

UNIVERSIDAD SAN PEDRO
FACULTAD DE MEDICINA HUMANA
PROGRAMA DE FARMACIA Y BIOQUIMICA



***Justicia secunda* y su actividad antibacterial en cultivos *in vitro* de bacterias G⁺ y G⁻**

**Tesis para obtener el Título Profesional de
Químico Farmacéutico**

**Autora:
Br. Nole Atoche, Stefany Andreina**

**Asesor:
Q.F. Gonzales Ruiz, Walter**

**Código ORCID:
0000-0002-9347-4058**

**Piura – Perú
2021**

INDICE GENERAL

| CONTENIDO | PÁG. |
|---|------|
| ÍNDICE DE TABLAS | iii |
| ÍNDICE DE FIGURAS | v |
| 1. Palabras clave | vi |
| 2. Título | vii |
| 3. Resumen | viii |
| 4. Abstract..... | ix |
| 5. Introducción..... | 1 |
| 5.1. Antecedentes y fundamentación científica | 1 |
| 5.2. Justificación de la investigación | 11 |
| 5.3. Problema..... | 12 |
| 5.4. Conceptualización y operacionalización de las variables..... | 23 |
| 5.5. Hipótesis | 24 |
| 5.6. Objetivos..... | 24 |
| 6. Metodología..... | 25 |
| 6.3. Tipo y diseño de la investigación | 25 |
| 6.4. Población y muestra..... | 26 |
| 6.5. Técnicas e instrumentos de la investigación..... | 27 |
| 6.6. Procedimiento de la investigación | 28 |
| 6.7. Procesamiento y análisis de la información | 33 |
| 7. Resultados..... | 34 |
| 7.1. Determinación de la actividad antibacterial de las diluciones a diferentes concentraciones de las hojas de <i>Justicia secunda</i> y amoxicilina/ácido clavulánico, frente a cultivos “ <i>in vitro</i> ” de bacterias G ⁺ (<i>Staphylococcus aureus</i>) y bacterias G ⁻ (<i>Escherichia coli</i>). | 34 |

| | |
|--|----|
| 7.2. Identificación la dilución de <i>Justicia secunda</i> que tiene mayor actividad antibacterial, frente a cultivos “ <i>in vitro</i> ” de bacterias G ⁻ (<i>E. coli</i>) y bacterias G ⁺ (<i>S. aureus</i>). | 42 |
| 7.3. Identificación de la bacteria que presenta mayor inhibición de su crecimiento frente a la actividad antibacterial de las diferentes diluciones de las hojas de <i>Justicia secunda</i> | 43 |
| 7.4. Comparación de la actividad antibacterial de las diluciones de las hojas de <i>Justicia secunda</i> y Amoxicilina/Ácido Clavulánico, frente a cultivos “ <i>in vitro</i> ” de bacterias G ⁻ (<i>Escherichia coli</i>) y bacterias G ⁺ (<i>Staphylococcus aureus</i>). | 44 |
| 7.5. Contrastación de la hipótesis de la investigación | 44 |
| 8. Análisis y discusión | 49 |
| 8.3. Análisis | 49 |
| 8.4. Discusiones | 52 |
| 9. Conclusiones y recomendaciones | 55 |
| 9.1. Conclusiones..... | 55 |
| 9.2. Recomendaciones | 56 |
| 10. Agradecimiento | 57 |
| 11. Referencias bibliográficas | 58 |
| 12. Anexos y apéndices | 61 |
| 12.1. Anexos..... | 61 |
| 12.2. Apéndices | 78 |

ÍNDICE DE TABLAS

| TABLA | Pág. |
|--|------|
| Tabla 1: conceptualización y operacionalización de las variables..... | 23 |
| Tabla 2: Dilución hidrónica al 6.7 % (m/v) de hojas de <i>J. secunda</i> en <i>E. coli</i> | 34 |
| Tabla 3: Dilución etanólica al 6.7 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>E. coli</i> | 34 |
| Tabla 4: Dilución hidroetanólica al 6.7 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>E. coli</i> | 35 |
| Tabla 5: Dilución hidrónica al 6.7 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>S. aureus</i> | 35 |
| Tabla 6: Dilución etanólica al 6.7 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>S. aureus</i> | 36 |
| Tabla 7: Dilución hidroetanólica al 6.7 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>S. aureus</i> | 36 |
| Tabla 8: Estadística descriptiva de las actividad antibacterial de las diluciones a una concentración de 6.7 % (m/v) de hojas de <i>Justicia secunda</i> frente a cultivos <i>in vitro</i> de <i>E.coli</i> y <i>S. aureus</i> | 37 |
| Tabla 9: Dilución hidrónica al 13.3 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>E. coli</i> | 37 |
| Tabla 10: Dilución etanólica al 13.3 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>E. coli</i> | 38 |
| Tabla 11: Dilución hidroetanólica al 13.3 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>E. coli</i> | 38 |
| Tabla 12: Dilución hidrónica al 13.3 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>S. aureus</i> | 39 |
| Tabla 13: Dilución etanólica al 13.3 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>S. aureus</i> | 39 |
| Tabla 14: Dilución hidroetanólica al 13.3 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>S. aureus</i> | 39 |
| Tabla 15: Estadística descriptiva de la actividad antibacteriano de las diluciones a una concentración de 13.3 % (m/v) de hojas de <i>Justicia secunda</i> frente a cultivos <i>in vitro</i> de <i>E.coli</i> y <i>S. aureus</i> | 40 |
| Tabla 16: Amoxicilina + Ac. Clavulánico en <i>S. aureus</i> | 40 |
| Tabla 17: Amoxicilina + Ac. Clavulánico en <i>E. coli</i> | 41 |
| Tabla 18: Análisis estadístico descriptivo de la actividad antibacterial de Amoxicilina + Ac. Clavulánico frente a cultivos <i>in vitro</i> de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> | 41 |
| Tabla 19: Promedio de los diámetros de los halos de inhibición de las diferentes diluciones de hojas de <i>J. secunda</i> frente a <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> | 42 |
| Tabla 20: Sensibilidad de las bacterias <i>E. coli</i> y <i>S aureus</i> a la actividad antibacterial de las diferentes diluciones de las hojas de <i>J. secunda</i> | 43 |

| | |
|--|----|
| Tabla 21: Comparación de la actividad antibacterial de las diluciones de las hojas de <i>Justicia secunda</i> y Amoxicilina/Ácido Clavulánico | 44 |
| Tabla 22: Prueba de normalidad de Kolmogorov – Smirnov | 46 |
| Tabla 23: Análisis estadístico descriptivo de las medias de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición. | 47 |
| Tabla 24: Estadísticos de contraste Prueba de Kruskal Wallis | 48 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| FIGURA | Pág. |
|--|------|
| Figura 1: Distribución de los promedios de los diámetros de los tratamientos frente a cultivos <i>in vitro</i> de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> | 46 |

1. Palabras clave

| | |
|--------------|--|
| TEMA | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Actividad antibacterial. ➤ Diluciones. ➤ <i>Justicia secunda</i>. ➤ <i>Staphylococcus aureus</i>. ➤ <i>Escherichia coli</i>. |
| ESPECIALIDAD | FARMACIA Y BIOQUIMICA |

Keywords

| | |
|-----------|--|
| THEME | <ul style="list-style-type: none"> ➤ Antibacterial activity. ➤ Dilutions. ➤ <i>Justicia secunda</i>. ➤ <i>Staphylococcus aureus</i>. ➤ <i>Escherichia coli</i>. |
| SPECIALTY | PHARMACY AND BIOCHEMISTRY |

Línea de investigación

El presente estudio pertenece a la línea de investigación de “Productos naturales con propiedades medicinales y alimenticias” de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad San Pedro.

2. Título

“*Justicia secunda* y su actividad antibacterial en cultivos *in vitro* de bacterias G⁺ y G⁻”.

3. Resumen

El objetivo de la investigación fue evaluar la actividad antibacterial de diferentes diluciones de las hojas de *Justicia secunda*, frente a cultivos “*in vitro*” de bacterias G⁺ (*Staphylococcus aureus*) y bacterias G⁻ (*Escherichia coli*). La muestra representada por 42 placas Petri, de las cuales 21 estuvieron inoculadas con *Escherichia coli* y 21 con *Staphylococcus aureus*. La investigación fue de tipo analítico, prospectivo, con un diseño de investigación experimental, experimental puro, transversal. Las técnicas que se emplearon fueron la observación y la experimentación, con sus instrumentos, ficha técnica de observación de análisis bibliográfica, ficha técnica de análisis de laboratorio y fundamento estandarizado del método microbiológico antibiograma. Los datos obtenidos fueron procesados a través de tablas de frecuencia, figuras estadísticas y el análisis a través de la estadística descriptiva de tendencia central y de dispersión, y para la prueba de hipótesis, se hizo uso del estadístico Prueba de Kruskal Wallis para datos independientes no paramétricos. Analizados y discutidos los hallazgos obtenidos, permitieron concluir que con un $\alpha = 0.05$ y un p-Valor de 0.000, existe diferencias significativas entre los halos de inhibición de las diferentes diluciones de las hojas de *J. secunda* a concentraciones de 6.7 % y 13.3 % y a la Amoxicilina + Ac. Clavulánico, en cultivos “*in vitro*” de *S. aureus* y *E. coli*. Demostrando que las diferentes diluciones de hojas de *J. secunda*, tienen actividad antibacterial frente a cultivos “*in vitro*” de bacterias G⁺ (*S. aureus*) y G⁻ (*E. coli*). Piura, 2021.

Palabras Clave: Actividad antibacterial, Diluciones, *Justicia secunda*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

4. Abstract

The objective of the research was to determine the antibacterial activity of different dilutions of *Justicia secunda* leaves, against “*in vitro*” cultures of G⁺ bacteria (*Staphylococcus aureus*) and G⁻ bacteria (*Escherichia coli*). The sample represented by 42 Petri dishes, of which 21 were inoculated with *Escherichia coli* and 21 with *Staphylococcus aureus*. The research was analytical, prospective, with an experimental, pure experimental, cross-sectional research design. The techniques used were observation and experimentation, with their instruments, bibliographic analysis observation data sheet, laboratory analysis technical sheet and standardized basis for the microbiological antibiogram method. The data obtained were processed through frequency tables, statistical figures and the analysis through the descriptive statistics of central tendency and dispersion, and for the hypothesis test, the Kruskal Wallis test statistic was used for independent non-parametric data. After analyzing and discussing the findings obtained, they allowed to conclude that with a $\alpha = 0.05$ and a p-Value of 0.000, there are significant differences between the inhibition halos of the different dilutions of the *J. secunda* leaves at concentrations of 6.7% and 13.3% and to Amoxicillin + Ac. Clavulanic, in “*in vitro*” cultures of *S. aureus* and *E. coli*. Demonstrating that the different dilutions of *J. secunda* leaves have antibacterial activity against “*in vitro*” cultures of G⁺ (*S. aureus*) and G⁻ (*E. coli*) bacteria. Piura, 2021.

Key Words: Antibacterial activity, Dilutions, *Justicia secunda*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*.

5. Introducción

5.1. Antecedentes y fundamentación científica

5.1.1. Antecedentes

Herrera, et al. (2008) señalan que la actividad biológica del cribado de extractos y fracciones de *Justicia secunda* Vahl, contra bacterias Gram⁺ y Gram⁻ de Enterobacteriaceae. Los autores señalan que se prepararon extracto de etanol de las partes aéreas de la planta, que luego fueron repartidos secuencialmente con N-hexano (FHX), cloroformo (FCH), y una solución acuosa (FOH). Todas las fracciones mostraron actividad bactericida frente a bacterias Gram positivas, *Bacillus cereus* (ATCC 9634) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), mientras que estaban inactivos contra cepas Gram negativas, *Escherichia coli* (ATCC 0389), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Proteus vulgaris* (ATCC 9920) y *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028).

Zambrano y Bustamante (2017) realizaron un estudio con el fin de caracterizar el fármaco crudo en extractos de *J. secunda* para determinar los metabolitos con función medicinal y para luego ver la posibilidad en la producción de fármacos. Los hallazgos reportan contenido de cenizas totales y humedad residual en la droga cruda, valores que se encuentran dentro de los límites establecidos por la USP 37 para artículos de origen botánico. También se reporta alcaloides, cumarinas y glucósidos fenólicos presentes en el extracto hidroalcohólico; taninos, glucósidos fenólicos y triterpenos y/o esteroides en el extracto alcohólico; y alcaloides y triterpenos y / o esteroides en el extracto etérico. Ante estos resultados, los investigadores concluyen que las hojas de *J. secunda* presentan una gran variedad de componentes químicos le otorga propiedades medicinales así como antiséptico, antiinflamatorio y antioxidante, entre otros.

Kitadi, et al (2019) realizaron un estudio de revisión, con el propósito de proporcionar conocimientos sobre sus propiedades Farmacológicas y Fitoquímica de diferentes especies de Justicia incluyendo a *J. secunda*, información obtenida de diferentes base de datos electrónicas (Science Direct, PubMed Central, PubMed y académico de Google). Los hallazgos registrados permiten señalar que dichas plantas son comúnmente utilizadas para tratar patologías respiratorias y gastrointestinales; además de inflamación. También son utilizadas en el tratamiento del sistema nervioso central, como alucinógenos, somníferos agentes, sedantes, depresores y tratamientos para la epilepsia y otros desórdenes mentales. Otras especies se utilizan tradicionalmente para tratar dolor de cabeza y fiebre, sedantes, analgésicas, cáncer, diabetes y VIH. Se informa que esas plantas poseen diversas propiedades como la actividad antitumoral contra diferentes líneas de células cancerosas, actividad anticancerígena contra la leucemia linfocítica P388 en ratones, actividad inhibidora *in vivo* contra la leucemia linfocítica P-388 crecimiento y citotoxicidad *in vitro* en el 9-KB (carcinoma nasofaríngeo humano) una línea celular (*Justicia spicigera*), antioxidante, antibacteriano, antifúngico, antiangiogénico, antihelmíntico y actividades hepatoprotectoras, línea celular de cáncer de ovario humano (*Justicia rhodoptera*), así como la prevención del crecimiento de algunas células tumorales (*Justicia patentiflora*), bronquitis, artritis, secreciones vaginales, dispepsia y enfermedad ocular. Estas propiedades se deben a la presencia de numerosos fitoquímicos naturales como fenoles, flavonoides, alcaloides, taninos, glucósidos, saponinas, cumarinas, y terpenos. Los estudios Fitoquímicos en hojas de *J. gendarussa* revelaron la presencia de flavonoides, alcaloides, triterpenos, aminoácidos aromáticos, aminas, estigmasterol, lupeol y esteroides.

Onochie, et al (2020) realizaron un estudio con el propósito de evaluar los efectos bioquímicos del extracto etanólico de hojas de *J. secunda* en ratas Wistar. El extracto etanólico de hojas de *J. secunda* se preparó utilizando

métodos estandarizados. Luego, se realizaron análisis proximal y fitoquímicos de los extractos utilizando varios métodos previamente informados en la literatura. Los estudios bioquímicos, fueron también llevados a cabo de acuerdo a la literatura científica disponible. Los resultados señalan que el extracto de hojas etanólicas, contiene cantidades apreciables de fitonutrientes, micronutrientes y constituyentes fitoquímicos. Se determinó que la DL50 del extracto era de 3800 mg/kg de peso corporal. Hubo una elevación en la sangre dependiente de la dosis azúcar en comparación con el control. No presenta un aumento significativo de la bilirrubina y niveles de enzimas hepáticas. El extracto tiene un efecto significativo en el perfil de lípidos (valor de $p < 0,0001$), la tasa de filtración glomerular (aumento de los niveles de creatinina y urea en sangre (valor de $p < 0,0001$), los electrolitos séricos y el peso de los animales. Hubo una disminución significativa en la brecha aniónica (valor de $p < 0,01$).

Oluwatimilehin, et al. (2020) realizaron una investigación con el fin de evaluar la micromorfología foliar, fitoquímica y composición mineral de las hojas de *Justicia secunda*. Señalan que es una planta de uso medicinal perteneciente a la familia Acanthaceae, es tradicionalmente usada para tratar y manejar una varias dolencias. Los autores estudiaron la selección/análisis de fitoquímicos, minerales y características micro-morfológicas de las hojas de *J. secunda*, dicho análisis se evaluó mediante procedimientos estándar. Los datos generados para el contenido fitomineral y fitoquímico de las hojas, así como la prueba quimio-microscópica y los rasgos anatómicos foliares de las hojas, revelaron rasgos característicos distintos que permitieron su sistemática, adecuada identificación, autenticación y estandarización de esta planta para fines medicinales.

