

**UNIVERSIDAD PRIVADA DE HUANCAYO
“FRANKLIN ROOSEVELT”**

RESOLUCIÓN DEL CONSEJO DIRECTIVO NRO 078-2019-SUNEDU/SD

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

**ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y
BIOQUÍMICA**



TESIS:

**“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO “*in vitro*” DEL
EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Passiflora ligularis* (granadilla)
FRENTE A CEPAS DE *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*.”**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO**

Presentado por:

**Bach. Billy Karl Ojeda Vergara
Bach. Diego Jesús Yauri Velarde**

ASESOR:

Mg. CANO PEREZ, Carlos Alfredo

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Recursos Naturales

**HUANCAYO – PERÚ
2021**

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi corazón a Dios por su grandeza, amor infinito, darme la vida y salud, a mi esposa, hijos, padres, hermanos por brindarme su apoyo incondicional todos estos años, fortaleza y sus constantes consejos de superación.

Billy

Mi tesis la dedico a Dios por darme vida y salud, a mi abuelo en paz descanse y mi abuela que dio todo por mí para salir adelante.

Diego

AGRADECIMIENTO

Al haber concluido esta etapa profesional nuestro agradecimiento es a DIOS, a nuestro asesor Mg. Cano Pérez con su apoyo y sabiduría que constituyen la base de mi vida profesional.

Agradecemos también a nuestros compañeros y amigos por compartir momentos inolvidables y mi gratitud a la Universidad de Huancayo, Escuela de Farmacia y Bioquímica.

Página del jurado

PRESIDENTE:

DRA. MONICA EVENCIA POMA VIVAS

MIEMBRO SECRETARIO:

Mg. Q.F. JULIO LUIS DIAZ URIBE

MIEMBRO VOCAL:

Mg. Q.F. CARLOS ALFREDO CANO PEREZ

MIEMBRO SUPLENTE:

Mg. Q.F. ROCIO JERONIMA LOPEZ CALDERON

Declaratoria de Autenticidad

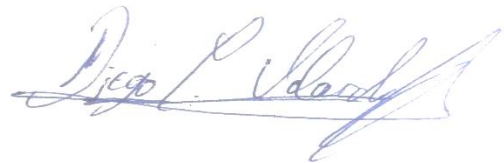
Nosotros, **OJEDA VERGARA, Billy Karl** con **DNI 70859966** y **YAURI VELARDE, Diego Jesús** con **DNI 73327726**, tesistas de la Universidad Privada de Huancayo Franklin Roosevelt, con la tesis titulada: **“EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO “in vitro” DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Passiflora ligularis* (granadilla) FRENTE A CEPAS DE *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*.”**, para obtener el título profesional de químico farmacéutico. **DECLARAMOS BAJO JURAMENTO QUE TODA LA INFORMACION PRESENTADA ES AUTENTICA Y VERAZ**, afirmamos y nos rectificamos en lo expresado en señal de la cual firmamos el presente documento.

En este sentido somos conscientes de encontrar uso de material intelectual ajeno son el debido reconocimiento de su fuente o autor, nos sometemos a las sanciones que determine el procedimiento disciplinario.

01 de diciembre del 2021



Bach. OJEDA VERGARA BILLY KARL



Bach. YAURI VELARDE DIEGO JESUS

INDICE

DEDICATORIA.....	2
AGRADECIMIENTO	3
PÁGINA DEL JURADO	4
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD	5
INDICE	6
RESUMEN	10
ABSTRACT	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
II. MÉTODO.....	20
2.1 TIPO Y DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	20
2.2 OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	20
2.3 POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO	21
2.4 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS, VALIDEZ Y CONFIABILIDAD	21
2.5 PROCEDIMIENTO	22
2.6 MÉTODO DE ANÁLISIS DE DATOS.....	23
III. RESULTADOS	25
IV. DISCUSIÓN.....	32
V. CONCLUSIONES.....	34
VI. RECOMENDACIONES.....	35
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS	39

Índice tablas

Tabla 1: Identificación de los metabolitos secundarios de <i>Passiflora ligularis</i> (granadilla)	25
Tabla 2: Resultados del ensayo microbiológico del extracto de <i>Passiflora ligularis</i> frente a <i>S. aureus</i>	25
Tabla 3: Resultados del ensayo microbiológico del extracto de <i>Passiflora ligularis</i> frente a <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i>	26
Tabla 4: Test de Levene a los resultados de los ensayos microbiológicos.	27
Tabla 5: Comparaciones múltiples por el T3 de Dunnett para los ensayos microbiológicos del extracto acuoso de hojas de <i>Passiflora ligularis</i> frente a las cepas bacterianas <i>S aureus</i> , <i>E. coli</i> y <i>P. aeruginosa</i>	27
Tabla 6: Prueba de Kruskal Wallis a los resultados de los ensayos microbiológicos	28
Tabla 7: Comparaciones múltiples por el T3 de Dunnett del ensayo microbiológico frente a <i>S aureus</i>	29
Tabla 8: Comparaciones múltiples por el T3 de Dunnett para los ensayos microbiológicos del extracto acuoso de hojas de <i>Passiflora ligularis</i> frente a las cepas bacterianas <i>E. coli</i> .30	
Tabla 9: Comparaciones múltiples por el T3 de Dunnett para los ensayos microbiológicos del extracto acuoso de hojas de <i>Passiflora ligularis</i> frente a las cepas bacterianas <i>P.aeruginosa</i>	31

Índice de figuras

Figura 1: halos de inhibición evidenciados por el extracto acuoso de hojas de <i>Passiflora ligularis</i> (granadilla) al 25, 50 y 70% frente al control negativo del ensayo microbiológico contra la cepa bacteriana de <i>S. aureus</i>	49
Figura 2: Ensayos microbiológicos del extracto acuoso de hojas de <i>Passiflora ligularis</i> frente a las cepas bacterianas <i>E. coli</i>	50
Figura 3: Ensayos microbiológicos del extracto acuoso de hojas de <i>Passiflora ligularis</i> (granadilla) frente a las cepas bacterianas <i>P. aeruginosa</i>	50
Figura 4: ACTIVACIÓN DE LA CEPA Y PREPARACIÓN DEL INOCULO DE TRABAJO	74
Figura 5: PREPARACIÓN DE POZOS EN PLACAS.....	74
Figura 6: MEDICIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN.....	75

