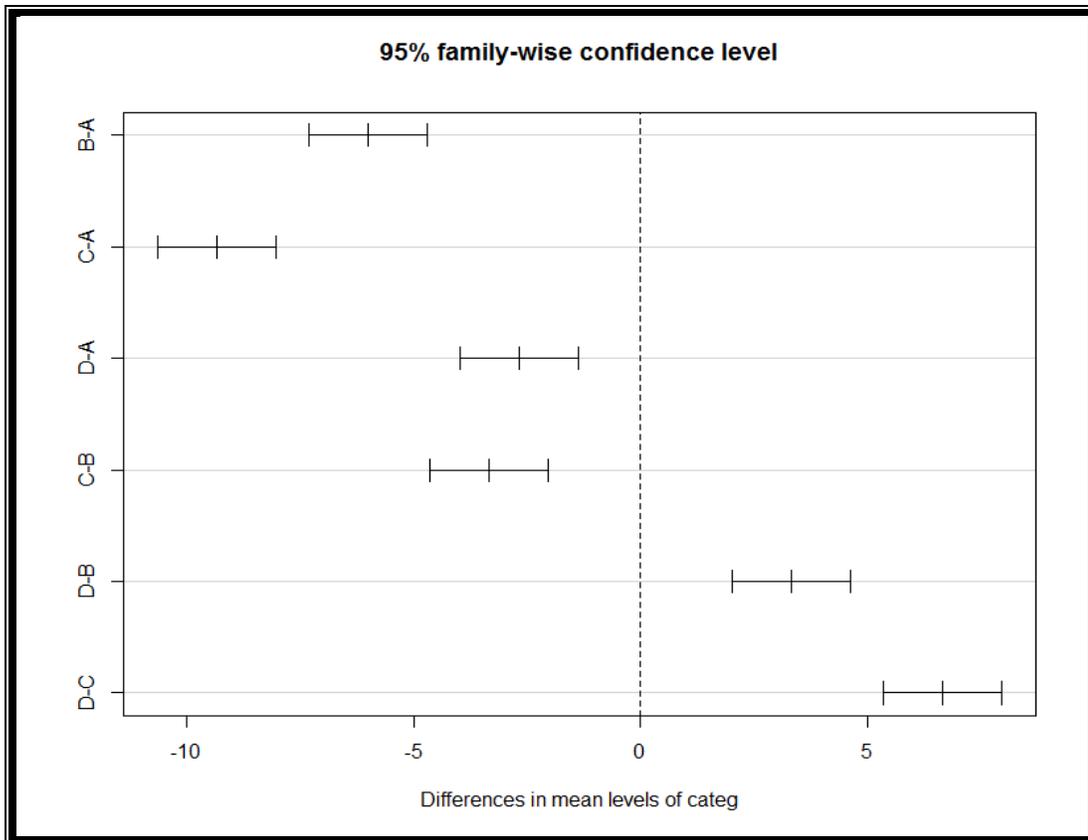
Fuente: Elaboración Propia

GRAFICO N°4: Interpretación de los Diámetros de los Halos de Inhibición Producido por el Extracto Acuoso Liofilizado de las Hojas de *Tarasa capitata* (Malva) a 100mg/ml, 50mg/ml y 25mg/ml sobre el Crecimiento de *Staphylococcus aureus* con el Control Positivo Mediante la Prueba del ANOVA