Abiodun, Oluwabusola y Abimbola (2020), evaluarón los componentes fitoquímicos y la actividad antibacteriana de extractos de hojas de *Justicia secunda*, frente a cinco patógenos clínicos. El análisis fitoquímico se realizó

utilizando métodos estándar, mientras que el efecto antibacteriana de los extractos contra los patógenos clínicos, se determinó utilizando la técnica de pocillo de agar método de difusión. Los resultados del estudio, señalan que saponinas, taninos, flavonoides, glucósidos cardíacos, terpenoides, esteroides, antraquinonas y todos los alcaloides estaban presentes en el metanol, etanol y extractos acuosos, mientras que los glucósidos cardíacos y los alcaloides estaban ausentes en el extracto acuoso. Todos los extractos tenían actividad antibacteriana contra las bacterias de prueba a 150 mg/ml, con la excepción de los extractos acuosos y metanólicos que no tenían actividad contra *E. coli*. La CIM del extracto acuoso tanto para *B. cereus* como para *L. monocytogenes* fue de 37,5 mg/ml, 150 mg/ml para *S. aureus*, 18,75 mg/ml para *P. aeruginosa*, sin actividad contra *E. coli*. El extracto de metanol tenía una concentración inhibitoria mínima (CMI) de 18,75 mg/ml en todas las bacterias analizadas, con la excepción de *E. coli* sin actividad, mientras que la CMI del extracto de etanol en *P. aeruginosa* fue de 75 mg/ml y 18,75 mg/ml para las otras bacterias. *J. secunda* podría ser prometedor en el diseño futuro de fármacos antibacterianos debido a sus propiedades antibacterianas como se observa en este estudio.

Romanus, et al. (2020) publicaron su investigación donde el objetivo fue evaluar los parámetros farmacognósticos de *Justicia secunda* con microscopía, micromerítica, quimiomicroscopía, fluorescencia, valores extractivos, contenido de humedad y valores de cenizas. Para el estudio se recogieron las hojas y los tallos, identificado, secado al aire, pesado y sometido a los parámetros de evaluación utilizando procedimientos estándar. En microscopía, la hoja fresca, el tallo y sus polvos fueron sometidos a limpieza, tinción y examen al microscopio. Las propiedades micromeríticas fue determinado utilizando hojas y tallos en polvo. Para quimiomicroscopía, sus polvos fueron tratados con diferentes productos químicos/reactivos y vistos al microscopio. Para la fluorescencia los polvos fueron macerados en diferentes solventes y sus extractos fueron vistos a la luz, determinando la longitud de onda más baja y

más alta de las luces ultravioleta. Para valores extractivos en frío, se utilizaron como disolventes maceración con etanol, metanol y agua destilada. El contenido de humedad se determinó utilizando el método de pérdida en seco, donde los crisoles y su contenido se pesó y se calentó en un horno a 105 °C hasta que se secó por completo, luego se determinaron los contenidos de humedad y se calcularon sus porcentajes. Estos crisoles fueron transferidos al horno y se calentó a 450 °C durante 8 horas y obteniendo los valores totales de cenizas. Los resultados obtenidos por microscopía, señalan que la hoja tiene estomas anficistomáticos, tricomas de cobertura multicelular en la superficie adaxial y ninguno en superficie abaxial. El patrón de la pared celular epidérmica se ondulaba tanto en el adaxial como en las superficies abaxiales. El índice estomático fue del 33,30 % en la superficie abaxial y del 2,53 % en la superficie adaxial. El análisis micromerítico de los polvos de hojas y tallos revela un buen flujo y regular flujo respectivamente. Los resultados de la quimiomicroscopía de hojas y tallos revelaron la existencia de mucílago, cristales de oxalato de calcio y aceite, excepto lignina en el tallo y almidón en la hoja. Para valores de extracción soluble en agua los resultados de hoja y tallo fueron 26,00 % p/p y, 12,00 % p/w, valor de extracción soluble en metanol 12,00 % w/p y 4,50% w/w, valor extractivo soluble en etanol 14,3 % w/p y 4,80 % w/w, contenido de humedad 9 % w/p y, 9 % w/w, los valores de cenizas totales fueron 16 % w/w y 7 % w/w, valores de cenizas insolubles en ácido 2 % w/p y, 1% p/p, valores de cenizas solubles en agua 4 % p/w y, 4% w/p, valores de cenizas sulfatadas 21,50 % p/p y, 7 % p/w respectivamente. En conclusión, los resultados obtenidos de los estudios farmacognósticos proporcionarán información sobre la identidad calidad y pureza de *Justicia secunda*.

5.1.2. Fundamentación científica

5.1.2.1. *Justicia secunda*

Para Domínguez (2020), en su trabajo de investigación de revisión, señala que:

- Nombre científico: *Justicia secunda*.
- Nombre común: Sanguinaria, Singamochila, Yerba de la sangre, Arnica, Sangre de cristo, Cascajera.

Justicia secunda es una planta perteneciente al género *Justicia* y a la familia *Acanthaceae*. Su crecimiento se da en América Central y el Norte del Sur de América, destacando: Barbados, Trinidad, Panamá, Islas Vírgenes, Venezuela, Colombia. Se desarrollan en diversos ambientes, tanto húmedos como secos.

5.1.2.1.1. Descripción taxonómica

Según el Herbario GUAY (2015) de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Estatal de Guayaquil, *Justicia secunda* es una hierba de 0,5 – 1 m de alto; los tallos son erectos, subcilíndricos cuadrangulares y superficialmente surcados en sentido longitudinal, glabros. Sus hojas son simples y opuestas; las láminas son lanceoladas, foliáceas a subcartáceas, el ápice es acuminado, con margen entero y glabro en ambos lados. Los peciolos se pueden encontrar de 1 a 3 mm; sus brácteas florales son lineal - filiformes; el cáliz está formado por 5 sépalos valvados, mayormente libres, divergentes y pilosos; la corola es subtubular y bilabiada de color púrpura suave, contiene 2 estambres, 1 filamento y su fruto es una capsula.

5.1.2.1.2. Uso tradicional

Domínguez (2020) señala que esta planta es comúnmente utilizada para prevención de cálculos renales. Además es usada, por su efecto antipirético así como por su acción hipoglucemiante. El autor cita a diferentes investigadores, quienes señalan que existen diferentes usos de esta planta: antiinflamatorio, analgésico en dolores de oído y garganta, antimicrobiano (Herrera, et al., 2002; Rojas, et al. 2006), estabilizador de la tensión arterial, tratamiento de algunos tipos de anemia (Chifundera, 2001; Moswa, et al. 2005; Tossou, et al. 2008; N'guessan, et al. 2010), anti anémico (Escobaría y Patiño, 2015) y problemas de fertilidad (Lans, 2007).

De esta planta, son las hojas las más utilizadas, con las cuales se prepara infusiones y decocciones para uso oral. Sin embargo, se puede usar en heridas de personas diabéticas como cataplasma, por su efecto antimicrobiano.

5.1.2.1.3. Composición

Los extractos de las hojas de *Justicia secunda*, contienen diferentes compuesto como alcaloides, polifenoles (flavonoides, taninos, leuco-antocianinas, quinonas, antocianinas), terpenos y glucósidos fenólicos.

Principios activos aislados de las hojas:

1. Triterpenos. Benavides, et al. (2018) aislaron lupeol. Saleem (2009) señala que este metabolito tiene efectos terapéuticos: antiinflamatoria, hipoglucemiante, anticancerosa.
2. Flavonoides (Luteolina), son usados en el tratamiento de la hipertensión, enfermedades inflamatorias, cáncer y como antioxidante, así lo señala Domínguez (2020).

3. Fitoesteroles. Benavides, et al. (2018) aislaron estigmasterol y β -sitosterol. Gupta, et al. (1980. Citado por Domínguez, 2020) determinaron que β -sitosterol tiene efecto antiinflamatoria y antipirética, ayudando con la eliminación natural del colesterol.

5.1.2.1.4. Actividades farmacológicas

- 1) Antihipertensiva e hipotensora (Dominguez, 2020).
- 2) Antioxidante (Onoja, et al (2017).
- 3) Antimicrobiana (Rojas, et al. 2006. Citado por Dominguez, 2020).
- 4) Normoglucemiante (Escobar y Flores, 2019).
- 5) Estabilidad de la membrana de los eritrocitos falciformes (Mpiana, et al. 2010. Citados por Domínguez, 2020).
- 6) Antiinflamatoria (Onoja, et al. 2017).
- 7) Antinociceptiva (Onoja, et al. 2017).
- 8) Antianémica (Tossou, et al. 2006. Citados por Domínguez, 2020).
- 9) Antifúngica (Chacón, 2014).

5.1.2.2. Bacterias

5.1.2.2.1. *Escherichia coli*

Escherichia coli, es de forma bacilar, G⁻, aerobio y móvil, se asocia a enfermedades gastroenteritis, infecciones urinarias, meningitis (poco frecuente) e infecciones nosocomiales. (Murray, Rosenthal, y Pfaller, 2014). Se desarrollan en su mayoría, en el intestino grueso; *Escherichia coli* Enteropatógeno, es causante de diarreas; constituyendo de importancia sanitaria, y más aún, si es resistente a antibacterial. Asimismo, la OMS (2018) considera a *Escherichia coli*, como una de las bacterias que presenta resistencia bacteriana.

5.1.2.2.2. *Staphylococcus aureus*

Según Winn, et al. (2008) *Staphylococcus aureus*, tiene forma de coco, G⁺ de diámetro aproximado de 0.5 a 1.5 µm, se agrupan en forma de racimo. Vienen a ser inmóviles, sin esporas, no producen cápsula (aunque algunas cepas sí) y anaerobias facultativas. Es común que produzcan catalasa. Su desarrollo se da en la mucosa nasal del hospedador, causando infecciones a nivel comunitario y hospitalario, que afectan la piel, tejidos blandos y tracto respiratorio bajo, a la vez puede contaminar catéter venoso central, neumonía por ventilación mecánica, osteomielitis, endocarditis. Además de síndromes como: choque tóxico, piel escaldada.

Existen cepas de *S. aureus* resistentes a la metilicina, y se transmite entre pacientes a través de las manos del personal sanitario, desde un paciente colonizado a través de sus objetos contaminados. En algunos trabajos de investigación mencionan que el porcentaje de resistencia a la metilicina por *S. aureus* aislado de pacientes hospitalizados va del 28 al 40%. (Ausina y Moreno, 2006; Brooks, Carroll, Butel, Morse, y Mietzner, 2011)

5.1.2.3. Técnica de antibiograma

Picazo (2000) afirman que el conocer la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos, preocupación importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Para ello hacen uso de las pruebas de sensibilidad o antibiograma, teniendo como propósito el de evaluar la respuesta de un microorganismo frente a uno o varios antimicrobianos. La técnica antibiograma evalúa la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado inhibiendo su crecimiento. Los resultado de la técnica, permiten la elección del antimicrobiano para el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Asimismo, expone un conjunto, elementos objetivos de actuación en los tratamientos empíricos.

5.1.2.3.1. Método del antibiograma disco - placa

Bauer, Kirby y colaboradores desarrollaron la técnica antibiograma disco-placa para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. Esta técnica consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de Petri (previamente inoculada con el microorganismo) discos de papel secante impregnados con el antibiótico. El disco impregnado se pone en contacto con agar, absorbe agua, lo que le permite al antibiótico difundirse al agar, este se difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Al transcurrir 18-24 horas de incubación, se genera una zona de inhibición, alrededor de los discos. La concentración de antibiótico en la interfase entre bacterias en crecimiento y bacterias inhibidas se conoce como concentración crítica y se aproxima a la concentración mínima inhibitoria (CMI) obtenida por métodos de dilución. La lectura de los halos de inhibición debe interpretarse como sensible (S), intermedia (I) o resistente (R) según las categorías establecidas por el NCCLS.

5.1.2.3.2. Indicaciones y limitaciones

El antibiograma es utilizado cuando se selecciona a la bacteria responsable de una infección y no está determinada su sensibilidad. El método de disco-placa es fácil aplicación. Es una técnica usada para diferentes bacterias, fundamentalmente bacterias aerobias no exigentes de crecimiento rápido.

5.1.2.3.3. Materiales

1. Tubos con suero fisiológico.
2. Escobillones estériles.

3. Medio de cultivo. Generalmente se utiliza agar Mueller-Hinton, porque permite el crecimiento de gran parte de bacterias patógenas.
4. Discos de antibióticos.

5.1.2.3.4. Lectura de los resultados

Pasado las 18 horas de incubación, se toma lectura de diámetro del halo de inhibición con un pie de rey o regla milimetrada. Si el microorganismo es un Estafilococo o un Enterococo debemos esperar 24 horas para asegurar la sensibilidad a la oxacilina y vancomicina.

5.1.2.3.5. Resultados e interpretación

Interpretando los datos de los diámetros de los halos de inhibición se puede establecer tres categorías: sensible (S), intermedia (I) y resistentes (R). Anteriormente se consideraba la categoría moderadamente sensible (MS) la cual se ha situado en la categoría de intermedia. Por regla general, se considera a un diámetro de inhibición de 30 a 35 mm como cepa altamente sensible, mientras que diámetros inferiores a 15 mm presentan a cepas resistentes.

5.2. Justificación de la investigación

La investigación tiene una justificación científica, porque al culminar del estudio, se podrá dar un aporte de conocimiento científico sobre el efecto antibacterial de las diluciones de las hojas de *Justicia secunda*, conocimiento que aumentará la data científica y estos sirvan como base para la producción de fármacos antibacteriales.

Tiene una justificación social, porque al tener resultados de la actividad antibacterial de las diluciones de las hojas de *Justicia secunda*, se podrá

recomendar hacer uso de esta planta frente a infecciones provocados por *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Así mismo, se justifica metodológicamente, porque sus técnicas, pueden ser usadas en investigaciones futuras, que tienen relevancia con las variables estudiadas en el presente estudio.

Por último, tiene una justificación práctica, porque al obtener resultados con actividad antibacterial, los procedimientos y/o técnicas, pueden ser empleadas, frente a otros microorganismos que causen enfermedades a la población piurana, con el propósito de saber si tiene o no actividad antibacterial.

5.3. Problema

¿Las diferentes diluciones de *Justicia secunda*, tienen actividad antibacterial, frente a cultivos “*in vitro*” de bacterias G⁺ (*Staphylococcus aureus*) y bacterias G⁻ (*Escherichia coli*), Piura – 2021?

5.4. Conceptualización y operacionalización de las variables

Tabla 1: conceptualización y operacionalización de las variables

| Variable | Conceptualización | Operacionalización | Dimensión | Indicador |
|---|--|--|-----------------------------------|--|
| Variable Independiente: Diluciones de <i>Justicia secunda</i> | Ayole, et al. (2020), señalan que los componentes fitoquímicos y la actividad antibacteriana de los extractos de hojas de <i>Justicia secunda</i> desarrollan dicha actividad frente a patógenos clínicos. | La variable se operacionalizó, a través de las diluciones de las hojas de <i>Justicia secunda</i> cultivadas del invernadero “Línea Verde” de la Universidad Nacional de Frontera. Las hojas se recolectaron por la tarde, para luego lavarlas y ponerlos a desecar a una temperatura de 35 °C por un tiempo de 72 horas, esto fue realizado en el equipo de deshidratación. Las hojas deshidratadas fueron trituradas haciendo uso del mortero. Luego se realizaron las diluciones respectivas. | Dilución hidrónica | <ul style="list-style-type: none"> • Concentración 1: 6.7% m/v • Concentración 2: 13.3% (m/v) |
| | | | Dilución etanólica (96%) | <ul style="list-style-type: none"> • Concentración 1: 6.7% m/v • Concentración 2: 13.3% m/v |
| | | | Dilución hidroetanólica | <ul style="list-style-type: none"> • Concentración 1: 6.7% (m/v). • Concentración 2: 13.3% (m/v) |
| Variable Dependiente: Actividad Antibacterial. | Para Sacsquispe y Velásquez, (2002. Citado por Sosa. 2015), viene hacer “la capacidad de matar o destruir o inactivar bacterias, impedir su proliferación y/o impedir su acción patógena”. | Hechas las diluciones respectivas, en ellas se introducen los discos de inhibición de papel filtro con un diámetro de 6 mm, por un tiempo de 5 minutos, para luego dejar que se sequen por un tiempo de 10 minutos. Cuando los discos se secaron, fueron colocados en las placas Petri, con contenido del medio de cultivo correspondiente (Mueller Hinton y Sal Manitol) y la inoculación de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> . | Formación del halo de inhibición. | <ul style="list-style-type: none"> • Con actividad antibacterial. • Sin actividad antibacterial. |

5.5. Hipótesis

Las diferentes diluciones de *Justicia secunda*, tienen actividad antibacterial, frente a cultivos “*in vitro*” de bacterias G⁺ (*Staphylococcus aureus*), y bacterias G⁻ (*Escherichia coli*), Piura – 2021.