Índice de anexos

ANEXO 1: M A T R I Z DE CONSISTENCIA.....	39
ANEXO 2: VARIABLES	41
ANEXO 3: Cuadro de recolección de resultados del Tamizaje Fitoquímico del extracto acuoso.....	42
ANEXO 4: Ficha de recolección de datos para la evaluación del efecto antimicrobiano ...	43
ANEXO 5: CUADRO DE REGISTRO DE DATOS DE TAMAÑOS DE HALO DE INHIBICIÓN PRODUCIDOS EN CEPAS DE Escherichia coli ATCC 25923	44
ANEXO 6: Ficha de validación del instrumento de recolección de datos	45
ANEXO 7: BASE DE DATOS 1	46
ANEXO 8: BASE DE DATOS 2	51
ANEXO 9: JUCIO DE EXPERTOS.....	55
ANEXO 10: CONSTANCIA BOTANICA	65
ANEXO 11: CERTIFICADO DE CALIDAD DE CIPROFLOXACINO	66
ANEXO 12: CERTIFICADO DE CALIDAD DE OXACILINA.....	67
ANEXO 13: CERTIFICADO DE CALIDAD DE Escherichia coli ATTC 11775	68
ANEXO 14: CERTIFICADO DE CALIDAD DE Pseudomonas aeruginosa ATTC 9027.70	
ANEXO 15: CERTIFICADO DE CALIDAD DE Staphylococcus aureus ATTC 25923...72	
ANEXO 16: EVIDENCIAS DEL TRABAJO DE CAMPO	74

RESUMEN

Passiflora ligularis (granadilla) es una planta en la cual se le atribuyen distintas propiedades, entre los cuales, nos encontramos con su poder antimicrobiano en el cual fue puesto a prueba utilizando 3 bacterias con gran poder para obtener resistencia a los antimicrobianos.

Objetivo: El extracto acuoso de las hojas de *Passiflora ligularis* (granadilla) presenta actividad antimicrobiana frente a *E.coli*, *P.aeruginosa* y *S.aureus*.

Método: El tipo de investigación realizada fue aplicada, prospectiva con un diseño experimental con dos grupos control (negativo y positivo), la población correspondió a *Passiflora ligularis* (granadilla) recolectado en el distrito de Huachipa, provincia de Lima, departamento de Lima, para el estudio se utilizó 500 gr de hojas secas, las que se molieron en agua y en agitación continua durante 1 hora a 40 °C donde luego se determinó la actividad antimicrobiana utilizando el método de Kirby-Bauer.

Resultados: Se encontró que el extracto acuoso de las hojas de *Passiflora Ligularis* (granadilla) tiene una diferencia estadísticamente significativa menos a 0.05 entre los halos de inhibición frente a *S. aureus*, y no existe halo de inhibición alguna mayor a 0.05 de *Passiflora Ligularis* (granadilla) al 25%, 50% y 70% frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*; por otro lado, grupos control positivo Ciprofloxacino muestran halos de inhibición con un promedio de 38.13 y 49.35 mm frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*, respectivamente.

Conclusión: El extracto acuoso de hojas de la *Passiflora ligularis* (granadilla) presenta actividad antimicrobiana frente a las cepas de *S aureus*.

Palabras clave: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, extracto acuoso, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

Passiflora ligularis (granadilla) is a plant in which different properties are attributed, among which, we find its antimicrobial power in which it was put to the test using 3 bacteria with great power to obtain antimicrobial resistance.

Objective: The aqueous extract of the leaves of *Passiflora ligularis* (granadilla) shows antimicrobial activity against *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*.

Method: The type of research carried out was applied, prospectively with an experimental design with two control groups (negative and positive), the population corresponded to *Passiflora ligularis* (granadilla) collected in the district of Huachipa, province of Lima, department of Lima, to The study used 500 gr of dry leaves, which were ground in water and in continuous agitation for 1 hour at 40 ° C where then the antimicrobial activity was determined using the Kirby-Bauer method.

Results: It was found that the aqueous extract of the leaves of *Passiflora Ligularis* (granadilla) has a statistically significant difference of less than 0.05 between the inhibition halos against *S. aureus*, and there is no inhibition halo greater than 0.05 of *Passiflora Ligularis* (granadilla) at 25%, 50% and 70% against *E. coli* and *P. aeruginosa*; on the other hand, Ciprofloxacin positive control groups show inhibition halos with an average of 38.13 and 49.35 mm against *E. coli* and *P. aeruginosa*, respectively.

Conclusion: The aqueous extract of leaves of the *Passiflora ligularis* (granadilla) shows antimicrobial activity against *S. aureus* strains.

Key words: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, aqueous extract, antimicrobial activity.

I. INTRODUCCIÓN

La *Passiflora ligularis* (granadilla) es desarrollada en altitudes desde los 200 msnm hasta los 3000 msnm, en la actualidad, los centros de producción en el Perú son: costa norte, sierra sur y la selva central. El área cultivada a nivel nacional está promediada en 12,000 hectáreas. Se entiende que son 17 de las 25 regiones del Perú que están produciendo granadilla, concluyendo que a nivel nacional la producción de granadilla es 14,000 TM/año aproximadamente. (1) La granadilla es una fruta en alto contenido en calorías, fósforo, vitamina C y niacina, recomendada por médicos pediatras para recetarlas en la dieta de los niños, desde recién nacidos y la medicina moderna recomienda el consumo hasta la tercera edad debido a que la granadilla posee propiedades terapéuticas. (2) Estudios recientes mostraron que las partes herbáceas (hojas y flores) de este género poseen propiedades bioactivas y farmacológicas altamente efectivas. (3) Y que su efecto antimicrobiano está estrechamente ligado a estas.

Por otra parte, debido al desarrollo y la comercialización en masa de los antibióticos, las bacterias patógenas y no patógenas han desarrollado resistencia a los antibióticos desde el siglo pasado. Debido a ello, su control debe ser priorizado ya que constituye una amenaza para todas las naciones, sin reparar en su territorio y situación económica. (4) Es por ello, que se recurre a un tratamiento por medio de la medicina tradicional, esencialmente de materias vegetales.