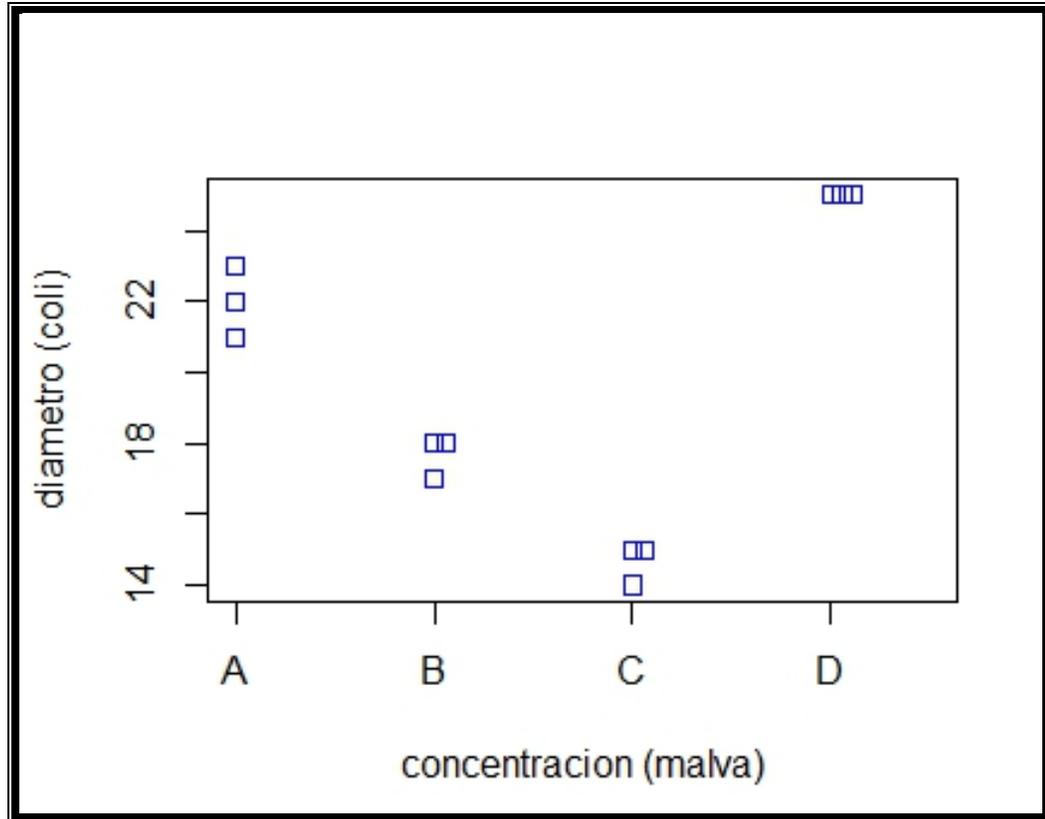
Fuente: Elaboración propia

GRAFICO N°5: Interpretación Mediante la Prueba de Tukey de *Staphylococcus aureus*



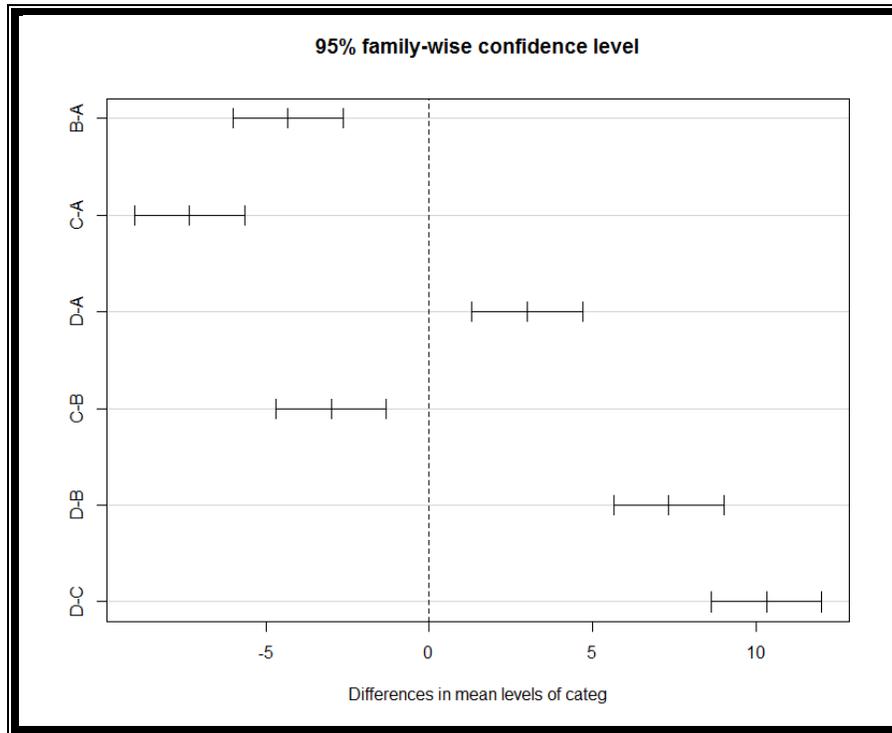
Fuente: Elaboración propia

GRAFICO N°6: Interpretación de los Diámetros de los Halos de Inhibición Producido por el Extracto Acuoso Liofilizado de las Hojas de *Tarasa capitata* (Malva) a 100mg/ml, 50mg/ml y 25mg/ml sobre el Crecimiento de *Escherichia coli* con el Control Positivo Mediante la Prueba del ANOVA