5.6. Objetivos

5.6.1. Objetivo general

Determinar la actividad antibacterial a diferentes diluciones de las hojas de *Justicia secunda*, frente a cultivos “*in vitro*” de bacterias G⁺ (*Staphylococcus aureus*) y bacterias G⁻ (*Escherichia coli*), Piura – 2021.

5.6.2. Objetivos específicos

- 1) Determinar la actividad antibacterial de las diluciones a diferentes concentraciones de las hojas de *Justicia secunda* y amoxicilina/ácido clavulánico, frente a cultivos “*in vitro*” de bacterias G⁺ (*Staphylococcus aureus*) y bacterias G⁻ (*Escherichia coli*).
- 2) Identificar la dilución de *justicia secunda* que tiene mayor actividad antibacterial, frente a cultivos “*in vitro*” de bacterias G⁺ (*Staphylococcus aureus*) y bacterias G⁻ (*Escherichia coli*).
- 3) Identificar la bacteria que presenta mayor sensibilidad a la actividad antibacterial de las diferentes diluciones de las hojas de *Justicia secunda*.
- 4) Comparar la actividad antibacterial de las diluciones de las hojas de *Justicia secunda* y amoxicilina/ácido clavulánico, frente a cultivos “*in vitro*” de bacterias G⁺ (*Staphylococcus aureus*) y bacterias G⁻ (*Escherichia coli*).

6. Metodología

6.3. Tipo y diseño de la investigación

6.3.1. Tipo

El presente estudio es de tipo Analítico, Prospectivo.

Analítico, porque el estudio presenta dos variables; una independiente (diluciones de las hojas de *Justicia secunda*) y la otra, variable dependiente (actividad antibacterial).

Prospectivos, porque la investigadora, diseñó una ficha técnica de observación de laboratorio (Ver anexo A y B) para el recojo de los datos de las variables estudiadas.

6.3.2. Diseño

El estudio tiene un diseño experimental, experimental puro.

Experimental, porque la investigadora manipuló la variable independiente, observando el efecto que tiene en la variable dependiente.

Experimental puro, porque la investigadora controló todos los factores que se presenten en el proceso experimental.

El diseño está representado por:

| | | |
|-----|----------------|----------------|
| | X ₁ | O ₁ |
| | X ₂ | O ₂ |
| NRG | X ₃ | O ₃ |
| | X ₄ | O ₄ |

Dónde:

- ✓ NR: Muestra no probabilística, intencional.
- ✓ G: Grupo de estudio.
- ✓ X₁: Dilución hidrólica de las hojas de *Justicia secunda*, en concentraciones 6,7 % y 13.3 % (m/v).
- ✓ X₂: Dilución etanólica de las hojas de *Justicia secunda*, en concentraciones 6,7 % y 13.3 % (m/v).
- ✓ X₃: Dilución hidroetanólica de las hojas Aceite esencial de *Justicia secunda*, en concentraciones 6,7 % y 13.3 % (m/v).
- ✓ X₄: Fármaco antimicrobiano comercial (Amoxicilina * Ácido clavulánico 250 + 62.5 mg/5ml).
- ✓ O₁₋₄: Observaciones al diámetro del halo de inhibición.

6.4. Población y muestra

6.4.1. Población

La población de estudio fue representada por las cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* adquiridas del laboratorio “Microbiologics” de EE.UU. (Ver apéndice B).

6.4.2. Muestra

La muestra fue no probabilística (no randomizado), donde la investigadora la eligió a criterio y conveniencia propia. La muestra estuvo representada por 42 placas Petri, de las cuales 21 contienen el medio de cultivo Sal Manitol inoculadas con *Staphylococcus aureus* (G⁺) y 21 conteniendo el medio de cultivo Mueller Hinton inoculadas con *Escherichia coli* (G⁻).

6.5. Técnicas e instrumentos de la investigación

6.5.1. Técnicas

- La Observación, a través de ella, el investigador, obtuvo en primer lugar, toda la información necesaria y relevante de la literatura científica disponible y, en segundo lugar, se realizó la observación del comportamiento de los cultivos *in vitro* de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* frente al tratamiento con las diluciones de las hojas de *Justicia secunda* y el fármaco antibacterial.
- La Experimentación: se utilizó el método microbiológico antibiograma.

6.5.2. Instrumentos

Los instrumentos que se utilizaron, para el recojo de la información fueron:

- Ficha técnica de observación de análisis bibliográfica.
- Ficha técnica de análisis de laboratorio.
- Fundamento estandarizado del método microbiológico antibiograma.

6.6. Procedimiento de la investigación

6.6.1. Recolección de las hojas de *justicia secunda*

Las hojas de *Justicia secunda* se recolectaron por la tarde, del invernadero “Línea verde” de la Universidad Nacional de Frontera.

6.6.2. Secado y molienda

Se secaron las hojas de *Justicia secunda* recolectadas, en un desecador a 35 °C por 72 horas. Para la molienda se trituraron las hojas de *Justicia secunda* desecadas en un mortero de porcelana.

6.6.3. Preparación de las diluciones

Se prepararon 3 tipos de diluciones a dos concentraciones:

1. Primera concentración: al 6.7 % (m/v).
 - a) Dilución hidrónica:
 - Se pesó 1 g de las hojas de *Justicia secunda* ya trituradas.
 - Se colocó en un recipiente con tapa hermética.
 - Se agregaron 14 ml de agua estéril.
 - b) Dilución etanólica:
 - Se pesó 1 g de las hojas de *Justicia secunda* ya trituradas.
 - Se colocó en un recipiente con tapa hermética.
 - Se agregaron 14 ml de etanol al 96%.
 - c) Dilución hidroetanólica
 - Se pesó 1 g de las hojas de *Justicia secunda* ya trituradas.
 - Se colocó en un recipiente con tapa hermética.
 - Se agregaron 7 ml de agua estéril y 7 ml etanol al 96%.

2. Segunda concentración al 13.3 % (m/v)

a) Dilución hidrólica:

- Se pesó 2 g de las hojas de *Justicia secunda* ya trituradas.
- Se colocó en un recipiente con tapa hermética.
- Se agregaron 13 ml de agua estéril.

b) Dilución etanólica:

- Se pesó 2 g de las hojas de *Justicia secunda* ya trituradas.
- Se colocó en un recipiente con tapa hermética.
- Se agregaron 13 ml de etanol al 96%.

c) Dilución hidroetanólica:

- Se pesó 2 g de las hojas de *Justicia secunda* ya trituradas.
- Se colocó en un recipiente con tapa hermética.
- Se agregaron 6.5 ml de agua estéril y 6.5 ml etanol al 96 %.

6.6.4. Activación de los viales de *E. coli* y *S. aureus*

Para la activación se realizaron los siguientes pasos.

- Se preparó 200 ml del medio de cultivo (caldo nutritivo), aplicando la siguiente regla:

$$13 \rightarrow 1000 \text{ ml}$$

$$X \rightarrow 200 \text{ ml}$$

$$X = 2.6 \text{ g}$$

- Se pesó 2.6 g del medio de cultivo.
- Se midió 200 ml de agua estéril en la probeta.
- luego se vertió el medio de cultivo ya pesado en un matraz de 500 ml, seguido del agua estéril y se mezcló totalmente.
- Se completó la dilución en un mechero de Bunsen (aprox. 80 - 90 °C)
- Se midió 100 ml de caldo nutritivo para cada bacteria y se colocó en un matraz de 250 ml.

- Se llevó a la autoclave para su respectiva esterilización 121 °C a 15 Libras de presión por tiempo de 15 a 20 min.
- Se enfrió a baño maría a 45 °C.
- Se agregó las bacterias (*E.coli* y *S. aureus*), adquirido del laboratorio “Microbiológicos” de EE.UU. (Ver apéndice B) en los 100 ml de caldo nutritivo.
- Se llevó a incubación a 37 °C por 24 horas.

6.6.5. Preparación y esterilización de materiales

1. Placas Petri:

- Se lavaron las placas Petri con respectivo detergente, se enjuagaron y se pusieron a secar.
- Se empaquetaron con el papel Kraft.
- Se llevó a la estufa para esterilizar a 120 °C por 1 hora.

2. Pipetas (1 ml):

- Se lavaron pipetas, se enjuagaron y se pusieron a secar.
- Se empaquetaron con el papel Kraft
- Se llevó a la estufa para esterilizar a 120 °C por 1 hora.

3. Matraz (250 y 500 ml):

- Se lavaron los matraces, se enjuagaron y se pusieron a secar.
- Se empaquetaron con el papel Kraft
- Se llevó a la estufa para esterilizar a 120 °C por 1 hora.

4. Discos de inhibición (6 mm)

- Se cortaron los discos de inhibición con un perforador previamente esterilizado.
- Se colocaron en una placa Petri.
- Y se empaquetaron con el papel Kraft.
- Se llevó a la estufa para esterilizar a 120 °C por 1 hora.

6.6.6. Preparación, esterilización y acondicionamiento de los medios de cultivo

Se prepararon dos medios de cultivo:

1. Agar Mueller Hinton (*E.coli*)

Se preparó 315 ml del medio de cultivo para 21 placas Petri, tomando datos de las instrucciones de la etiqueta del envase del agar, aplicando la siguiente regla:

$$38 \text{ g} \rightarrow 1000 \text{ ml}$$

$$X \rightarrow 315 \text{ ml}$$

$$X = 11.97 \text{ g}$$

- Se pesó 11.97 gr del medio de cultivo.
- Se midió 315 ml de agua estéril en la probeta.
- Luego se vertió el medio de cultivo ya pesado en un matraz de 500 ml, seguido del agua estéril y se agitó para diluir la mezcla.
- Se completó la dilución en un mechero de Bunsen (aprox. 80-90 °C).
- Se llevó a la autoclave para su respectiva esterilización 121 °C a 15 Libras de presión por un tiempo de 15 a 20 min.
- Se vertió el contenido (15 ml) en cada placa.

2. Agar Sal Manitol (*S. aureus*)

Se preparó 315 ml del medio de cultivo para 21 placas Petri, tomando datos de las instrucciones de la etiqueta del envase del agar, aplicando la siguiente regla:

$$111 \text{ g} \rightarrow 1000 \text{ ml}$$

$$X \rightarrow 315 \text{ ml}$$

$$X = 34.96 \text{ g}$$

- Se pesó 34.96 g del medio de cultivo.

- Se midió 315 ml de agua estéril en la probeta.
- Luego se vertió el medio de cultivo ya pesado en un matraz de 500 ml, seguido del agua estéril y se agito para diluir la mezcla.
- Se completó la dilución en un mechero de Bunsen (aprox. 80 - 90 °C).
- Se llevó a la autoclave para su respectiva esterilización 121 °C a 15 Libras de presión por tiempo de 15 a 20 min.
- Se vertió el contenido (15 ml) en cada placa.

6.6.7. Inoculación de las bacterias

Para inoculación de las bacterias se utilizó 0.1 ml de la muestra de ambas bacterias, para cada placa (21 de *E.coli* y 21 de *S. aureus*); y con la ayuda del Asa de Digrafsky se homogenizó en toda la superficie del agar.

6.6.8. Acondicionamiento de los discos de inhibición en las diluciones

Se acondiciono 4 discos de inhibición en cada placa impregnados tanto de las diluciones de *Justicia secunda* como de amoxicilina + ácido clavulánico con ayuda de unas pinzas.

6.6.9. Incubación

Se llevó a incubación las placas Petri inoculadas tanto de *E.coli* (agar Mueller Hinton) y *S. aureus* (agar Sal Manitol), a 37 °C por 24 horas.

6.6.10. Toma de lectura

Se hizo la toma de lectura con la ayuda de una regla milimétrica. Con ello, se midió los diámetros de cada halo de inhibición de todos los discos de

inhibición de las placas Petri inoculadas con las bacterias de *E. coli* y *S. aureus*.

6.7. Procesamiento y análisis de la información

6.7.1. Procesamiento

Para el procesamiento de los datos se hizo uso de:

- ✓ Tabla de tabulación.
- ✓ Tablas de frecuencia.
- ✓ Gráficos estadísticos.

6.7.2. Análisis

Para el análisis de los resultados se hizo uso de:

- Media
- Desviación estándar
- Coeficiente de variación

Para la contrastación de la hipótesis se utilizó la estadística inferencial haciendo uso de los estadígrafos de “Prueba de *Kruskal Wallis* para datos independientes no paramétricos”.

El procesamiento y análisis de los resultados se hizo uso de programas informáticos especializados, como el Excel 2013 y el programa SPSS versión 20.

7. Resultados

7.1. Determinación de la actividad antibacterial de las diluciones a diferentes concentraciones de las hojas de *Justicia secunda* y amoxicilina/ácido clavulánico, frente a cultivos “*in vitro*” de bacterias G+ (*Staphylococcus aureus*) y bacterias G- (*Escherichia coli*).

7.1.1. Actividad antibacterial a una concentración de 6.7 % (m/v) de hojas de *Justicia secunda*

Tabla 2: Dilución hidrónica al 6.7 % (m/v) de hojas de *J. secunda* en *E. coli*.

| Halo de inhibición (mm) | Frecuencia | Porcentaje |
|-------------------------|------------|------------|
| 0,00 | 1 | 8,3 |
| 8,00 | 2 | 16,7 |
| 13,00 | 1 | 8,3 |
| 15,00 | 1 | 8,3 |
| Válidos 18,00 | 3 | 25,0 |
| 19,00 | 1 | 8,3 |
| 20,00 | 1 | 8,3 |
| 24,00 | 2 | 16,7 |
| Total | 12 | 100,0 |

Nota: La dilución hidrónica a una concentración de 6.7 % de las hojas de *J. secunda*, tiene una actividad antimicrobiana que se encuentra representada por el diámetro de los halos de inhibición, cuyos valores se encuentran entre 8 mm (valor menor) y 24 mm (valor mayor). Evidenciando que si existe una actividad antibacterial de las hojas de *J. secunda*, frente a cultivos *in vitro* de *E. coli*. Solo un disco de inhibición, no presenta halo, indicando que no tuvo actividad antimicrobiana.

Tabla 3: Dilución etanólica al 6.7 % (m/v) de *J. secunda* en *E. coli*.

| Halo de inhibición | Frecuencia | Porcentaje |
|--------------------|------------|------------|
| 7,00 | 6 | 50,0 |
| 8,00 | 4 | 33,3 |
| Válidos 12,00 | 1 | 8,3 |
| 24,00 | 1 | 8,3 |
| Total | 12 | 100,0 |

Nota: La dilución etanólica a una concentración de 6.7 % de las hojas de *J. secunda*, tiene una actividad antimicrobiana que se encuentra representada por 12 discos de inhibición, los cuales presentaron diámetros de sus halos de

inhibición, cuyos valores se encuentran entre 7 mm (valor menor) y 24 mm (valor mayor). Evidenciando que si existe una actividad antibacterial de las hojas de *J. secunda*, frente a cultivos *in vitro* de *E. coli*.

Tabla 4: Dilución hidroetanólica al 6.7 % (m/v) de *J. secunda* en *E. coli*.

| Halo de inhibición (mm) | Frecuencia | Porcentaje |
|-------------------------|------------|------------|
| 7,00 | 3 | 25,0 |
| 8,00 | 3 | 25,0 |
| 9,00 | 1 | 8,3 |
| Válidos 10,00 | 2 | 16,7 |
| 12,00 | 2 | 16,7 |
| 14,00 | 1 | 8,3 |
| Total | 12 | 100,0 |

Nota: La dilución hidroetanólica a una concentración de 6.7 % de hojas de *J. secunda*, tiene una actividad antimicrobiana que se encuentra representada por 12 discos de inhibición, los cuales presentaron diámetros de sus halos de inhibición, cuyos valores se encuentran entre 7 mm (valor menor) y 14 mm (valor mayor). Evidenciando que si existe una actividad antibacterial de las hojas de *J. secunda*, frente a cultivos *in vitro* de *E. coli*.