Entre las bacterias más patógenas y comunes están la *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, y otros causantes de muchas enfermedad y mortalidad humana, causando infecciones tales como el tétanos, la fiebre tifoidea, la difteria, la sífilis, el cólera, intoxicaciones alimentarias, etc.

El objetivo de este estudio fue establecer el potencial antimicrobiano del extracto acuoso obtenido de la hojas de *P. ligularis*, demostrando su efectividad mediante la comparación con un fármaco específico.

Pseudomonas aeruginosa y *Staphylococcus aureus* son bacterias que tiene gran capacidad de provocar una infección en el organismo del humano. (1) Los fármacos que se encuentran en primera línea los cuales son usados para tratar las infecciones generadas por estas bacterias son cada vez menos eficaces, ya que estos microorganismos han desarrollado mecanismos de defensa para resistir el ataque de los fármacos. (2) La OMS considera al

microorganismo, *Staphylococcus aureus*, como elevada prioridad en la “Lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos”. (3) La bacteriemia es la infección generada por microorganismos que lograron ingresar al torrente sanguíneo. En países de altos recursos la reincidencia de bacteriemia por *Staphylococcus aureus* oscila entre el 10% – 30% de 100 000 personas al año. (4) La Organización Mundial de Salud asegura que existen *Staphylococcus aureus* que son resistentes a la meticilina en los continentes y la mayoría de países la incidencia es del 20% y en otros países llegaría hasta los 80%. (5) La mortalidad en los niños por infecciones de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina es de 14%. (6)

La incidencia de bacteriemia por *Staphylococcus aureus* en pacientes con VIH en Estados Unidos entre los años 2000-2004 es de 1960, de 17 000 pacientes con hemodiálisis en Irlanda entre los años 1998-2009, de 630 niños menores de 5 años en Gana y 33.9 Suizos en los años 2003-2004 por cada 100 000 por año. (7)

El *Staphylococcus aureus* es la segunda bacteria con mayor prevalencia de sepsis neonatal en el Perú. (8) Es considerada como uno de los principales patógenos aislados en hemocultivos y tracto respiratorio inferior en hospitales de seguro social en el Perú. (9) La infección de esta bacteria puede transformarse en sepsis, este a su vez puede acabar con la vida del paciente que la padece.

Pseudomonas aeruginosa presenta un fenómeno de resistencia a los antibióticos muy particular ya que muestra prácticamente todos los mecanismos enzimáticos y mutacionales conocidos en la resistencia bacteriana. (10) Desde el siglo pasado *Pseudomonas aeruginosa* se convirtió en el patógeno oportunista más importante, debido a su resistencia frente a los antibióticos y desinfectantes usados para eliminar a esta bacteria. (17)

La Organización Mundial de la Salud cataloga a la bacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, como una bacteria de prioridad crítica en la “Lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos”. (3) Un estudio de prevalencia en un Hospital del Perú evidenció que las infecciones más comunes son aquellas producidas por *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*. (11) *Pseudomonas aeruginosa* es responsable del 10 a 15 % de las infecciones nosocomiales en todo el mundo. (12)

El 10% de pacientes quemados sufren septicemias. (13) El 33.9 % de pacientes que sufren sepsis por *Pseudomonas aeruginosa* llegan a morir. (14) En el país la sepsis por *Pseudomonas aeruginosa* es una de las principales causas de muerte. (15)

Por lo mencionado anteriormente, las infecciones bacterianas producidas por *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, son consideradas un verdadero problema sanitario tanto en hospitales como en la comunidad, ya que existe una alta incidencia de bacterias resistentes a la terapia farmacológica convencional y por esto la Organización Mundial de la Salud considera importante la investigación de nuevos antibióticos para tratar estas enfermedades.

De esta información se toma como punto de partida el interés de investigar de manera experimental y científica las propiedades químicas y antimicrobianas de las hojas de la *Passiflora ligularis* (granadilla); siendo una importante opción ante dicho problema debido a los diversos antecedentes de esta especie y otras de la misma familia *Passiflora*.

A nivel nacional podemos citar a **Bussmann, R et al. (2008)** en un artículo titulado “ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF NORTHERN-PERUVIAN MEDICIANL PLANTS”. Evaluaron la actividad antibacteriana de 171 especies vegetales que son usadas en la medicina tradicional herbaría como antibacterianas y entre ellas *Passiflora ligularis* (granadilla) provenientes de Lambayeque, La libertad, Trujillo y Chiclayo. Las drogas vegetales usadas fueron desecadas y estas a su vez fueron maceradas con etanol e infusas en agua. El ensayo para evaluar la actividad antibacteriana en este estudio fue la técnica de Kirby-Bauer con discos de difusión en Agar Mueller Hinton. Los extractos etanólico y acuoso de *Passiflora ligularis* (granadilla) presentaron un halo de inhibición de 12 y 8 mm de diámetro en placas inoculadas con la bacteria *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Los autores concluyeron que los extractos etanólico y acuoso de *Passiflora ligularis* (granadilla) presentan actividad antibacteriana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. (16)

Salas, Franco (2016) en su artículo se recaudó muestras de hojas, botones florales tallos y frutos con síntomas de la enfermedad para la identidad del patógeno, fueron inducidas en cámara húmeda para aislar al hongo, en la prueba *in vitro* se prepararon los medios envenenados en PDA para determinar la formación o control del micelio del patógeno. Se

consiguíó dentro de los resultados al patógeno correspondiente al hongo *Colletotrichum sp.* El ANVA del crecimiento micelial de los patógenos, revela que hubo diferencias estadísticas significativas entre los 33 tratamientos; donde 7 fungicidas estadísticamente son iguales por controlar al patógeno y 3 fungicidas más el testigo, son diferentes por facultar el crecimiento del hongo en diferentes milímetros. (11)