Fuente: Elaboración propia

GRAFICO N°7: Interpretación Mediante la Prueba de Tukey de *Escherichia coli*



Fuente: Elaboración propia

GRAFICO N° 8: *Tarasa capitata* “Malva”



FUENTE: http://plantgenera.org/illustration.php?id_illustration=197366

GRAFICO N° 9: Recolección de *Tarasa capitata* “Malva” en el Distrito de Chiguata



Fuente: Elaboración propia

GRAFICO N° 10: Secado de *Tarasa capitata* “Malva”



Fuente: Elaboración propia

GRAFICO N°11: Liofilizado de *Tarasa capitata* “Malva”



Fuente: Elaboración propia

GRAFICO N°12: Incubación de Placas



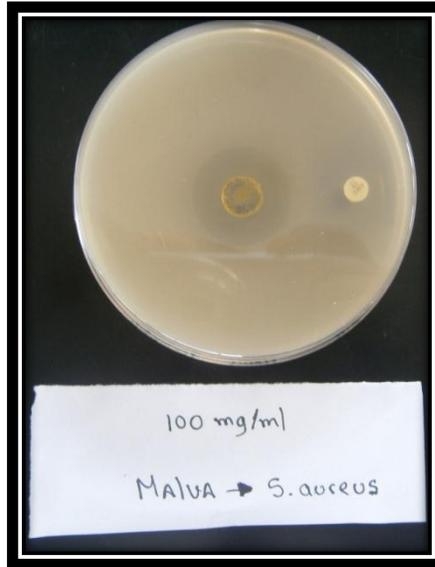
Fuente: Elaboración propia

GRAFICO N°13: Placa Control Negativo y Positivo para *Staphylococcus aureus*



Fuente: Elaboración propia

GRAFICO N°14: Placa a la Concentración de 100mg Sobre *Staphylococcus aureus*



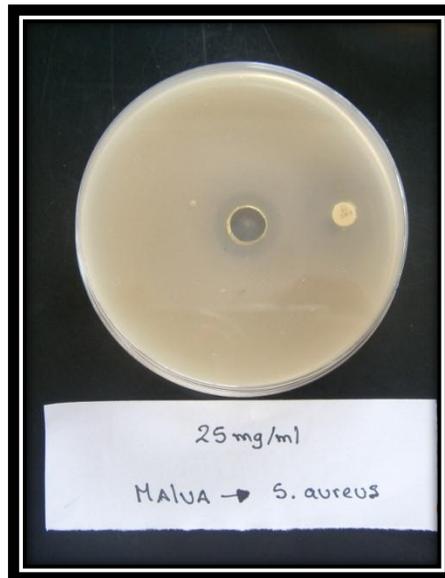
Fuente: Elaboración propia

GRAFICO N°15: Placa a la Concentración de 50mg de *Tarasa capitata* "Malva" Sobre *Staphylococcus aureus*



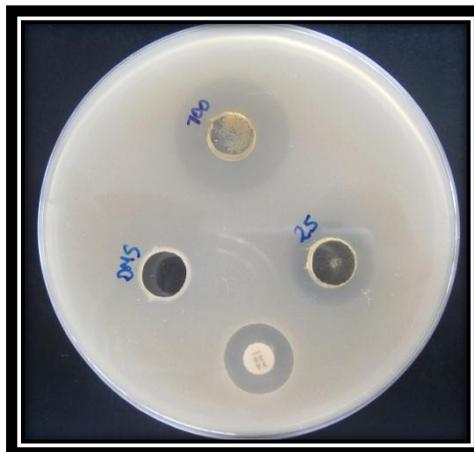
Fuente: Elaboración propia

GRAFICO N°16: Placa a la Concentración de 25mg de *Tarasa capitata* “Malva” Sobre *Staphylococcus aureus*



Fuente: Elaboración propia

GRAFICO N°17: Placa Control Negativo y Positivo para *Escherichia coli*



Fuente: Elaboración propia

GRAFICO N°18: Placa a la Concentración de 100mg de *Tarasa capitata* "Malva" Sobre *Escherichia coli*



Fuente: Elaboración propia

GRAFICO N°19: Placa a la Concentración de 50mg de *Tarasa capitata* "Malva" Sobre *Escherichia coli*



Fuente: Elaboración propia

**GRAFICO N°20: Placa a la Concentración de 25mg de *Tarasa capitata*
"Malva" Sobre *Escherichia coli***



Fuente: Elaboración propia