Tabla 5: Dilución hidrónica al 6.7 % (m/v) de *J. secunda* en *S. aureus*.

| Halo de inhibición (mm) | Frecuencia | Porcentaje (%) |
|-------------------------|------------|----------------|
| 14,00 | 2 | 16,7 |
| 18,00 | 1 | 8,3 |
| 24,00 | 2 | 16,7 |
| Válidos 25,00 | 1 | 8,3 |
| 26,00 | 3 | 25,0 |
| 28,00 | 3 | 25,0 |
| Total | 12 | 100,0 |

Nota: La dilución hidrónica a una concentración de 6.7 % de hojas de *J. secunda*, tiene una actividad antimicrobiana que se encuentra representada por 12 discos de inhibición, los cuales presentaron diámetros de sus halos de inhibición, cuyos valores se encuentran entre 14 mm (valor menor) y 28 mm (valor mayor). Evidenciando que si existe una actividad antibacterial de las hojas de *J. secunda*, frente a cultivos *in vitro* de *S. aureus*.

Tabla 6: Dilución etanólica al 6.7 % (m/v) de *J. secunda* en *S. aureus*.

| | Halo de inhibición (mm) | Frecuencia | Porcentaje |
|---------|-------------------------|------------|------------|
| Válidos | 7,00 | 1 | 8,3 |
| | 8,00 | 2 | 16,7 |
| | 9,00 | 2 | 16,7 |
| | 10,00 | 3 | 25,0 |
| | 12,00 | 1 | 8,3 |
| | 13,00 | 1 | 8,3 |
| | 14,00 | 1 | 8,3 |
| | 18,00 | 1 | 8,3 |
| | Total | 12 | 100,0 |

Nota: La dilución etanólica a una concentración de 6.7 % de hojas de *J. secunda*, tiene una actividad antimicrobiana que se encuentra representada por 12 discos de inhibición, los cuales presentaron diámetros de sus halos de inhibición, cuyos valores se encuentran entre 7 mm (valor menor) y 18 mm (valor mayor). Evidenciando que si existe una actividad antibacteriana de las hojas de *J. secunda*, frente a cultivos *in vitro* de *S. aureus*.

Tabla 7: Dilución hidroetanólica al 6.7 % (m/v) de *J. secunda* en *S. aureus*.

| | Halo de inhibición (mm) | Frecuencia | Porcentaje |
|---------|-------------------------|------------|------------|
| Válidos | 7,00 | 2 | 16,7 |
| | 8,00 | 8 | 66,7 |
| | 9,00 | 1 | 8,3 |
| | 10,00 | 1 | 8,3 |
| | Total | 12 | 100,0 |

Nota: La dilución hidroetanólica a una concentración de 6.7 % de hojas de *J. secunda*, tiene una actividad antimicrobiana que se encuentra representada por 12 discos de inhibición, los cuales presentaron diámetros de sus halos de inhibición, cuyos valores se encuentran entre 7 mm (valor menor) y 10 mm (valor mayor). Evidenciando que si existe una actividad antibacteriana de las hojas de *J. secunda*, frente a cultivos *in vitro* de *S. aureus*.

Tabla 8: Estadística descriptiva de la actividad antibacterial de las diluciones a una concentración de 6.7 % (m/v) de hojas de *Justicia secunda* frente a cultivos *in vitro* de *E.coli* y *S. aureus*.

| Estadígrafos | <i>E. coli</i> | | | <i>S. aureus</i> | | |
|---------------------------|----------------|-----------|----------------|------------------|-----------|----------------|
| | Hidráulica | Etanólica | Hidroetanólica | Hidráulica | Etanólica | Hidroetanólica |
| Media | 15.4 | 9.2 | 8.1 | 23.4 | 10.7 | 8.1 |
| Mediana | 18.0 | 7.5 | 8.0 | 25.5 | 10.0 | 8.0 |
| Moda | 18.0 | 7.0 | 8.0 | 26.0 | 10.0 | 8.0 |
| Desviación estándar | 7.1 | 4.9 | 0.8 | 5.16 | 3.1 | 0.8 |
| Coefficiente de variación | 46.1 | 53.2 | 9.8 | 22.0 | 29.2 | 9.8 |
| Varianza | 50.4 | 23.8 | 0.6 | 26.6 | 9.7 | 0.6 |
| Rango | 24.0 | 17.0 | 3.0 | 14.0 | 11.0 | 3.0 |
| Mínimo | 0.0 | 7.0 | 7.0 | 14.0 | 7.0 | 7.0 |
| Máximo | 24.0 | 24.0 | 10.0 | 28.0 | 18.0 | 10.0 |

Nota: En la tabla se evidencia la estadística descriptiva realizada al diámetro de los halos de inhibición de los tratamientos aplicados a los cultivos *in vitro* de *E. coli* y *S. aureus*. Se observa que el tratamiento que presenta una media (23.4 mm) mayor del diámetro de inhibición, es el de la dilución hidráulica de hojas de *J. secunda* frente a cultivos *in vitro* de *S. aureus*; seguida de la dilución hidráulica frente a *E. coli* (15.4 mm). A su vez, se nota que el tratamiento que presentan en promedio un menor diámetro (8.1 mm) del halo de inhibición es la dilución hidroetanólica frente a cultivos de *E. coli* y *S. aureus*.

7.1.2. Actividad antibacterial a una concentración de 13.3 % (m/v) de hojas de *Justicia secunda*

Tabla 9: Dilución hidráulica al 13.3 % (m/v) de *J. secunda* en *E. coli*.

| Halo de inhibición (mm) | Frecuencia | Porcentaje |
|-------------------------|------------|------------|
| 7,00 | 8 | 66,7 |
| 8,00 | 1 | 8,3 |
| 9,00 | 1 | 8,3 |
| 10,00 | 1 | 8,3 |
| 12,00 | 1 | 8,3 |
| Total | 12 | 100,0 |

Nota: La dilución hidráulica a una concentración de 13.3 % de hojas de *J. secunda*, tiene una actividad antimicrobiana que se encuentra representada por 12 discos de inhibición, los cuales presentaron diámetros de sus halos de

inhibición, cuyos valores se encuentran entre 7 mm (valor menor) y 12 mm (valor mayor). Evidenciando que si existe una actividad antibacterial de las hojas de *J. secunda*, frente a cultivos *in vitro* de *E. coli*.

Tabla 10: Dilución etanólica al 13.3 % (m/v) de *J. secunda* en *E. coli*.

| Halo de inhibición (mm). | Frecuencia | Porcentaje |
|--------------------------|------------|------------|
| 7,00 | 4 | 33,3 |
| 8,00 | 3 | 25,0 |
| 9,00 | 1 | 8,3 |
| 10,00 | 1 | 8,3 |
| 12,00 | 3 | 25,0 |
| Total | 12 | 100,0 |

Nota: La dilución etanólica a una concentración de 13.3 % de hojas de *J. secunda*, tiene una actividad antimicrobiana que se encuentra representada por 12 discos de inhibición, los cuales presentaron diámetros de sus halos de inhibición, cuyos valores se encuentran entre 7 mm (valor menor) y 12 mm (valor mayor). Evidenciando que si existe una actividad antibacterial de las hojas de *J. secunda*, frente a cultivos *in vitro* de *E. coli*.

Tabla 11: Dilución hidroetanólica al 13.3 % (m/v) de *J. secunda* en *E. coli*

| Halo de inhibición (mm). | Frecuencia | Porcentaje |
|--------------------------|------------|------------|
| 7,00 | 6 | 50,0 |
| 8,00 | 4 | 33,3 |
| 10,00 | 2 | 16,7 |
| Total | 12 | 100,0 |

Nota: La dilución hidroetanólica a una concentración de 13.3 % de hojas de *J. secunda*, tiene una actividad antimicrobiana que se encuentra representada por 12 discos de inhibición, los cuales presentaron diámetros de sus halos de inhibición, cuyos valores se encuentran entre 7 mm (valor menor) y 10 mm (valor mayor). Evidenciando que si existe una actividad antibacterial de las hojas de *J. secunda*, frente a cultivos *in vitro* de *E. coli*.

Tabla 12: Dilución hidrónica al 13.3 % (m/v) de *J. secunda* en *S. aureus*.

| | Halos de inhibición (mm) | Frecuencia | Porcentaje |
|---------|--------------------------|------------|------------|
| | 7,00 | 1 | 8,3 |
| | 8,00 | 2 | 16,7 |
| | 9,00 | 2 | 16,7 |
| Válidos | 10,00 | 5 | 41,7 |
| | 12,00 | 1 | 8,3 |
| | 16,00 | 1 | 8,3 |
| | Total | 12 | 100,0 |

Nota: La dilución hidrónica a una concentración de 13.3 % de hojas de *J. secunda*, tiene una actividad antimicrobiana frente a cultivos de *S. aureus*. Son 12 discos de inhibición, los cuales presentaron diámetros de sus halos de inhibición, cuyos valores se encuentran entre 7 mm (valor menor) y 16 mm (valor mayor). Evidenciando que si existe una actividad antibacterial de las hojas de *J. secunda*, frente a cultivos *in vitro* de *S. aureus*.

Tabla 13: Dilución etanólica al 13.3 % (m/v) de *J. secunda* en *S. aureus*.

| | Halo de inhibición (mm) | Frecuencia | Porcentaje |
|---------|-------------------------|------------|------------|
| | 7,00 | 1 | 8,3 |
| Válidos | 8,00 | 5 | 41,7 |
| | 10,00 | 6 | 50,0 |
| | Total | 12 | 100,0 |

Nota: La dilución etanólica a una concentración de 13.3 % de hojas de *J. secunda*, tiene una actividad antimicrobiana frente a cultivos de *S. aureus*. Son 12 discos de inhibición, los cuales presentaron diámetros de sus halos de inhibición, cuyos valores se encuentran entre 7 mm (valor menor) y 10 mm (valor mayor). Evidenciando que si existe una actividad antibacterial de las hojas de *J. secunda*, frente a cultivos *in vitro* de *S. aureus*.

Tabla 14: Dilución hidroetanólica al 13.3 % (m/v) de *J. secunda* en *S. aureus*.

| | Halo de inhibición (mm) | Frecuencia | Porcentaje |
|---------|-------------------------|------------|------------|
| | 8,00 | 5 | 41,7 |
| | 9,00 | 2 | 16,7 |
| Válidos | 10,00 | 4 | 33,3 |
| | 12,00 | 1 | 8,3 |
| | Total | 12 | 100,0 |

Nota: La dilución hidroetanólica a una concentración de 13.3 % de hojas de *J. secunda*, tiene una actividad antimicrobiana frente a cultivos de *S. aureus*. Son 12 discos de inhibición, los cuales presentaron diámetros de sus halos de inhibición, cuyos valores se encuentran entre 8 mm (valor menor) y 12 mm

(valor mayor). Evidenciando que si existe una actividad antibacterial de las hojas de *J. secunda*, frente a cultivos *in vitro* de *S. aureus*.

Tabla 15: Estadística descriptiva de la actividad antibacteriano de las diluciones a una concentración de 13.3 % (m/v) de hojas de *Justicia secunda* frente a cultivos *in vitro* de *E.coli* y *S. aureus*.

| Estadígrafo | <i>E. coli</i> | | | <i>S. aureus</i> | | |
|---------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------------|------------------------|-----------------------|----------------------------|
| | Dilución hidráulica | Dilución etanólica | Dilución hidroetanólica | Dilución hidráulica | Dilución etanólica | Dilución hidroetanólica |
| Media | 7.92 | 8.92 | 7.83 | 9.92 | 8.92 | 9.17 |
| Mediana | 7.00 | 8.00 | 7.50 | 10.00 | 9.00 | 9.00 |
| Moda | 7.00 | 7.00 | 7.00 | 10.00 | 10.00 | 8.00 |
| Desviación estándar | 1.62 | 2.07 | 1.11 | 2.31 | 1.16 | 1.27 |
| Coefficiente de variación | 20.48 | 23.16 | 14.23 | 23.34 | 13.06 | 13.83 |
| Varianza | 2.63 | 4.27 | 1.24 | 5.36 | 1.36 | 1.61 |
| Rango | 5.00 | 5.00 | 3.00 | 9.00 | 3.00 | 4.00 |
| Mínimo | 7.00 | 7.00 | 7.00 | 7.00 | 7.00 | 8.00 |
| Máximo | 12.00 | 12.00 | 10.00 | 16.00 | 10.00 | 12.00 |

Nota: En la tabla se evidencia la estadística descriptiva realizada al diámetro de los halos de inhibición de los tratamientos aplicados a los cultivos *in vitro* de *E. coli* y *S. aureus* a una concentración de 13.3 % de hojas de *J. secunda*. Se observa que el tratamiento que presenta una media mayor del diámetro de inhibición (9.92 mm), es el de la dilución hidráulica de hojas de *J. secunda* frente a cultivos *in vitro* de *S. aureus*. A su vez, se nota que el tratamiento que presentan en promedio un menor diámetro del halo de inhibición (7.83 mm), es la dilución hidroetanólica frente a cultivos de *E. coli*.

7.1.3. Actividad antibacterial de Amoxicilina + Ac. Clavulánico frente a cultivos *in vitro* de *E. coli* y *S. aureus*

Tabla 16: Amoxicilina + Ac. Clavulánico en *S. aureus*.

| Halo de inhibición (mm) | Frecuencia | Porcentaje |
|-------------------------|------------|------------|
| 36,00 | 1 | 8,3 |
| 38,00 | 4 | 33,3 |
| 40,00 | 5 | 41,7 |
| 42,00 | 1 | 8,3 |
| 44,00 | 1 | 8,3 |
| Total | 12 | 100,0 |

Nota: El fármaco Amoxicilina + Ac. Clavulánico tiene una actividad antimicrobiana frente a cultivos de *S. aureus*. Son 12 discos de inhibición, los

cuales presentaron diámetros de sus halos de inhibición, cuyos valores se encuentran entre 36 mm (valor menor) y 44 mm (valor mayor). Evidenciando que si existe una actividad antibacterial de Amoxicilina + Ac. Clavulánico, frente a cultivos *in vitro* de *S. aureus*.

Tabla 17: Amoxicilina + Ac. Clavulánico en *E. coli*.

| Halo de inhibición (mm) | Frecuencia | Porcentaje |
|-------------------------|------------|------------|
| 32,00 | 3 | 25,0 |
| 34,00 | 2 | 16,7 |
| 35,00 | 1 | 8,3 |
| Válidos 36,00 | 2 | 16,7 |
| 40,00 | 3 | 25,0 |
| 44,00 | 1 | 8,3 |
| Total | 12 | 100,0 |

Nota: El fármaco Amoxicilina + Ac. Clavulánico tiene una actividad antimicrobiana frente a cultivos de *E. coli*. Son 12 discos de inhibición, los cuales presentaron diámetros de sus halos de inhibición, cuyos valores se encuentran entre 32 mm (valor menor) y 44 mm (valor mayor). Evidenciando que si existe una actividad antibacterial de Amoxicilina + Ac. Clavulánico, frente a cultivos *in vitro* de *E. coli*.

Tabla 18: Análisis estadístico descriptivo de la actividad antibacterial de Amoxicilina + Ac. Clavulánico frente a cultivos *in vitro* de *E. coli* y *S. aureus*.

| Estadígrafo | Amoxicilina + Ac. Clavulánico en <i>E. coli</i> | Amoxicilina + Ac. Clavulánico en <i>S. aureus</i> |
|-------------------------|---|---|
| Media | 36.25 | 39.50 |
| Mediana | 35.50 | 40.00 |
| Moda | 32.00 | 40.00 |
| Desviación estándar | 3.91 | 2.11 |
| Coficiente de variación | 10.79 | 5.34 |
| Varianza | 15.30 | 4.46 |
| Rango | 12.00 | 8.00 |
| Mínimo | 32.00 | 36.00 |
| Máximo | 44.00 | 44.00 |

Nota: La tabla da conocer el análisis estadístico descriptivo sobre la actividad antibacterial de Amoxicilina + Ac. Clavulánico frente a cultivos *in vitro* de *E. coli* y *S. aureus*. Se observa que el promedio del diámetro del halo de inhibición de Amoxicilina + Ac. Clavulánico frente a cultivos *in vitro* de *E. coli* es de 36.25 mm y frente a cultivos *in vitro* de *S. aureus* es de 39.50 mm. Por lo cual

se puede señalar que la mayor actividad antibacterial se da frente a cultivos *in vitro* de *S. aureus*.