Mendocilla, Laura (2012) en su artículo los frutos de maracuyá, piña y uva, se procesaron para la obtención de los mostos, luego de ser higienizados, suplementados y de rectificar sus valores de pH, se acondicionaron en tres biorreactores estériles y se añadió 2.3×10^9 cel./mL de *S. cerevisiae* MIT-L51. Al mismo instante se usó como testigo un biorreactor comprendido de caldo Sabouraud Sacaroso modificado, inoculado con la misma concentración celular. El desarrollo de *S. cerevisiae* MIT-L51 se calculó durante 180 horas de fermentación a 23 ± 1 °C, que se calculó mediante el recuento de unidades formadoras de colonias de levaduras por mililitro (UFC/mL). La velocidad de crecimiento se evaluó mediante regresión lineal. Se concluyó que *S. cerevisiae* MIT-L51, en la fermentación alcohólica, se desarrolla en una velocidad específica de 0.0952 h^{-1} en mostos de *Ananas comosus* “piña”, 0.0825 h^{-1} en mosto de *Vitis vinifera var. gross colman* “uva” y 0.0761 h^{-1} en mosto de *Passiflora edulis* “maracuyá” (12)

A nivel internacional podemos mencionar los trabajos de **Kannan S et al (2011)**. En una de sus investigaciones titulada “Antibacterial activity of *Passiflora ligularis*”. La planta usada en esta investigación se colectó en la India. Esta fue macerada con metanol y desecada hasta lograr un extracto metanólico. El extracto metanólico de la hoja de *Passiflora ligularis* Juss. y el compuesto aislado se utilizaron para determinar su actividad antibacteriana *in vitro* mediante la técnica de Kirby-Bauer con discos de difusión contra tres bacterias Gram positivas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus faecalis* y *Bacillus subtilis* y tres bacterias Gram negativas, *E. coli*, *Proteus vulgaris* y *Salmonella typhi*. Se evidenció que el compuesto aislado presentó mayor actividad antibacteriana *in vitro* en comparación con el extracto metanólico de la hoja de *Passiflora ligularis*, pero menos que el del fármaco estándar ciprofloxacino. (18)

Razia M et al (2014). En su artículo científico titulado “In Vitro ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF LEAF EXTRACT OF *passiflora ligularis*”. *Passiflora*

ligularis es una planta medicinal perteneciente a la familia *Passifloraceae* con varias propiedades etnomedicinales. En este estudio, se examinaron las hojas de *P. ligularis* para detectar la presencia de grupos fitoquímicos importantes. El tamizaje fitoquímico de la hoja de *P. ligularis* mostró la presencia de alcaloides, flavonoides, terpenoides, esteroides, compuestos fenólicos, glucósidos y glucósidos cardíacos. Se encontró que el contenido fenólico total medido por Folin-Ciocalteu fue de 27 mg GAE/g. La capacidad antioxidante del extracto de metanol se investigó en función de su capacidad para eliminar radicales libres estables (DPPH). En el ensayo DPPH, se encontró que el valor de IC₅₀ era 48 µg/ml. La actividad antibacteriana de *P. ligularis* se probó contra seis bacterias patógenas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Shigella flexneri* y *Salmonella typhimurium*. El extracto de metanol de *P. ligularis* (100 mg/ml) mostró una zona de inhibición máxima (16 mm) contra *P. aeruginosa*, *E. coli*. *S. flexneri* mostró menos zona de inhibición (12 mm). El extracto acuoso (100 mg/ml) mostró la zona máxima de inhibición (11 mm) contra *E. coli*. La actividad antimicrobiana reveló que el extracto de metanol mostró una actividad significativa que el extracto acuoso. (19)

Siebra A et al (2016) en su artículo: “POTENTIATION OF ANTIBIOTIC ACTIVITY BY *Passiflora cincinnata* Mast. FORNT OF STRAINS *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*”. El desarrollo de nuevos medicamentos a partir de plantas es un enfoque alternativo interesante para superar la resistencia microbiana. *Passiflora cincinnata* muestra resistencia a enfermedades y plagas y una mayor concentración de componentes químicos que pueden ser útiles en la industria farmacéutica. Investigamos la posible actividad antimicrobiana y modificadora de antibióticos de extractos hidroalcohólicos de hojas, tallos, corteza, pulpa y semillas de *P. cincinnata*. Los extractos se prepararon por homogeneización de material en etanol al 50%. La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó mediante el método de dilución en caldo, y las cepas bacterianas analizadas fueron *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. La actividad modificadora de antibióticos se evaluó contra las cepas *S. aureus* 03 y *E. coli* 08, utilizando una concentración sub inhibitoria del extracto. Los antibióticos probados fueron: amikacina, gentamicina, ampicilina, bencilpenicilina potásica y oxacilina. Los extractos no mostraron actividad antimicrobiana de relevancia clínica, donde la CIM fue igual o superior a 1024 µg / ml. *S. aureus* mostró 13 eventos, mientras que *E. coli* mostró solo 4 eventos. Entre estos eventos, 14 incluyeron actividad sinérgica, potenciando el efecto de los antibióticos, y solo 3 eventos demostraron una actividad

antagónica hacia la ampicilina. Los extractos hidroalcohólicos son agentes antimicrobianos potenciales cuando se combinan con fármacos convencionales poco utilizados en el tratamiento in vivo. (20)

Mazila et al (2020) En una investigación titulada “PASSION FRUIT (*Passiflora edulis*) PEEL POWDER EXTRACT AND ITS APPLICATION TOWARDS ANTIBACTERIAL AND ANTIOXIDAN ACTIVUTY ON THE PRESERVED MEAT PRODUCTS” Este estudio tuvo como objetivo explorar los compuestos antioxidantes y antibacterianos en las cáscaras de *P. edulis* e identificar la eficacia del extracto de cáscaras de *P. edulis* en la carne en conserva. En estos estudios de investigación, el compuesto antioxidante del extracto de muestra de la cáscara de *P. edulis* se determina utilizando flavonoides totales y contenido fenólico total, respectivamente. Se detectó un TPC de $7,273 \pm 0,002$ mg de GAE / g de extracto, mientras que se encontró significativamente un TFC de $8,364 \pm 0,002$ mg de QE / g de extracto. LC-QTOF_MS confirmó los compuestos fenólicos en el extracto de *P. edulis*. La capacidad antibacteriana del extracto de muestra se demuestra mediante la zona de inhibición observada en una placa de agar que contiene cuatro tipos de extracto de patógenos transmitidos por los alimentos que ejercen una fuerte actividad antibacteriana contra tres cepas probadas que fueron *E. coli*, *Serratia* y *Aureus*. La efectividad del extracto de muestra sobre el antioxidante de la carne se determina usando DPPH cuando el porcentaje de actividad depuradora es de hasta 13%, ABTS con 60%, ensayo de potencia reductora con 48% y metMY alcanza el porcentaje máximo que es 70% en el día 6. El valor de pH de carne marinada con extracto de muestra indicó que la carne es segura y no requiere consumo inmediato después de 9 días. En conclusión, el extracto de cáscaras de *P. edulis* puede considerarse un antioxidante y antibacteriano natural en la carne, así como un conservante de alimentos para la carne congelada. (29)

Narain et al (2021) En una investigación titulada “ANTIOXIDAN, ANTIMICROBIAL, ANALGESIC, ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIPYRETIC EFFECTS OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM *Passiflora* Species”. Este capítulo revisa el trabajo de investigación realizado para identificar y cuantificar compuestos bioactivos presentes en diferentes partes (pulpa, piel y semillas) de varias especies de *Passiflora*. La fruta de la pasión es rica en minerales (calcio y fósforo) y vitaminas, especialmente A, C, tiamina, riboflavina y niacina. También es una muy buena fuente de carotenoides, flavonoides, antocianinas y alcaloides. La investigación también revela el potencial de diferentes dosis de varios extractos aislados de las diferentes especies de *Passiflora* aplicados en diversas

aplicaciones farmacéuticas, tales como actividades antioxidantes, antimicrobianas, analgésicas, antinociceptivas, antiinflamatorias y antipiréticas causadas por compuestos flavonoides recientemente identificados en esa especie. La revisión presenta conocimientos actualizados sobre diferentes especies de *Passiflora* y su potencial para aplicaciones farmacéuticas. (21)

El estudio realizado se orienta a el aporte de nuevos conocimientos científicos de la composición química que tienen las hojas de la *Passiflora ligularis* “granadilla” partiendo de una explicación descriptiva de las evidencias científicas que permiten justificar esta investigación en el empleo de esta especie en la actividad antimicrobiana.

Se comprueba su actividad antimicrobiana frente a 3 bacterias que generalmente son comunes en la sociedad como son: *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa* en técnicas *in vitro* a distintas concentraciones lo cual podría generar nuevas alternativas de tratamiento contra las enfermedades producidas por estas bacterias que son importantes para la salud pública del Perú y el mundo.

Con el objetivo de obtener un resultado positivo esta planta podría representar un tratamiento más económico y una alternativa para evitar el aumento de la resistencia bacteriana.

Adicionalmente, el diseño metodológico empleado en la investigación, servirá de fuente referencial para otras investigaciones similares al propuesto. Así mismo el desarrollo de esta investigación ha permitido comprobar técnicas y procedimientos, que pueden mejorarse para investigaciones futuras

Con respecto a los enfoques conceptuales del estudio tenemos:

Antimicrobiano: sustancia capaz de matar o inhibir el crecimiento de un microorganismo.

In vitro: técnica realizada fuera de un organismo humano

Zona de inhibición: se forma alrededor de un disco indicando que no hubo crecimiento bacteriano.

El problema general del estudio es:

¿El extracto acuoso de las hojas de la granadilla (*Passiflora ligularis*) tendrá actividad antimicrobiana frente a las cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*?

Problemas específicos

- ¿Cuáles son los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de las hojas de la granadilla (*Passiflora ligularis*)?

- ¿Cuál es el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de las hojas de la granadilla (*Passiflora ligularis*) frente a la cepa de *E.coli*?
- ¿Cuál es el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de las hojas de la granadilla (*Passiflora ligularis*) frente a la cepa de *P.aeruginosa*?
- ¿Cuál es el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de las hojas de la granadilla (*Passiflora ligularis*) frente a la cepa de *S.aureus*?

El objetivo general de la investigación consistirá en:

Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto acuoso de las hojas de la granadilla (*Passiflora ligularis*) frente a las cepas de *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*.

Objetivos Específicos

- Determinar los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de las hojas de la granadilla (*Passiflora ligularis*).
- Demostrar en qué medida el extracto acuoso de las hojas de la granadilla (*Passiflora ligularis*) tendrá actividad antimicrobiana frente a las cepas de *E.coli*.
- Demostrar en qué medida el extracto acuoso de las hojas de la granadilla (*Passiflora ligularis*) tendrá actividad antimicrobiana frente a las cepas de *P.aeruginosa*.
- Demostrar en qué medida el extracto acuoso de las hojas de la granadilla (*Passiflora ligularis*) tendrá actividad antimicrobiana frente a las cepas de *S.aureus*.

A partir de estas premisas nos planteamos las siguientes hipótesis:

Hipótesis General:

El extracto acuoso de hojas de la granadilla (*Passiflora ligularis*) presentan actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas *E.coli* , *P.aeruginosa* , *S.aureus*

Hipótesis Específicas:

- El extracto acuoso de hojas de la granadilla (*Passiflora ligularis*) presenta metabolitos secundarios con actividad farmacológica.
- El extracto acuoso de hojas de la granadilla (*Passiflora ligularis*) presenta actividad antimicrobiana frente a las cepas de *E.coli*.
- El extracto acuoso de hojas de la granadilla (*Passiflora ligularis*) presenta actividad antimicrobiana frente a las cepas de *P.aeruginosa*.
- El extracto acuoso de hojas de la granadilla (*Passiflora ligularis*) presenta actividad antimicrobiana frente a las cepas de *S.aureus*.

II. MÉTODO

2.1 Tipo y diseño de la investigación

2.1.1 Tipo de investigación

En cuanto a su finalidad: aplicada, prospectivo

2.1.2 Diseño de la investigación

El diseño de las investigación es todo experimental ya que se manipula la variables independiente (Extracto acuoso de hojas de la *Passiflora Ligularis*, a concentraciones de 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml) y se mide su efecto en la variable dependiente (Efecto antimicrobiano en cepa *E. coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*.) Conjuntamente, se utilizara fármacos específicos que inhiben estas cepas como muestras control para observar que los posibles cambios de la variable dependiente no se den por otras causas.