7.2. Identificación la dilución de *Justicia secunda* que tiene mayor actividad antibacterial, frente a cultivos “*in vitro*” de bacterias G⁻ (*E. coli*) y bacterias G⁺ (*S. aureus*).

Tabla 19: Promedio de los diámetros de los halos de inhibición de las diferentes diluciones de hojas de *J. secunda* frente a *E. coli* y *S. aureus*.

| Concentración | Estadígrafos | <i>E. coli</i> | | | <i>S. aureus</i> | | |
|-----------------|--------------|----------------|-----------|----------------|------------------|-----------|----------------|
| | | Hidráulica | Etanólica | Hidroetanólica | Hidráulica | Etanólica | Hidroetanólica |
| 6.7 % (m/v) | Media | 15.4 | 9.2 | 8.1 | 23.4 | 10.7 | 8.1 |
| 13.3 % (m/v) | | 7.92 | 8.92 | 7.83 | 9.92 | 8.92 | 9.17 |

Nota: La tabla da a conocer las diluciones que presentan mayor actividad antibacterial, ello respecto al mayor promedio de diámetro del halo de inhibición de las diluciones a diferentes concentraciones, frente a cultivos de *E.coli* y *S. aureus*. Se evidencia que la dilución hidráulica a una concentración de 6.7 % (m/v) tiene la mayor actividad antimicrobiana, frente a cultivos de *S. aureus* (23.4 mm). Así mismo, la dilución hidráulica a una concentración de 6.7 %, tiene mayor actividad antibacterial frente a cultivos de *E. coli* (15.4 mm).

7.3. Identificación de la bacteria que presenta mayor inhibición de su crecimiento frente a la actividad antibacterial de las diferentes diluciones de las hojas de *Justicia secunda*

Tabla 20: Sensibilidad de las bacterias *E. coli* y *S. aureus* a la actividad antibacterial de las diferentes diluciones de las hojas de *J. secunda*

| Concentración | Estadígrafos | <i>E. coli</i> | | | <i>S. aureus</i> | | |
|----------------|--------------|----------------|-----------|----------------|------------------|-----------|----------------|
| | | Hidráulica | Etanólica | Hidroetanólica | Hidráulica | Etanólica | Hidroetanólica |
| 6.7 % (m/v) | Media | 15.4 | 9.2 | 8.1 | 23.4 | 10.7 | 8.1 |
| | | 7.92 | 8.92 | 7.83 | 9.92 | 8.92 | 9.17 |

Nota: En la tabla se evidencia que la bacteria *S. aureus*, es la que presenta mayor inhibición de crecimiento (23.4 mm de diámetro de halo de inhibición) frente a la dilución hidráulica a una concentración de 6.7 % de hojas de *J. secunda*. Así mismo, *E. coli*, presenta mayor inhibición de crecimiento (15.4 mm de diámetro del halo de inhibición) frente a la dilución hidráulica a una concentración de 6.7 % de hojas de *J. secunda*. En la concentración de 13.3 % de hojas de *J. secunda*, *E. coli* tiene inhibición de crecimiento (8.92 mm) a la dilución etanólica y *S. aureus* (9.92 mm) a la dilución hidráulica.

7.4. Comparación de la actividad antibacterial de las diluciones de las hojas de *Justicia secunda* y Amoxicilina/Ácido Clavulánico, frente a cultivos “*in vitro*” de bacterias G⁻ (*Escherichia coli*) y bacterias G⁺ (*Staphylococcus aureus*).

Tabla 21: Comparación de la actividad antibacterial de las diluciones de las hojas de *Justicia secunda* y Amoxicilina/Ácido Clavulánico

| | Tratamiento | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> |
|--------------|-------------------------------|----------------|------------------|
| 6.7 % (m/v) | Hidráulica | 15.4 | 23.4 |
| | Etanólica | 9.2 | 10.7 |
| | Hidroetanólica | 8.1 | 8.1 |
| 13.3 % (m/v) | Hidráulica | 7.92 | 9.92 |
| | Etanólica | 8.92 | 8.92 |
| | Hidroetanólica | 7.83 | 9.17 |
| | Amoxicilina/Ácido Clavulánico | 36.25 | 39.5 |

Nota: La tabla demuestra que la mayor actividad antibacterial se da en el fármaco comercial, donde se observa que frente a cultivos *in vitro* de *E. coli*, se tiene en promedio un diámetro del halo de inhibición de 36.25 mm y frente a cultivos *in vitro* de *S. aureus*, se tiene un diámetro del halo de inhibición de 39.5 mm. En cambio, al observar la actividad de las diferentes diluciones y a concentraciones de 6.7 % de hojas de *J. secunda*, se observa que la dilución hidráulica a una concentración de 6.7 %, con un diámetro del halo de inhibición de 23.4 mm en promedio, presenta la mayor actividad antibacterial frente a cultivos de *S. aureus*. Así mismo, la dilución hidráulica a una concentración de 6.7 % de hojas de *J. secunda*, tiene en promedio un diámetro de halo de inhibición de 15.4 mm frente a cultivos *in vitro* de *E. coli*.

7.5. Contrastación de la hipótesis de la investigación

Para la prueba de hipótesis se siguieron los cinco pasos recomendados por la literatura científica:

1. Plantear las hipótesis estadísticas.
2. Especificar el Nivel de Significancia (α).
3. Seleccionar el Estadístico de prueba.

4. Establecer la regla de decisión.
5. Tomar la decisión.

7.5.1. Plantear las hipótesis estadísticas

- **La hipótesis planteada (H_1):** “Existe diferencias significativas entre los halos de inhibición en diluciones de las hojas de *Justicia secunda*, Amoxicilina/Ácido Clavulánico en cultivos “*in vitro*” de bacterias G^+ (*Staphylococcus aureus*), y bacterias G^- (*Escherichia coli*) Piura – 2021”.
- **La hipótesis nula (H_0):** “No Existe diferencias significativas entre los halos de inhibición en diluciones de las hojas de *Justicia secunda*, Amoxicilina/Ácido Clavulánico en cultivos “*in vitro*” de bacterias G^+ (*Staphylococcus aureus*), y bacterias G^- (*Escherichia coli*) Piura – 2021”.

Se debe recordar, que, al realizar la prueba de hipótesis, esta se hace en la hipótesis nula (H_0). En este sentido, se plantean las hipótesis estadísticas:

- $H_0: \bar{x}_1 = \bar{x}_2 = \bar{x}_3 = \bar{x}_4 = \bar{x}_5 = \bar{x}_6 = \bar{x}_7 = \bar{x}_8 = \bar{x}_9 = \bar{x}_{10} = \bar{x}_{11} = \bar{x}_{12} = \bar{x}_{13} = \bar{x}_{14}$
- $H_1: \bar{x}_1 \neq \bar{x}_2 \neq \bar{x}_3 \neq \bar{x}_4 \neq \bar{x}_5 \neq \bar{x}_6 \neq \bar{x}_7 \neq \bar{x}_8 \neq \bar{x}_9 \neq \bar{x}_{10} \neq \bar{x}_{11} \neq \bar{x}_{12} \neq \bar{x}_{13} \neq \bar{x}_{14}$

7.5.2. Especificar el Nivel de Significancia (α)

El Nivel de Significancia para la presente investigación fue de 0,05 ($\alpha = 0,05$) y un Nivel de Confianza del 95 %.

7.5.3. Seleccionar del estadístico de prueba

Para elegir el estadístico de análisis para la prueba de hipótesis correspondiente, lo primero a realizar es, verificar que los datos se encuentren o no sobre la curva normal, es decir si son datos “paramétricos” o “no

paramétricos”. Para ello, se tiene que realizar la prueba de la normalidad y, por el número de datos (168 datos) corresponde aplicar la Prueba de Kolmogorov – Smirnov.

Tabla 22: Prueba de normalidad de Kolmogorov – Smirnov

| Variables | Kolmogorov - Smirnov ^a | | |
|---|-----------------------------------|-----|----------------|
| | Estadístico | gl | Sig. (p valor) |
| Diámetro de los halos de inhibición | 0,303 | 168 | 0,000 |
| Tratamiento con actividad antibacterial | 0,092 | 168 | 0,001 |

Nota: Al realizar la prueba de la normalidad a través de la prueba de Kolmogorov – Smirnov, se nota que en ambas variables se nota un p valor menos al nivel de significancia ($p < \alpha$); por lo tanto, los datos no son paramétricos, por lo cual, el estadístico a utilizar para la prueba de hipótesis es la Prueba de Kruskal Wallis para datos independientes no paramétrico.

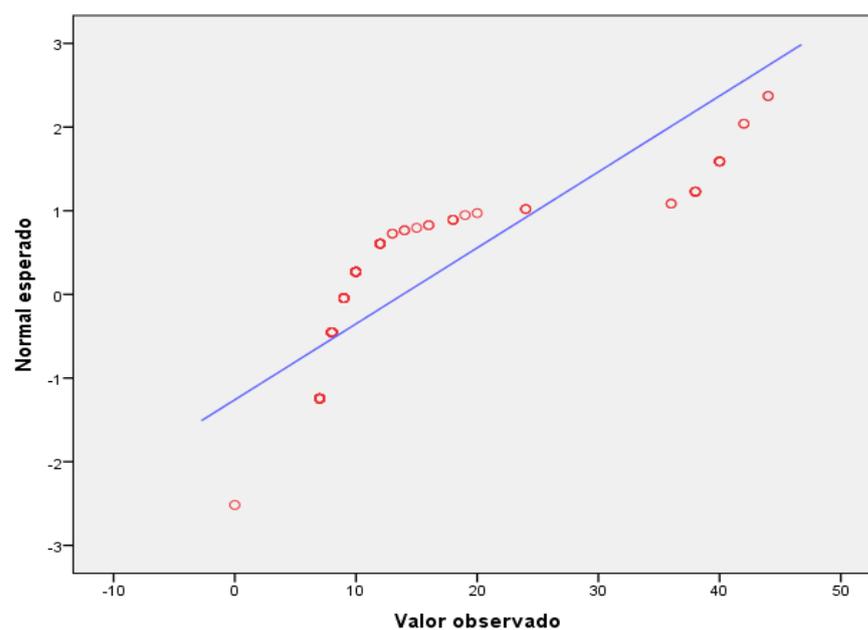


Figura 1: Distribución de los promedios de los diámetros de los tratamientos frente a cultivos *in vitro* de *E. coli* y *S. aureus*.

Tabla 23: Análisis estadístico descriptivo de las medias de los promedios de los diámetros de los halos de inhibición.

| Tratamiento | Nº | Media | Desviación estándar | Mínimo | Máximo |
|--|-----|-------|---------------------|--------|--------|
| Dilución hidrónica al 6.7 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>E. coli</i> | 12 | 15,4 | 7,10 | 0,00 | 24,00 |
| Dilución etanólica al 6.7 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>E. coli</i> | 12 | 9,16 | 4,87 | 7,00 | 24,00 |
| Dilución hidroetanólica al 6.7 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>E. coli</i> | 12 | 9,33 | 2,30 | 7,00 | 14,00 |
| Dilución hidrónica al 13.3 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>E. coli</i> | 12 | 7,91 | 1,62 | 7,00 | 12,00 |
| Dilución etanólica al 13.3 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>E. coli</i> | 12 | 8,91 | 2,06 | 7,00 | 12,00 |
| Dilución hidroetanólica al 13.3 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>E. coli</i> | 12 | 7,83 | 1,11 | 7,00 | 10,00 |
| Dilución hidrónica al 6.7 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>S. aureus</i> | 12 | 23,4 | 3,1 | 7,00 | 28,00 |
| Dilución etanólica al 6.7 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>S. aureus</i> | 12 | 10,66 | 3,11 | 7,00 | 18,00 |
| Dilución hidroetanólica al 6.7 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>S. aureus</i> | 12 | 8,08 | 0,79 | 7,00 | 10,00 |
| Dilución hidrónica al 13.3 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>S. aureus</i> | 13 | 9,76 | 2,27 | 7,00 | 16,00 |
| Dilución etanólica al 13.3 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>S. aureus</i> | 12 | 9,00 | 1,12 | 7,00 | 10,00 |
| Dilución hidroetanólica al 13.3 % (m/v) de <i>J. secunda</i> en <i>S. aureus</i> | 12 | 11,75 | 8,98 | 8,00 | 40,00 |
| Amoxicilina + Ac. Clavulánico en <i>E. coli</i> | 12 | 36,25 | 2,11 | 36,00 | 44,00 |
| Amoxicilina + Ac. Clavulánico en <i>S. aureus</i> | 11 | 39,50 | 2,20 | 36,00 | 44,00 |
| Total | 168 | 13,87 | 11,01 | 0,00 | 44,00 |

Nota: La tabla muestra las medias, desviación estándar, valor mínimo y máximo de los diámetros de los halos de inhibición de los tratamientos aplicados a cultivos *in vitro* de *E. coli* y *S. aureus*.

Tabla 24: Estadísticos de contraste Prueba de Kruskal Wallis

| Estadístico | Diámetro de los halos de inhibición |
|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Chi-cuadrado | 107,321 |
| GI | 13 |
| Significancia asintótica (p Valor). | 0,000 |

Nota: La “Prueba de Kruskal Wallis para muestras independiente no paramétricas”, demuestra un *p Valor* de 0.000, valor que es menor al nivel de significancia ($\alpha = 0.05$).

7.5.4. Establecer la regla de decisión

Al determinar el valor de “p” según la Prueba de Kruskal Wallis, que es igual a 0.000, se puede establecer la siguiente regla de decisión:

- Si $p > 0.05$, se acepta H_0 y se rechaza H_1 .
- Si $p < 0.05$, se rechaza H_0 y se acepta H_1 .

7.5.5. Toma de decisión y conclusión

Al determinar el valor de “p” a través de la Prueba de Kruskal Wallis, se puede decidir:

- $p < \alpha$
- $0.000 < 0.05$

La “p” a partir de los estadígrafos muestrales, es menor que el nivel de significancia ($\alpha = 0.05$), entonces se puede decir que “Existe diferencias significativas entre los halos de inhibición de las diferentes diluciones de las hojas de *J. secunda* a concentraciones de 6.7 % y 13.3 % y a Amoxicilina + Ac. Clavulánico, en cultivos *in vitro* de *E. coli* y *S. aureus*”.

8. Análisis y discusión

8.3. Análisis

La actividad antibacterial de las diluciones de las hojas de *J. secunda* a concentraciones de 6.7 % frente a cultivos *in vitro* de *E. coli* y *S. aureus*, se evidencian en las tablas 2 al 7; y en la tabla 8, se evidencia el análisis estadístico descriptivo de esta actividad antibacterial. La estadística descriptiva señala que, para la bacteria *S. aureus*, la media de 23.4 mm de la dilución hidrónica, es la que presenta mayor actividad antibacterial, seguida de la dilución hidrónica frente a *E. coli*, que presente en promedio un diámetro de halo de inhibición de 15.4 mm. A su vez, se nota que los tratamientos que presentan en promedio un menor diámetro (8.1 mm) del halo de inhibición es la dilución hidroetanólica frente a cultivos de *E. coli* y *S. aureus*.

La actividad antibacterial de las diluciones de las hojas de *J. secunda* a una concentración de 13.3 % frente a cultivos *in vitro* de *E. coli* y *S. aureus*, se encuentran registrados en las tablas 9, 10, 11, 12, 13 y 14; y el análisis estadístico descriptivo de estos datos se encuentran registrados en la tabla 15. El análisis estadístico señala que frente a *E. coli*, señala que la dilución etanólica es la que presenta una media de 8.92 mm, del diámetro del halo de inhibición, siendo esta la de mayor actividad antibacterial, a comparación de la dilución hidrónica (7.92 mm) e hidroetanólica (7.83 mm) quienes presentan menor actividad antibacterial.

Las tablas 16 y 17, registran los datos de los diámetros de los halos de inhibición de Amoxicilina + Ac. Clavulánico frente a cultivos *in vitro* de *E. coli* y *S. aureus*. La tabla 18, registra el análisis estadístico descriptivo realizado a los datos obtenidos, donde se señala que frente a *E. coli* se tiene un promedio del diámetro de 36.25 mm y frente a *S. aureus* se tiene 39.50 mm, datos que evidencian la actividad antibacterial del fármaco.