2.2 Operacionalización de las variables

VARIABLE INDEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	INDICADORES	UNIDAD DE MEDIDA/PUNTO DE CORTE
Extracto acuoso de las hojas de <i>Passiflora Ligularis</i> (granadilla)	Producto obtenido mediante un proceso físico que contiene principios activos solubles.	Concentración del extracto de <i>Passiflora Ligularis</i> (granadilla)	70%	Porcentaje
			50%	
			25%	
		Estudio fitoquímico	Saponinas	Presente/Ausente
			Taninos	
			Compuestos fenólicos	
			Lactonas $\alpha\beta$ -insaturadas	
			Flavonoides	
			Carbohidratos	
			Proteínas	
Azúcares reductoras				
VARIABLE DEPENDIENTE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DIMENSIONES	INDICADORES	UNIDAD DE MEDIDA/PUNTO DE CORTE
Efecto antimicrobiano	Acción o actividad de una sustancia que impide o evita el crecimiento de una bacteria	Halo de inhibición	Diámetro del halo de inhibición	Presencia/ausencia

2.3 Población, muestra y muestreo

2.3.1 Población

Planta de Granadilla (*Passiflora Ligularis*) cultivada en el distrito de Huachipa, Departamento Lima.

Certificada en el museo de Historia Natural – Etnobotánica

2.3.2 Muestra

Extracto acuoso de *Passiflora Ligularis*

Criterios de inclusión

- Identificadas taxonómicamente
- Muestras sin infecciones
- Muestras frescas

Criterios de exclusión

- Muestras marchitas o deterioradas
- Hojas en descomposición
- Muestra de diferente especie vegetal

2.3.3 Muestreo

No probabilístico por conveniencia

2.4 técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad

2.4.1 Técnicas

Extracción acuosa

El extracto acuoso se obtuvo mediante una extracción por reflujo de las hojas secas y molidas de la *Passiflora ligularis* de hojas en solvente agua 0:100 (%v/v) correspondientemente durante 1 hora a 40 °C en agitación continua. Una vez finalizada las extracciones, se procedió a la filtración en caliente utilizando papel filtro Whatman N° 2 y se almacenó en frascos ámbar.

Kirby-Bauer

Técnica donde permite que el microorganismo es inoculado en la superficie de una placa de agar, sobre el cual se colocan discos impregnados con una concentración conocida del antibiótico.

2.4.2 Instrumentos de recolección de datos

Vernier digital: instrumento que permitirá determinar el tamaño del halo de inhibición

Registro de datos: Para la recolección de datos se utilizó la técnica de observación múltiple de las muestras en el laboratorio. Los datos obtenidos en la evaluación de los análisis que fueron sometidos las muestras de estudio; son registrados en el instrumento de investigación.

Base de datos: El instrumento de recolección de datos empleado en la presente investigación fue la ficha de recolección de datos. En este se expresó cuadro sobre la sensibilidad de las cepas a diferentes fármacos antimicrobianos, con una zona de inhibición en milímetros (mm) para 15 placas con agar Muller-Hinton conteniendo cada una de ellas 3 discos:

Control negativo: Alcohol de 96°

Control positivo: Ciprofloxacina 5 mcg (inhibe Gram negativo)

Oxacilina 1 mcg (inhibe Gram positivo)

2.5 Procedimiento

Preparación del extracto acuoso

Se recolectó la planta entera de la *Passiflora ligularis* en el distrito de Huachipa, Provincia de Lima, Departamento de Lima, y se obtuvieron las hojas con ayuda de una tijera de jardinería de acero inoxidable. Luego se procedió con la limpieza, selección y molienda de la muestra para poder secarlas de manera adecuada, en una estufa de secado a una temperatura de 40 °C por 48 horas.

Reactivación de las cepas *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*.

Se reactivaron de las cepas ATCC sembrandolas en tubos contenidos con agar tripticasa de soya en plano inclinado (esto ayuda que el flujo de aire sea propicio para la cepa), luego se incubó a 34 °C durante 48 horas (2 días), tiempo estimado para que puedan poblarse en el agar.

Después con la ayuda del asa de siembra y con mucho cuidado se extraen las cepas y se transfieren cada colonia a un caldo nutritivo (Caldo de cerebro-corazón) y se incubó a una temperatura de 34 °C durante 48 horas (2 días).

Sembrado en placa de cepa *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*.

Se procede a realizar el sembrado de cada bacteria en el agar no selectivo Mueller Hinton con el método de estriado con la asa de siembra en tres direcciones distintas apuntado al medio de la placa, esto se realiza para tener una uniformidad y mayor cantidad de crecimiento del inóculo activado.

Evaluación del extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* (granadilla)

Una vez seco el inóculo en el agar en placa, con ayuda de una pinza estéril se procede a colocar los discos de papel filtro Whatman n° 1 de 125 mm de diámetro estériles.

Se utilizó fármaco antimicrobiano Ciprofloxacina 5 mcg (inhibe Gram negativo) y Oxacilina 1 mcg (inhibe Gram positivo) como controles positivos respectivamente y Alcohol de 96° como control negativo. Así mismo, con la ayuda de una pipeta se colocó el extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* en distintas concentraciones 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml en los discos de papel filtro Whatman n°1.

Se llevan a incubar las placas en posición invertida para propiciar el crecimiento durante 48 horas (2 días) a una temperatura de 34 °C. Finalmente, se miden los diámetros de los halos de inhibición y se procede a realizar los cálculos correspondientes.

2.6 Método de Análisis de datos

Los datos obtenidos serán sometidos a análisis de varianza (ANOVA) empleando el software estadístico SPSS. Finalmente se procederá a realizar cuadros estadísticos y diagrama de barras expresando la comparación de los resultados obtenidos de inhibición de la muestra (extracto acuoso de hojas de la *Passiflora ligularis*) con los controles

positivos y negativos a diferentes concentraciones (1000, 2000, 3000, 4000, 5000 ppm)
frente a las cepas *E.coli*, *P.aeruginosa*, *S.aureus*.

III. RESULTADOS

Tabla 1: Identificación de los metabolitos secundarios de *Passiflora ligularis* (granadilla)

Tubo N°	Ensayo	Metabolito	Resultado
Metabolitos secundarios			
1	Espuma	Saponinas	+++
2	Gelatina	Taninos	+
3	FeCl ₃	Compuestos fenólicos	+++
4	Baljet	Lactonas α,β -insaturadas	+
5	Shinoda	Flavonoides	++
Metabolitos primarios			
6	Molish	Carbohidratos	+
7	Nihidrina	Proteínas	++
8	Fehling	Azúcares reductores	+

Negativo (-), Positivo (+), Moderado (++), Abundante (+++)

La tabla anterior muestra que el tamizaje fitoquímico del extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* presenta los metabolitos secundarios saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, lactonas α,β -insaturadas. El extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* también presenta carbohidratos, proteínas y azúcares reductores.

Tabla 2: Resultados del ensayo microbiológico del extracto de *Passiflora ligularis* frente a *S. aureus*.

La siguiente tabla muestra a detalle los resultados del ensayo microbiológico realizado con el extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* frente a *S. aureus*.

Orden	Extractos			Controles	
	25%	50%	70%	Oxacilina	Agua
1	9,08	12,28	12,92	19,13	6,00
2	10,40	12,26	12,83	17,78	6,00
3	10,56	12,13	13,49	21,58	6,00
4	11,55	11,80	13,43	20,90	6,00
5	10,80	13,80	14,16	17,35	6,00
Promedio	10.48	12.45	13.36	19.35	6,00

La tabla anterior muestra que el extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* generó un halo de inhibición medio de 10.48, 12.45 13.36 mm frente a la cepa bacteriana de *S. aureus*. Aunque el halo de inhibición evidenciado por el grupo control positivo oxacilina es de 19.35 mm.

Tabla 3: Resultados del ensayo microbiológico del extracto de *Passiflora ligularis* frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*

<i>E. coli</i>					
Orden	Extractos			Controles	
	25%	50%	70%	Ciprofloxacino	Agua
1	6,00	6,00	6,00	38,90	6,00
2	6,00	6,00	6,00	38,44	6,00
3	6,00	6,00	6,00	37,15	6,00
4	6,00	6,00	6,00	38,10	6,00
5	6,00	6,00	6,00	38,04	6,00
Promedio	6,00	6,00	6,00	38.13	6,00
<i>P. aeruginosa</i>					
Orden	Extractos			Controles	
	25%	50%	70%	Ciprofloxacino	Agua
1	6,00	6,00	6,00	48,95	6,00
2	6,00	6,00	6,00	49,38	6,00
3	6,00	6,00	6,00	49,56	6,00
4	6,00	6,00	6,00	49,56	6,00
5	6,00	6,00	6,00	49,30	6,00
Promedio	6,00	6,00	6,00	49.35	6,00

La tabla anterior muestra que el extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* no presenta ningún halo de inhibición frente a las cepas bacterianas de *E. coli* y *P. aeruginosa*. Pero los grupos control positivo ciprofloxacino muestran halos de inhibición promedio de 38.13 y 49.35 mm frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*, respectivamente.

Tabla 4: Test de Levene a los resultados de los ensayos microbiológicos.

Prueba de homogeneidad de varianzas				
	Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
<i>S. aureus</i>	5,924	4	20	,003
<i>E. coli</i>	5,325	4	20	,004
<i>P. aeruginosa</i>	7,232	4	20	,001

La tabla anterior muestra que los valores de significancia de los resultados de los ensayos microbiológicos del extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* frente a las cepas bacterianas *S aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa* fue mayor al 0.05. Por lo tanto, no existe homogeneidad de las varianzas.

Tabla 5: Comparaciones múltiples por el T3 de Dunnett para los ensayos microbiológicos del extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* frente a las cepas bacterianas *S aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Variable dependiente	(I) Grupos	(J) Grupos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
<i>P aeruginosa</i>	Control positivo	Ext 25%	43,35000*	,11216	,000	42,8097	43,8903
		Ext 50%	43,35000*	,11216	,000	42,8097	43,8903
		Ext 70	43,35000*	,11216	,000	42,8097	43,8903
		Control negativo	43,35000*	,11216	,000	42,8097	43,8903
	Control negativo	Ext 25%	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Ext 50%	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Ext 70	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Control positivo	-43,35000*	,11216	,000	-43,8903	-42,8097

La tabla anterior muestra un nivel de significancia menor al 0.05 en los halos de inhibición evidenciados por el extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* al 25, 50 y 70% frente

al control negativo del ensayo microbiológico contra la cepa bacteriana de *S. aureus*. Esto es evidencia de que existe diferencia estadísticamente significativa entre los halos de inhibición del extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* frente a *S. aureus*. También se observa que los valores de significancia son mayores al 0.05 en los halos de inhibición evidenciados por el extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* al 25, 50 y 70% frente al control negativo de los ensayos microbiológicos contra las cepas bacterianas de *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*. Por tanto, no existe halo de inhibición alguna de *Passiflora ligularis* al 25, 50 y 70%.

Tabla 6: Prueba de Kruskal Wallis a los resultados de los ensayos microbiológicos

Estadísticos de prueba ^{a,b}			
	<i>S aureus</i>	<i>E coli</i>	<i>P aeruginosa</i>
Chi-cuadrado	22,631	23,622	23,641
gl	4	4	4
Sig. asintótica	,000	,000	,000
a. Prueba de Kruskal Wallis			
b. Variable de agrupación: Grupos			

La tabla anterior un valor de significancia asintótica menor al 0.05. Esto es evidencia de que existe diferencia estadísticamente significativa entre al menos 2 grupos de los ensayos microbiológicos. Pero existe igualdad entre los grupos experimentales y el grupo control negativo en los ensayos microbiológicos del extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* al 25, 50 y 70% frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*.

Tabla 7: Comparaciones múltiples por el T3 de Dunnett del ensayo microbiológico frente a *S aureus*.