Para la identificación de la dilución que tuvo mayor inhibición en el crecimiento de las bacterias *E. coli* y *S. aureus*; la tabla 19 señala, que la dilución hidrólica a una concentración de 6.7 % (m/v) tiene la mayor actividad antimicrobiana, frente a cultivos de *S. aureus* (23.4 mm). Así mismo, la dilución hidrólica a una concentración de 6.7 %, tiene mayor actividad antibacterial frente a cultivos de *E. coli* (15.4 mm).

La tabla 20 señala que la bacteria *S. aureus*, es la que presenta mayor inhibición a su crecimiento frente a la dilución hidrólica a una concentración de 6.7 % de hojas de *J. secunda*, con un diámetro en promedio de 23.4 mm. Así mismo, *E.coli*, presenta mayor inhibición de crecimiento a la dilución hidrólica a una concentración de 6.7 % de hojas de *J. secunda*, presentando en promedio un diámetro de 15.4 mm. En la concentración de 13.3 % de hojas de *J. secunda*, *E. coli* tiene mayor inhibición de crecimiento frente a la dilución etanólica, donde se señala que en promedio se tiene un diámetro del halo de inhibición de 8.92 mm y *S. aureus* frente a la dilución hidrólica presenta en promedio, un diámetro de 9.92 mm del halo de inhibición.

Al realizar la comparación de las actividades antibacteriales de los tratamientos aplicados durante la investigación, la tabla 21, registra estos datos, evidenciándose que la mayor actividad antibacterial se da en el fármaco comercial, donde se observa que frente a cultivos *in vitro* de *E. coli*, se tiene en promedio del diámetro del halo de inhibición de 36.25 mm y frente a cultivos *in vitro* de *S. aureus*, se tiene un diámetro del halo de inhibición de 39.50 mm. En cambio, al observar la actividad de las diferentes diluciones y a concentraciones de 6.7 % de hojas de *J. secunda*, se observa que la dilución hidrólica con un diámetro del halo de inhibición de 23.4 mm en promedio, presenta la mayor actividad antibacterial frente a cultivos de *S. aureus*. Así mismo, la dilución hidrólica a una concentración de 6.7 % de hojas de *J. secunda*, tiene en promedio un diámetro de halo de inhibición de 15.4 mm frente a cultivos *in vitro* de *E. coli*.

Ante lo dicho, se puede observar que todos los tratamientos aplicados durante la investigación, a los cultivos *in vitro* de *E. coli* y *S. aureus*, en mayor o menor grado, tienen actividad antibacterial. Además de ello, se puede señalar que los cultivos *in vitro* de *E. coli* y *S. aureus*, son resistentes (halos de inhibición menores a 20 mm) a las diluciones de las hojas de *J. secunda*, con excepción de la dilución hidrónica a una concentración de 6.7 % (m/v) frente a *S. aureus*, cuya bacteria presenta una sensibilidad intermedia (23.4 mm). Con respecto a Amoxicilina + Ácido Clavulánico, las bacterias presentan una alta sensibilidad (*E. coli* = 36.25 mm y *S. aureus* = 39.50 mm).

Con respecto a la prueba o contrastación de la hipótesis de investigación, se siguió los cinco pasos recomendados por la literatura científica. Las tablas 21, 22 y 23, y la figura 1, registran los datos de la prueba de hipótesis, donde se puede ver que la tabla 21, se registran los datos de la Prueba de normalidad de Kolmogorov – Smirnov, señalando que los datos de los diámetros de inhibición de los tratamientos aplicados a las bacterias *E. coli* y *S. aureus*, son datos no paramétricos; a la vez, la figura 1, señala la distribución de estos datos con respecto a línea media de comparación, observando la variabilidad de la posición de los datos. Al ser datos no paramétricos, el estadístico de Prueba de Hipótesis elegido es la Prueba de Kruskal Wallis para datos independientes no paramétrico. Al realizar esta prueba, la tabla 22 arroja datos del análisis descriptivo, donde se evidencia las medias de los diámetros de los halos de inhibición de los 14 tratamientos. La tabla 24 registra los datos del análisis de la Prueba de Kruskal Wallis para datos independientes no paramétrico, donde el p Valor es igual a 0.00 (p-Valor < α), observando que este valor es menor que el valor del nivel de significancia ($\alpha = 0.05$), este dato permite tomar como verdadera la hipótesis planteada en la investigación.

8.4. Discusiones

Los resultados del presente estudio, demuestra que las diluciones hidrónica, etanólica e hidroetanólica a concentraciones del 6.7% presentan actividad antibacterial frente cultivos “*in vitro*” de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Se observa que el tratamiento que presenta una media (23.4 mm) mayor del diámetro de inhibición es el de la dilución hidrónica, frente a cultivos “*in vitro*” de *S. aureus*; seguida de la dilución hidrónica a una concentración de 6.7 % (m/v) frente a *E. coli* (15.4 mm). A su vez, se nota los tratamientos que presentan en promedio un menor diámetro (8.1 mm) del halo de inhibición es la dilución hidroetanólica frente a cultivos de *E. coli* y *S. aureus*. Asimismo, los resultados obtenidos en las tablas (9-14), demuestra que las diluciones ya mencionadas a una concentración del 13.3% presentan una actividad antibacterial frente a cultivos *in vitro* de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, observándose que el tratamiento que presenta una media mayor del diámetro de inhibición (9.92 mm), es el de la dilución hidrónica de hojas de *J. secunda* frente a cultivos *in vitro* de *S. aureus*. A su vez, se nota que el tratamiento que presentan en promedio un menor diámetro del halo de inhibición (7.83 mm), es la dilución hidroetanólica frente a cultivos de *E. coli*. Por lo tanto, se puede observar que si hay actividad antibacterial frente a estas bacterias.

La investigación realizada por Herrera, et al. (2008), reportan como resultados que los preparados de extracto de etanol de las hojas de *J. secunda*, que luego fueron repartidos secuencialmente con n-hexano (FHX), cloroformo (FCH), y una solución acuosa (FOH), tuvieron actividad antimicrobiana frente a bacterias G⁺, como *Bacillus cereus* (ATCC 9634) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), sin embargo, dicha actividad no se registró frente a bacteria G⁻, como *Escherichia coli* (ATCC 0389), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Proteus vulgaris* (ATCC 9920) y *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028). Al comparar estos resultados, con los resultados del presente estudio, se puede

notar que existe coincidencia de la actividad antibacterial frente a bacterias G⁺ (*S. aureus*); sin embargo, no se comparte con respecto a las bacterias G⁻ (*E. coli*), ya que los autores citados, reporta sin actividad antibacteriana frente a estas bacterias (*E. coli*) y los reportes del presente estudio si reportan actividad antibacterial frente a *E. coli* (G⁻).

Zambrano y Bustamante (2017) en su investigación concluyen que existen gran variedad de componentes químicos presentes en las hojas de *J. secunda* que le otorga un alto potencial de uso medicinal como antiséptico, antiinflamatorio y antioxidante, entre otros. Del mismo modo, Onochie, et al (2020) reportan como resultado de su estudio que extracto de hojas etanólicas de las hojas de *J. secunda*, contiene cantidades apreciables de fitonutrientes, micronutrientes y constituyentes fitoquímicos; componentes que le catalogan a *J. secunda*, como una planta de valor medicinal. Así mismo, el estudio realizado por Kitadi, et al (2019), donde señalan que *J. secunda* es una planta que tradicionalmente es utilizada para el tratamiento de enfermedades respiratorias y gastrointestinales, inflamación, para el tratamiento del sistema nerviosos central, antitumoral, antioxidante, antibacteriano, antifúngico, antiangiogénico, antihelmíntico y actividades hepatoprotector; los autores concluyen que, estas actividades farmacológicas se deben a la presencia de numerosos fitoquímicos naturales como fenoles, flavonoides, alcaloides, taninos, glucósidos, saponinas, cumarinas, y terpenos. Del mismo modo, la investigación realizada por Oluwatimilehin, et al. (2020), evidencia que *J. secunda* es una planta medicinal que pertenece a la familia Acanthaceae, es muy usada en la medicina tradicional para el tratamiento y manejo de una amplia gama de dolencias; además señalan, que los datos de sus resultados sobre el contenido fitomineral y fitoquímico de las hojas, estandarizan a *J. secunda* como una planta prometedora para fines medicinales. Estos estudios, revelan la importancia farmacológica de *J. secunda* frente a diversas enfermedades, importancia que se da, gracias a sus componentes fitoquímicos; una de estas enfermedades es causadas por bacterias, gracias a su actividad

antibacterial que poseen, permite su uso para combatir las. Los resultados del presente estudio, corroboran esta propiedad farmacológica de *J. secunda*, donde se da a conocer la actividad antibacterial de las tres diluciones (hidrónica, etanónica e hidroetanónica) de las hojas, frente a cultivos “*in vitro*” de *E.coli* y *S. aureus*.

Abiodun, Oluwabusola y Abimbola (2020) realizaron un estudio donde el fin fue ver la actividad antibacterial de extractos (metanónico, etanónico y acuoso) de las hojas de *J. secunda*, frente a cinco bacterias patógenas clínicas; los resultados de la investigación señalan que todos los extractos tenían actividad antibacteriana contra las bacterias de prueba a 150 mg/ml, con la excepción de los extractos acuosos y metanónicos que no tenían actividad contra *E. coli*. Estos resultados se comparten con los resultados del presente estudio, ya que las tres diluciones (hidrónica, etanónica e hidroetanónica) aplicados frente a *E. coli* y *S. aureus*, tienen actividad antibacterial; lo contrario es que los investigadores citados señalan que los extractos acuosos y metanónicos no tenían actividad contra *E. coli*, pero, en estudio realizado se ve que el extracto hidrónico, etanónico e hidroetanónico tiene actividad antibacterial frente a *E.coli*.

El trabajo realizado por Romanus, et al. (2020), quienes evaluaron los parámetros farmacognósticos de *J. secunda* con microscopía, micromerítica, quimiomicroscopía, fluorescencia, valores extractivos, contenido de humedad y valores de cenizas. Sus resultados evidencian de la quimiomicroscopía de hojas y tallos revelaron la presencia de mucílago, cristales de oxalato de calcio y aceite, compuestos que le asignan propiedades farmacológicas frente a diversas enfermedades. Además de ello, reportan que los valores de extracción soluble en agua los resultados de hoja y tallo fueron 26,00 % p/p y, 12,00 % p/w, datos que señalan que los compuestos fitoquímicos de las hojas de *J. secunda*, son hidrosolubles. Estos valores son corroborados en la presente

investigación, ya que se denota que la solución hidrónica tiene en promedio mayor actividad antibacterial.

Con los resultados obtenidos en el presente estudio se evidencia la actividad antibacterial frente a cultivos *in vitro* de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, donde se prevé que a mayor concentración de las diferentes diluciones se podrá obtener una mejor actividad antibacterial frente a estas bacterias que tienen mucha importancia en estos tiempos debido a la resistencia bacteriana que puedan tener.

9. Conclusiones y recomendaciones

9.1. Conclusiones

9.1.1. Del objetivo general

Con un nivel de significancia de 0.05 ($\alpha = 0.05$) y un p-Valor de 0.00, existe diferencias significativas entre los halos de inhibición de las diferentes diluciones de las hojas de *J. secunda* a concentraciones de 6.7 % y 13.3 % y a la Amoxicilina + Ac. Clavulánico, en cultivos *in vitro* de *E. coli* y *S. aureus*. Demostrando que las diferentes diluciones de hojas de *J. secunda*, tienen actividad antibacterial frente a cultivos *in vitro* de bacterias G⁺ (*S. aureus*) y G⁻ (*E. coli*). Piura, 2021.

9.1.2. De los objetivos específicos

- 1) A concentraciones de 6.7 % y 13.3 % de hojas de *J. secunda*, existe actividad antibacterial de las diluciones hidrónica, etanólica e hidroetanólica frente a cultivos *in vitro* de *E. coli* y *S. aureus*, donde se observan promedios de los diámetros de los halos de inhibición que van desde 8.1 mm a 23.4 mm. Para el fármaco Amoxicilina + Ac. Clavulánico

frente a *E. coli*, la actividad antibacterial está determinada por la media del diámetro del halo de inhibición de 36.25 mm y frente a *S. aureus*, 39.50 mm.

- 2) La dilución hídrica de *J. secunda* a una concentración de 6.7 %, tiene la mayor actividad antibacterial con una media de 23.4 mm de diámetro del halo de inhibición, frente a cultivos in vitro de *S. aureus*. Y, Frente a *E. coli* una media del diámetro de halo de inhibición de 15.4 mm.
- 3) La bacteria que presenta mayor inhibición en su crecimiento es *S. aureus* como efecto de la actividad antibacterial de la dilución hídrica a una concentración de 6.7 % de hojas de *J. secunda*.
- 4) El fármaco Amoxicilina/Ácido Clavulánico, tiene mayor actividad antibacterial frente a *E.coli* (36.25 mm) y *S.aureus* (39.5 mm), seguida por la dilución hídrica a una concentración de 6.7 % de hojas de *J. secunda* frente a *S. aureus* (23.4 mm); y frente a *E. coli* 15.4 mm.

9.2. Recomendaciones

- Realizar investigaciones de *Justicia secunda*, respecto a su actividad frente a otros microorganismos de importancia clínica, que puedan dar aporte al conocimiento científico para estudios de nuevos productos farmacéuticos.
- Realizar estudios a diferentes concentraciones de las diluciones de las hojas de *Justicia secunda*, para determinar cuál es la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a *E.coli* y *S. aureus*, ya que el objetivo del presente estudio no tuvo tal fin.
- Realizar estudios a concentraciones mayores de las diluciones de *justicia secunda* realizadas en este estudio (6.7% y 13.3%), para la obtención de mayor actividad antibacterial, ya que los resultados presentados dan cuenta de la inhibición de crecimiento bacteriano.
- Realizar estudio de las otras partes de *Justicia secunda* (flores, tallo y raíces) ya que podrían tener los mismos o mayores efectos antibacterianos, presentados en el presente estudio.

10. Agradecimiento

Agradezco a Jehová Dios por permitirme la vida y así haber concluido con mi tesis.

A mis padres Yolanda y Jorge, mis hermanos Karin y Samuel por estar presentes y apoyarme en cada uno de los pasos importantes en mi vida.

Y a cada una de las personas que fueron participes de este paso importante y aunque no estén mencionados, saben lo agradecida que estoy con cada uno de ellos por su infinito apoyo.

11. Referencias bibliográficas

- Abiodun, A., Oluwabusola, O. y Abimbola, A. (2020). Cribado fitoquímico y antibacteriano in vitro actividad de los extractos de hojas de Justicia secunda Vahl sobre patógenos clínicos seleccionados. DOI: <http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.3985136>
- Arogbodo, J.O. (2020). Evaluación del fitoquímico, Constituyentes próximos y elementales de Justicia secunda M. Vahl Leaf. Rev. International Journal of Innovative Science and Research Technology.5: 1262 – 1268. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/342525145>
- Ausina, V., y Moreno, S. (2006). Tratado SEIMC de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. (S. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, Ed.) Médica Panamericana. Recuperado de https://books.google.es/books?id=1FBKR_17ZFsC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false
- Benavides, E.D.N., Villán, A.L., Ríos, E. y Charry, P.A. (2018). Etnobotánica y aislamiento de metabolitos secundarios de *Justicia secunda* Vahl (Acanthaceae) colectada en el departamento del Quindío, Colombia. VI Congreso Latinoamericano de plantas Medicinales.
- Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S.A., y Mietzner, T.A. (2011). Jawetz, Melnick y Adelberg Microbiología médica (25° ed.). Mexico DF, Mexico: MCGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A.
- Chacón, A.V. (2014). Evaluación in vitro de la actividad antifúngica contra *Moniliophthora roreri*, de extractos obtenidos de *Justicia secunda* Vahl. Universidad Industrial de Santander.
- Dominguez, I.M. (2020). Justicia secunda Valh, especie utilizada en la Medicina Indígena colombiana. Universidad de Sevilla. España. Recuperado de https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/103953/DOMINGUEZ%20A_RAGON%20ISABEL.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Escobar, M.S. y Flores, J.C. (2019). Estudio preclínico normo-glucemiante de los extractos de las hojas de insulina (*Justicia secunda* Vahl) en ratones. Universidad de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador.
- Herbario GUAY: Facultad de Ciencias Naturales. (2015). Herbarioa GUAY. Guayaquil: Universidad Estatal de Guayaquil.
- Herrera, H., Rosas, A. y Crescente, O. (2002). Actividad biológica de “Sanguinaria” (*Justicia secunda*) extractos. Rev. Biología Farmacéutica. 3: 206 – 212.
- Kitadi, J.M., Lengbiye, E.M., Gbolo, B.Z., Inkoto, Cl.L., Muanyishay, Chr.L., Lufuluabo, G.L., Tshibangu, D.S.T., Tshilanda, D.D., Mbala, Bl.M., Ngbolua, K.N. y Mpiana, P.T. (2019). Justicia secunda Especies de Vahl: Fitoquímica, Farmacología y direcciones futuras: una mini revisión. DOI: 10.15562/phytomedicine.2019.93
- Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller, M. (2014). Microbiología Médica Murray. Sétima ed: Mosby (Elsevier Science).
- Oluwatimilehin P., Bayonle M., Lanre O. y Oduola I. (2020). Evaluación de la micromorfología foliar, fitoquímica y composición mineral de las hojas de Justicia secunda Valh. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.6018/analesbio.42.20>
- Onochie, A.U., Oli, A.H., Oli, A.N., Ezeigwe, O.C., Nwaka, A.C., Okani, Ch.O. Okam, P.C., Ihekwereme, Ch.P. y Okoyeh, J.N. (2020). Los efectos farmacobioquímicos del extracto de etanol de las hojas de Justicia secunda Vahl en Rattus Norvegicus. Rev. Journal of Experimental Pharmacology.12: 423 – 437. DOI: 10.2147/JEP.S267443
- Onoja, S.O., Ezeja, M.I., Omeh, Y.N. y Onwukwe, B.C. (2017). Antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive activities of methanolic extract of *Justicia secunda* Vahl. Rev. Alexandria Journal of Medicine. 53(3): 207 - 213.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). (2018). Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo. Recuperado de

<https://www.who.int/mediacentre/news/releases/2018/antibiotic-resistance-found/es/>

- Picazo, J.J. (2020). Procedimientos en microbiología clínica: Métodos básicos para el estudio de la sensibilidad a los antimicrobianos. Recuperado de <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia11.pdf>
- Romanus, U., Imoh, J., Omodot, U., Anwanabasi, U., Anah, V. . y Love, O. (2020). Evaluación farmacognóstica de las hojas y tallos de *Justicia secunda* Vahl. (Acanthaceae). Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/344333194>
- Sosa, J.A. (2015). Efecto antibacteriano in vitro del extracto alcohólico de *Rosmarinus officinalis* (romero) y del agua ozonizada sobre *Streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis*. Universidad Señor de Sipán. Pimentel – Perú. Recuperado de <http://repositorio.uss.edu.pe/bitstream/handle/uss/129/tesis%20final%20josue%2025-11-2015.pdf;jsessionid=C44D8285E9CA75D7B5EC7AF426C394E0?sequence=1>
- Winn, W.C., Allen, S.D., Janda, W.M., Koneman, E.W., Procop, G.W., Schreckenberger, P.C. y Woods, G.L. (2008). Koneman. Diagnóstico microbiológico. Texto y Atlas en color (6° ed.). Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Zambrano, P. y Bustamante, K.E. (2017). Caracterización y estudio fitoquímico de *Justicia secunda* valh (Sanguinaria, singamochilla, Insulina) Rev. Cubana de Plantas Medicinales. 22(1).
- Zambrano, P. y Bustamante, K.E. (2017). Caracterización y estudio fitoquímico de *Justicia secunda* valh (Sanguinaria, singamochilla, Insulina). Rev. Cubana de Plantas Medicinales. 22(1).

12. Anexos y apéndices

12.1. Anexos

Anexo B: Instrumento - Ficha técnica de análisis de laboratorio para *E. coli*.

| N° de placa Petri | Actividad antibacterial de las diluciones de <i>Justicia secunda</i> frente a <i>E. coli</i> | | | | | | Amoxicilina * Ácido clavulánico/ <i>E.coli</i> | |
|-------------------|--|-----------|-------------|-----------|----------------|-----------|--|-----------|
| | Hidráulica | | etanólica | | hidroetanólica | | N° de Disco | Halo (mm) |
| | N° de Disco | Halo (mm) | N° de Disco | Halo (mm) | N° de Disco | Halo (mm) | | |
| 1 | 1 | | 1 | | 1 | | 1 | |
| | 2 | | 2 | | 2 | | 2 | |
| | 3 | | 3 | | 3 | | 3 | |
| | 4 | | 4 | | 4 | | 4 | |
| | 5 | | 5 | | 5 | | 5 | |
| 2 | 6 | | 6 | | 6 | | 6 | |
| | 7 | | 7 | | 7 | | 7 | |
| | 8 | | 8 | | 8 | | 8 | |
| | 9 | | 9 | | 9 | | 9 | |
| | 10 | | 10 | | 10 | | 10 | |
| 3 | 11 | | 11 | | 11 | | 11 | |
| | 12 | | 12 | | 12 | | 12 | |
| | 13 | | 13 | | 13 | | 13 | |
| | 14 | | 14 | | 14 | | 14 | |
| | 15 | | 15 | | 15 | | 15 | |
| \bar{x} | | \bar{x} | | \bar{x} | | \bar{x} | | |

Anexo B: Instrumento - Ficha técnica de análisis de laboratorio para *S. aureus*.

| N° de placa Petri | Actividad antibacterial de las diluciones de <i>Justicia secunda</i> frente a <i>S. aureus</i> | | | | | | Amoxicilina * Ácido clavulánico/ <i>S. aureus</i> | |
|-------------------|--|-----------|-------------|-----------|----------------|-----------|---|-----------|
| | Hidráulica | | etanólica | | hidroetanólica | | | |
| | N° de Disco | Halo (mm) | N° de Disco | Halo (mm) | N° de Disco | Halo (mm) | N° de Disco | Halo (mm) |
| 1 | 1 | | 1 | | 1 | | 1 | |
| | 2 | | 2 | | 2 | | 2 | |
| | 3 | | 3 | | 3 | | 3 | |
| | 4 | | 4 | | 4 | | 4 | |
| | 5 | | 5 | | 5 | | 5 | |
| 2 | 6 | | 6 | | 6 | | 6 | |
| | 7 | | 7 | | 7 | | 7 | |
| | 8 | | 8 | | 8 | | 8 | |
| | 9 | | 9 | | 9 | | 9 | |
| | 10 | | 10 | | 10 | | 10 | |
| 3 | 11 | | 11 | | 11 | | 11 | |
| | 12 | | 12 | | 12 | | 12 | |
| | 13 | | 13 | | 13 | | 13 | |
| | 14 | | 14 | | 14 | | 14 | |
| | 15 | | 15 | | 15 | | 15 | |
| \bar{x} | | \bar{x} | | \bar{x} | | \bar{x} | | |

Anexos C: Ficha Técnica de Observación Bibliográfico.

| Nº | Título de la investigación | Autor | Año | Información Relevante Encontrada |
|-----------|-----------------------------------|--------------|------------|---|
| 1 | | | | |
| 2 | | | | |
| | | | | |
| 3 | | | | |
| 4 | | | | |
| 5 | | | | |
| 6 | | | | |
| 7 | | | | |
| 8 | | | | |
| 9 | | | | |
| 10 | | | | |

Anexo D: Matriz de consistencia de la investigación.

| PROBLEMA | HIPÓTESIS | OBJETIVOS | METODOLOGÍA | POBLACIÓN Y MUESTRA |
|---|--|--|--|---|
| <p>¿Las diferentes diluciones de <i>Justicia secunda</i>, tienen actividad antibacterial, frente a cultivos “in vitro” de bacterias G⁺ (<i>Staphylococcus aureus</i>), y bacterias G⁻ (<i>Escherichia coli</i>) Piura – 2021?</p> | <p>Las diferentes diluciones de <i>Justicia secunda</i>, tienen actividad antibacterial, frente a cultivos “in vitro” de bacterias G⁺ (<i>Staphylococcus aureus</i>) y bacterias G⁻ (<i>Escherichia coli</i>), Piura – 2021.</p> | <p>1. OBJETIVO GENERAL</p> <p>Determinar la actividad antibacterial a diferentes diluciones de las hojas de <i>Justicia secunda</i>, frente a cultivos “in vitro” de bacterias G⁺ (<i>Staphylococcus aureus</i>) y bacterias G⁻ (<i>Escherichia coli</i>) Piura – 2021.</p> <p>2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) Determinar la actividad antibacterial de las diluciones a diferentes concentraciones de las hojas de <i>Justicia secunda</i> y amoxicilina/ácido clavulánico, frente a cultivos “in vitro” de bacterias G⁺ (<i>Staphylococcus aureus</i>) y bacterias G⁻ (<i>Escherichia coli</i>). 2) Identificar la dilución de justicia secunda que tiene mayor actividad antibacterial, frente a cultivos “in vitro” de bacterias G⁺ (<i>Staphylococcus aureus</i>) y bacterias G⁻ (<i>Escherichia coli</i>). 3) Identificar la bacteria que presenta mayor sensibilidad a la actividad antibacterial de las diferentes diluciones de las hojas de <i>Justicia secunda</i>. 4) Comparar la actividad antibacterial de las diluciones de las hojas de Justicia secunda y amoxicilina/ácido clavulánico, frente a cultivos “in vitro” de bacterias G⁺ (<i>Staphylococcus aureus</i>) y bacterias G⁻ (<i>Escherichia coli</i>). | <p>1. Tipo de Investigación</p> <p>El presente estudio es de tipo Analítico, Prospectivo.</p> <p>2. Diseño de Investigación</p> <p>El estudio tiene un diseño experimental, experimental puro.</p> | <p>1. POBLACIÓN</p> <p>La población de estudio estará representada por las cepas bacterianas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> adquirida en un laboratorio certificado.</p> <p>2. MUESTRA</p> <p>La muestra del estudio, es una muestra no probabilística (no randomizado), es decir que la investigadora la eligió a criterio y conveniencia propia. Dicha muestra estará representada por 42 placas Petri, de ellas 21 inoculadas con <i>Escherichia coli</i> y 21 inoculadas con <i>Staphylococcus aureus</i>.</p> |

Anexo E: Evidencias fotográficas



Foto 1: cultivo de planta de *Justicia secunda*.



Foto 2: Hojas recolectadas de *Justicia secunda*, para su posterior desecación.



Foto 3: Trituración de las hojas secas de *Justicia secuda*.



Foto 4: Pesado de las hojas de *Justicia secuda* para las respectivas diluciones.



Foto 05: Preparación de las diluciones



Foto 6: Diluciones: hidrónica, etanólica e hidroetanólica



Foto 7: Filtrado de las diluciones.



Foto 8: Filtrado de las diluciones



Foto 9: Preparación de caldo nutritivo para la activación de las bacterias certificadas *E.coli* y *S.aureus*.



Foto 10: Bacterias certificadas *E. coli* y *S. aureus* liofilizadas.

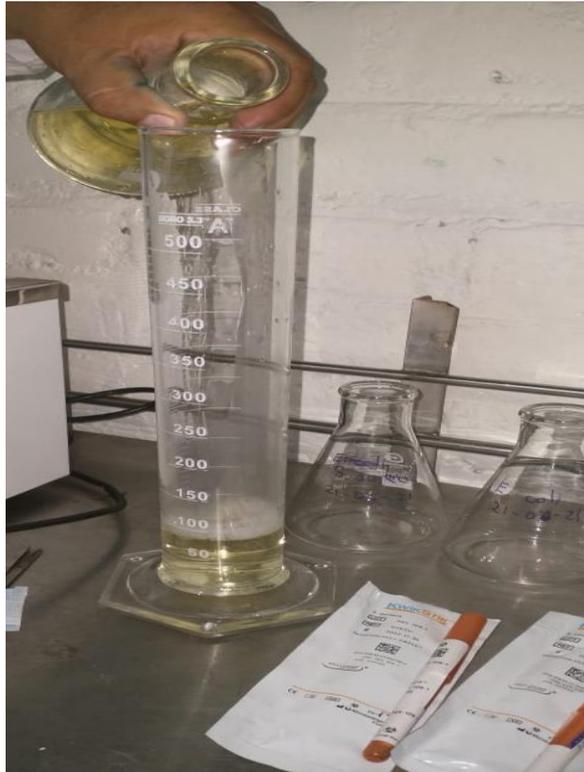


Foto 11: Activación de bacterias: *E.coli* y *S.aureus*



Foto 12: Incubación de bacterias a una temperatura de 37 °C por un tiempo de 24 horas.



Foto 13: Preparacion de medios de cultivo: Agar Mueller Hinton y Sal Manitol

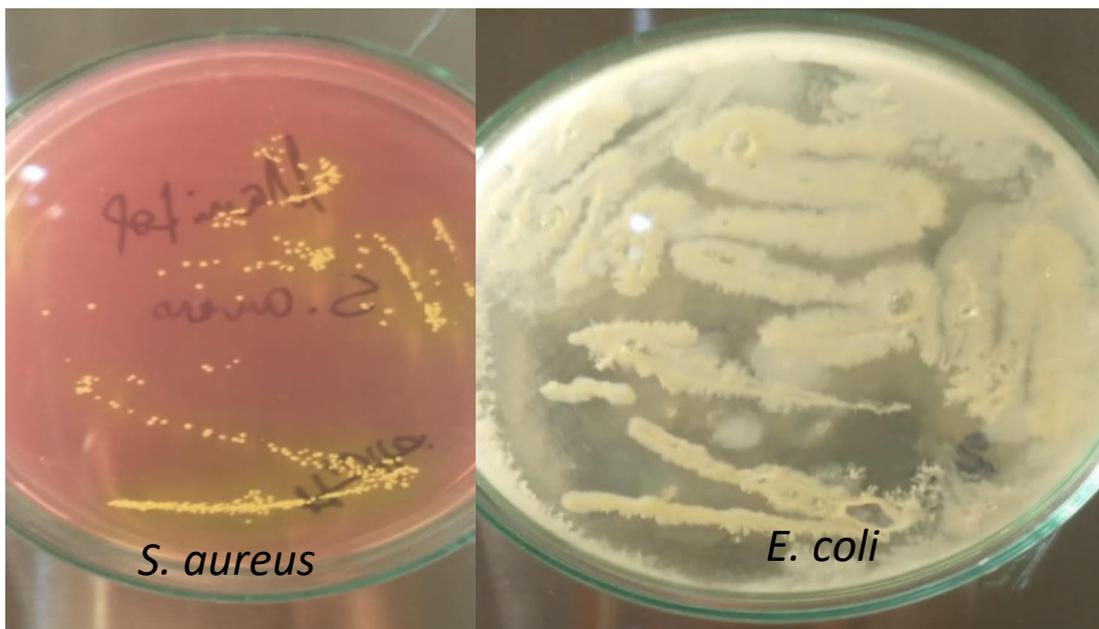


Foto 14: Crecimiento bacteriano como control.



Foto 15: Inoculación de bacterias en su respectivo agar.



Foto 16: Siembra de bacterias en agar.



Foto 17: Acondicionamiento de los discos de inhibición en los tratamientos respectivos.



Foto 18: Diluciones, farmaco y discos de inhibición.



Foto 19: Acondicionamiento de los discos de inhibición en las placas Petri inoculadas.

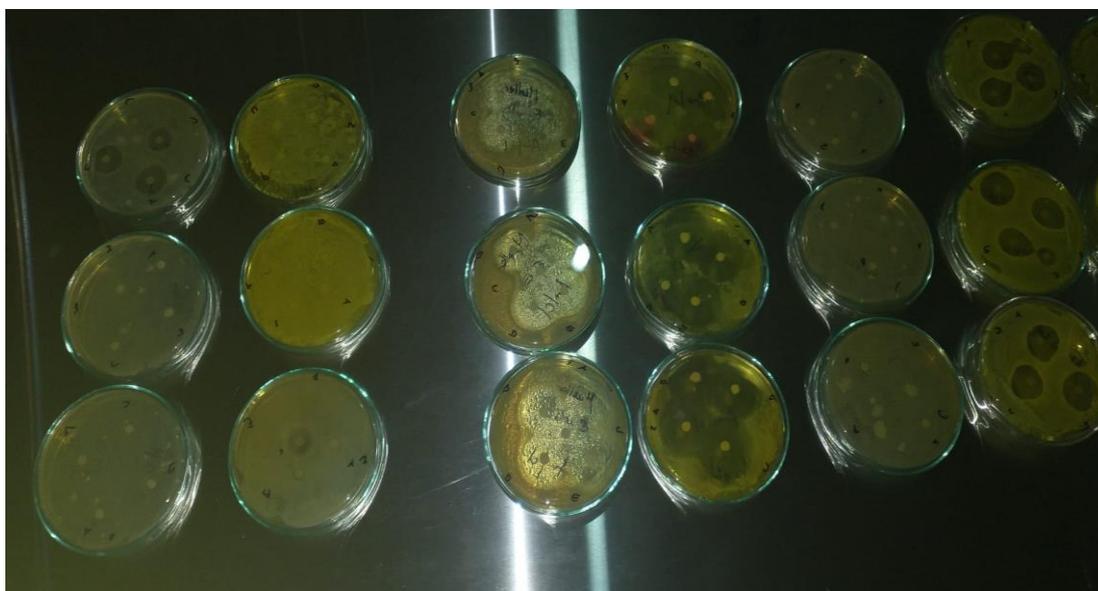
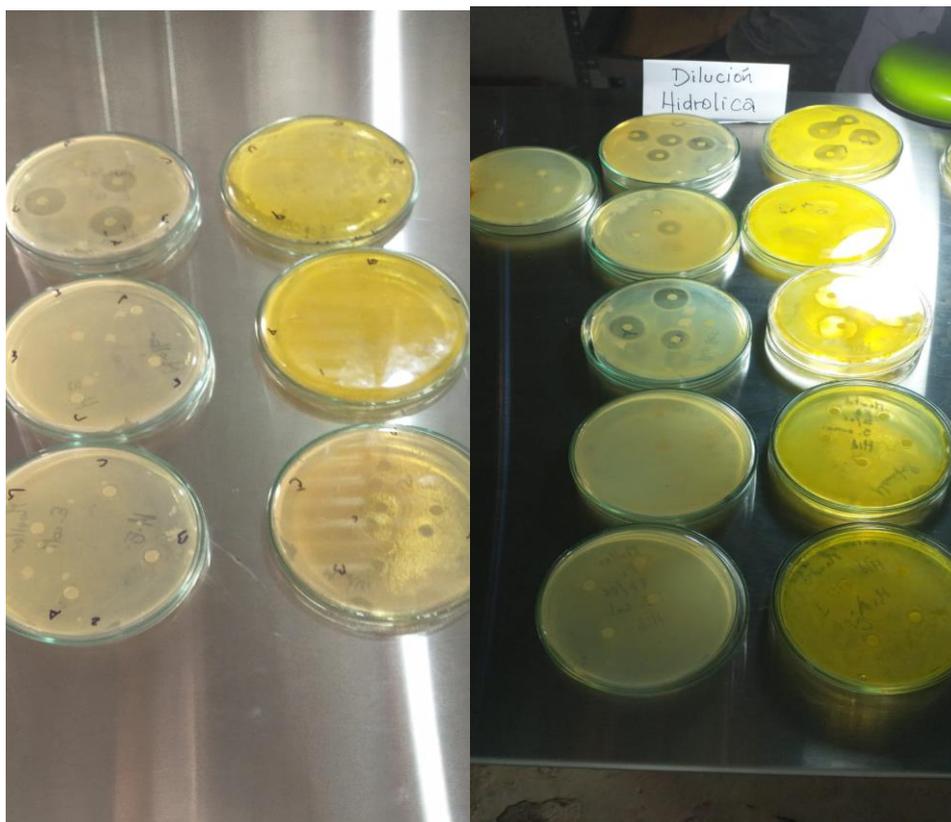


Foto 20: Actividad antibacterial de las diluciones de *J. secunda* y Amoxicilina + Ac. Clavulánico.



Foto 21: Recojo de los datos

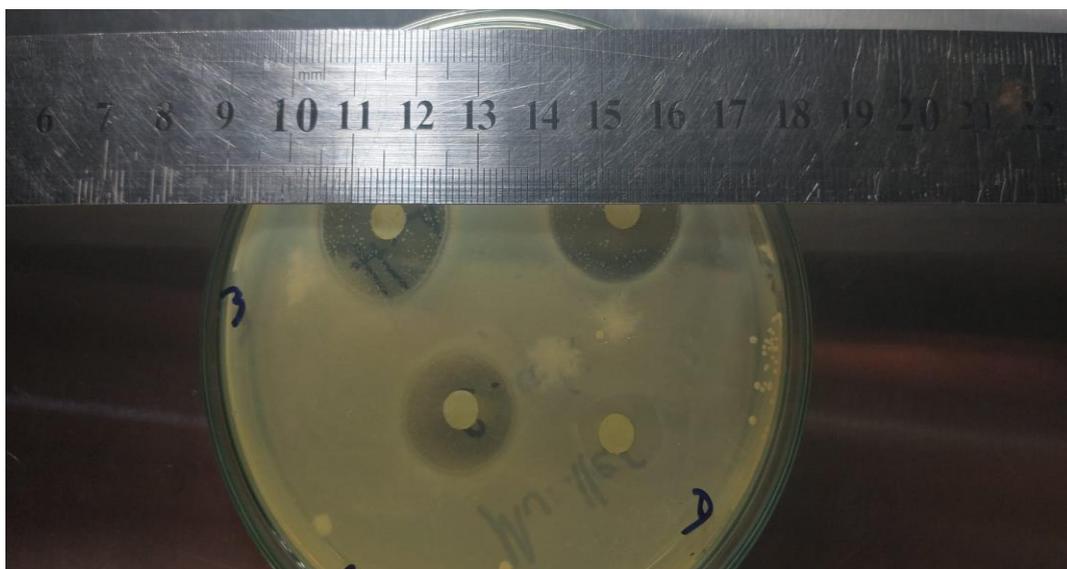


Foto 22: Medición de los halos de inhibición de la dilución de las hojas de *J secunda*.

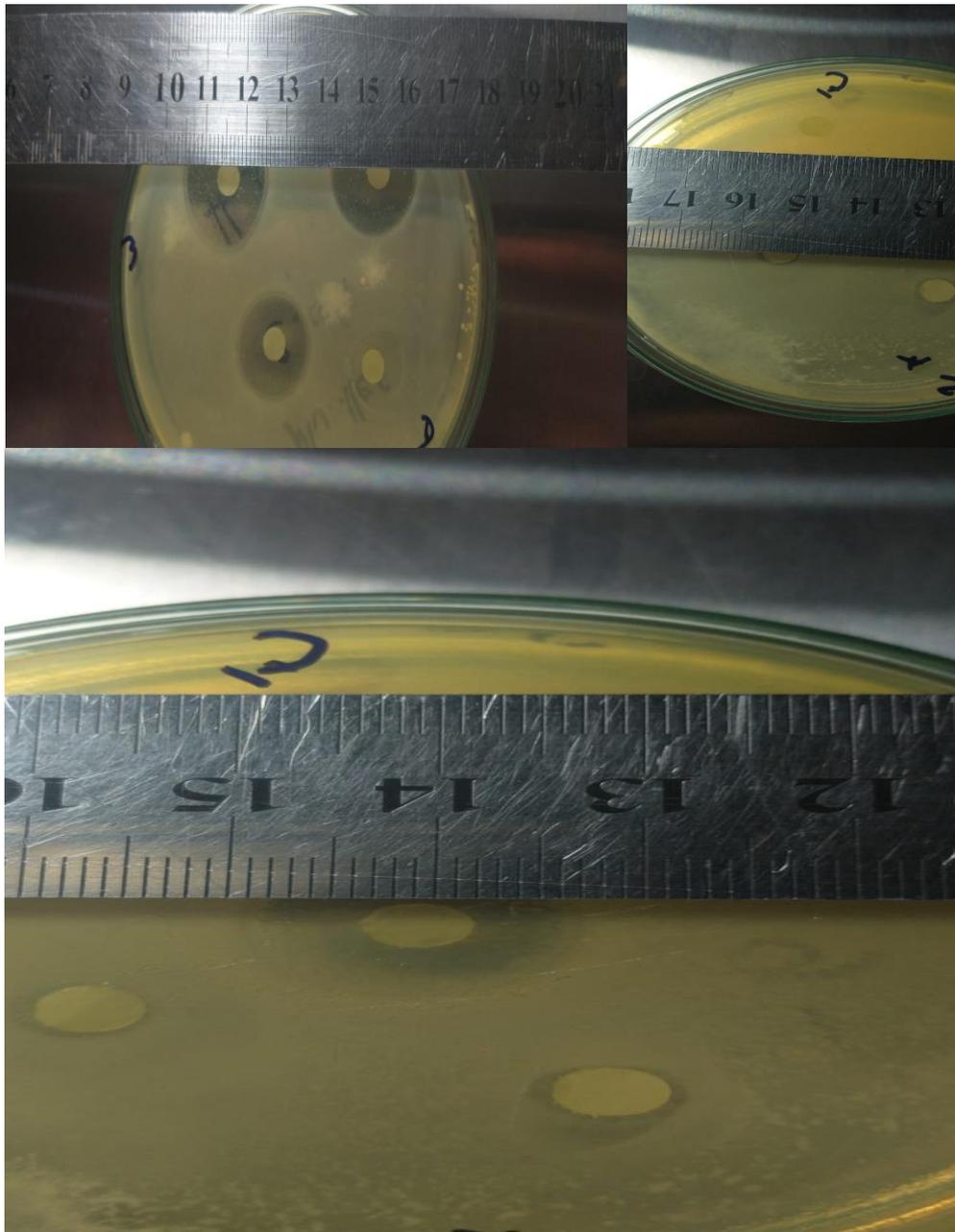
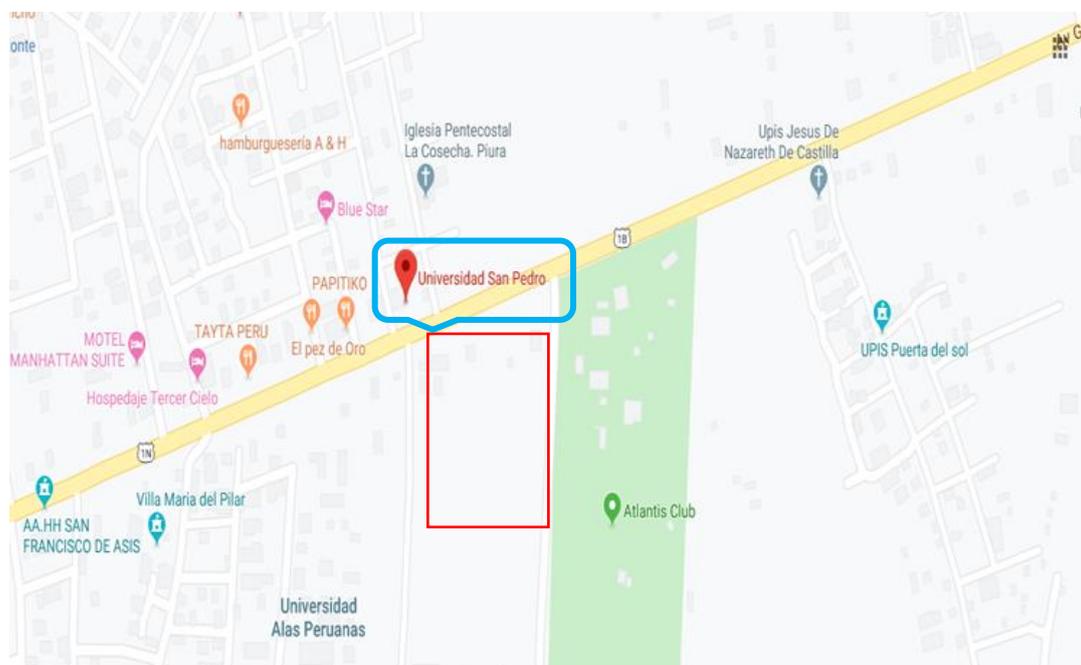
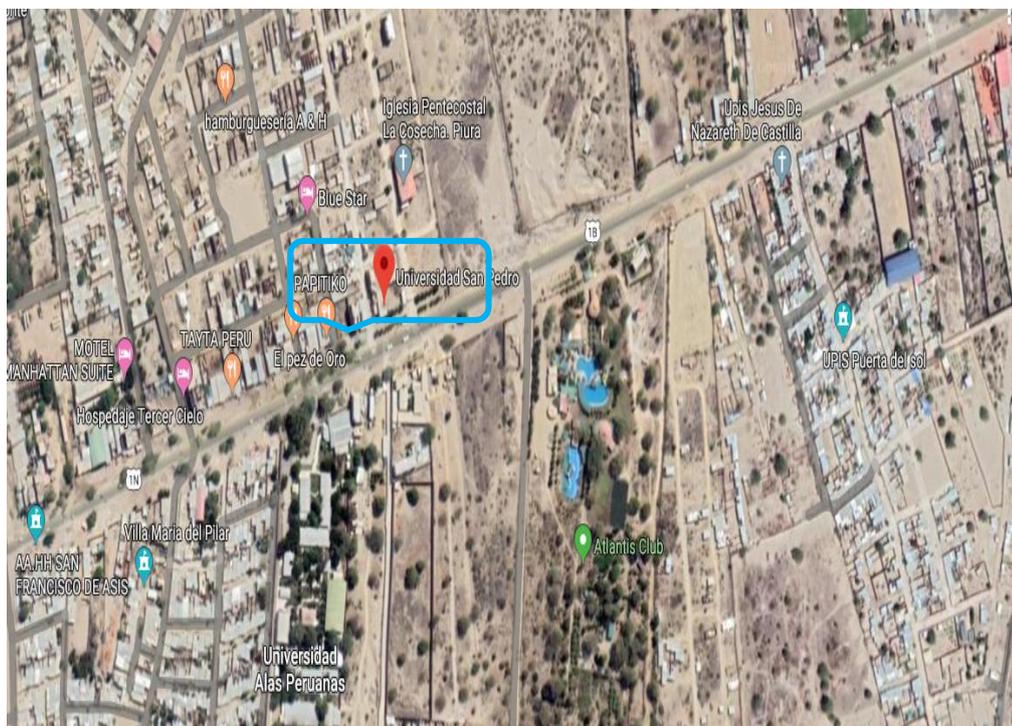


Foto 23: Toma de medidas de los halos de inhibición.

12.2. Apéndices

Apéndice A: Zona de estudio.



Fuente: Google Maps.

Apéndice B: Viales de bacterias *E. coli* y *S. aureus*.



Paquete de 2 KWIK-STIK™

No. de catalogo 0335P

Escherichia coli derivada de ATCC® 25922™ *



| Información general | |
|-----------------------------------|--|
| Nivel de bioseguridad | 1 |
| Formato del producto | Paquete de 2 KWIK-STIK™ |
| Características de la deformación | Control CLSI y EUCAST para pruebas de susceptibilidad antimicrobiana |
| Método de prueba | Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, pruebas de medios, identificación microbiana |
| Número WDCM | 00013 |
| Numero de catalogo | 0335 |
| Estándares y guías | Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI), Agencia de Protección Ambiental (EPA), Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST), Manual Analítico Bacteriológico de la FDA (BAM), ISO 11133, Departamento de Agricultura de EE. UU. (USDA) |
| Taxonomía | Bacterias |
| Tipo de industria | Cannabis, Clínica, Seguridad alimentaria, Agua y Medio ambiente |
| Código de precio | Pensilvania |



Paquete de 2 KWIK-STIK™

No. de catalogo 0365P

Staphylococcus aureus subsp. aureus derivado de ATCC® 29213™ *



Información general

Nivel de bioseguridad 2

Formato del producto Paquete de 2 KWIK-STIK™

Características de la deformación mecA negativo
Cepa productora de beta-lactamasa débil Cepa EUCAST QC sensible a oxacilina para difusión en disco CLSI y cepa EUCAST QC para determinación de MIC

Método de prueba Pruebas de susceptibilidad antimicrobiana, identificación microbiana

Número WDCM 00131

Numero de catalogo 0365

Estándares y pautas Instituto de Estándares de Laboratorio Clínico (CLSI), Comité Europeo de Pruebas de Sensibilidad Antimicrobiana (EUCAST)

Taxonomía Bacterias

Tipo de industria Clínico

Código de precio Pensilvania