Variable dependiente	(I) Grupos	(J) Grupos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
<i>S aureus</i>	Control positivo	Ext 25%	8,87000*	,92490	,001	5,1067	12,6333
		Ext 50%	6,89400*	,90280	,003	3,1115	10,6765
		Ext 70	5,98200*	,86674	,009	2,1187	9,8453
		Control negativo	13,34800*	,83333	,001	9,3340	17,3620
	Control negativo	Ext 25%	-4,47800*	,40125	,002	-6,4108	-2,5452
		Ext 50%	-6,45400*	,34730	,000	-8,1269	-4,7811
		Ext 70	-7,36600*	,23834	,000	-8,5140	-6,2180
		Control positivo	-13,34800*	,83333	,001	-17,3620	-9,3340

La tabla anterior muestra un nivel de significancia menor al 0.05 en los halos de inhibición evidenciados por el extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* al 25, 50 y 70% frente al control negativo del ensayo microbiológico contra la cepa bacteriana de *S. aureus*. Esto es evidencia de que existe diferencia estadísticamente significativa entre los halos de inhibición del extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* frente a *S. aureus*.

Tabla 8: Comparaciones múltiples por el T3 de Dunnett para los ensayos microbiológicos del extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* frente a las cepas bacterianas *E. coli*

Variable dependiente	(I) Grupos	(J) Grupos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
<i>E. coli</i>	Control positivo	Ext 25%	32,12600*	0,28795	0,000	30,7390	33,5130
		Ext 50%	32,12600*	0,28795	0,000	30,7390	33,5130
		Ext 70	32,12600*	0,28795	0,000	30,7390	33,5130
		Control negativo	32,12600*	0,28795	0,000	30,7390	33,5130
	Control negativo	Ext 25%	0,00000	0,00000	.	0,0000	0,0000
		Ext 50%	0,00000	0,00000	.	0,0000	0,0000
		Ext 70	0,00000	0,00000	.	0,0000	0,0000
		Control positivo	-32,12600*	,28795	0,000	-33,5130	-30,7390

De la tabla anterior se observa que los valores de significancia son mayores al 0.05 en los halos de inhibición evidenciados por el extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* al 25, 50 y 70% frente al control negativo del ensayo microbiológico contra la cepa bacteriana de *E. coli*. Por tanto, no existe halo de inhibición alguna de *Passiflora ligularis* al 25, 50 y 70%.

Tabla 9: Comparaciones múltiples por el T3 de Dunnett para los ensayos microbiológicos del extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* frente a las cepas bacterianas *P.aeruginosa*.

Variable dependiente	(I) Grupos	(J) Grupos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
<i>P aeruginosa</i>	Control positivo	Ext 25%	43,35000*	,11216	,000	42,8097	43,8903
		Ext 50%	43,35000*	,11216	,000	42,8097	43,8903
		Ext 70	43,35000*	,11216	,000	42,8097	43,8903
		Control negativo	43,35000*	,11216	,000	42,8097	43,8903
	Control negativo	Ext 25%	0,00000	0,00000	.	0,0000	0,0000
		Ext 50%	0,00000	0,00000	.	0,0000	0,0000
		Ext 70	0,00000	0,00000	.	0,0000	0,0000
		Control positivo	-43,35000*	,11216	,000	-43,8903	-42,8097

De la tabla anterior se observa que los valores de significancia son mayores al 0.05 en los halos de inhibición evidenciados por el extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* al 25, 50 y 70% frente al control negativo del ensayo microbiológico contra la cepa bacteriana de *P.aeruginosa*. Por tanto, no existe halo de inhibición alguna de *Passiflora ligularis* al 25, 50 y 70%.

IV. DISCUSIÓN

El extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* presenta los metabolitos secundarios saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, lactonas α,β -insaturadas. Estos resultados tienen soporte en la investigación de Anusooriya *et al* (2014) que publicó en una investigación que el extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* presenta los metabolitos secundarios saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos y terpenoides mediante reacciones de coloración y precipitación. (22) También, Angel-Isaza *et al* (2021) evidenció en una investigación que el extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* presenta flavonoides, taninos y otros compuestos fenólicos mediante técnicas de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas. (23) Los autores citados apoyan los resultados obtenidos en el extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* y son evidencia de que podrían ser metabolitos constitutivos de la especie vegetal.

El extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* no presenta ningún halo de inhibición frente a las cepas bacterianas de *E. coli* y *P. aeruginosa*. Pero los grupos control positivo ciprofloxacino muestran halos de inhibición promedio de 38.13 y 49.35 mm frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*, respectivamente. Sí existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre los halos de inhibición del extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* frente a *S. aureus*. Por otro lado, no existe halo de inhibición alguna ($p > 0.05$) de *Passiflora ligularis* al 25, 50 y 70% frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*. De la misma, Nolasco y Sanchez (2020) evidenciaron que el extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* a las concentraciones de 25, 50 y 75% presentaron halos de inhibición de 7.92, 13.22 y 18.51 mm frente a *S. aureus*. (24) En ese mismo sentido, Kumudu *et al* (2018) publicó los resultados de un ensayo microbiológico, donde concluyo, la ausencia de efecto antibacteriano del extracto acuoso de hojas de *Passiflora suberosa* frente a las cepas bacterianas de *E. coli* y *P. aeruginosa* mediante discos de difusión en agar. (25) Por otro lado, Mohite *et al* (2018) evidenció el efecto antibacteriano del extracto acuoso de hojas de *Passiflora foetida* frente a una cepa bacteriana de *S. aureus* con un halo de inhibición promedio de 13 mm, pero también evidenció la ausencia de efecto antibacteriano de este frente a la cepa bacteriana de *P. aeruginosa*. (26)

El moderado efecto antibacteriano del extracto acuoso de las hojas de *Passiflora ligularis* frente a cepa bacteriana *Staphylococcus aureus* por el método de Kirby-Bauer puede ser debido a la presencia de flavonoides ya que vitexina e isovitexina, flavonas con efecto anti

Staphylococcus aureus,(27) son metabolitos secundarios presentes en las hojas de *Passiflora ligularis*. (28)

V. CONCLUSIONES

1. El extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* presenta saponinas, compuestos fenólicos, flavonoides, taninos, lactonas α,β -insaturadas.
2. El extracto acuoso de hojas de la *Passiflora ligularis* (granadilla) presenta actividad antimicrobiana frente a las cepas de *S aureus*.
3. El extracto acuoso de hojas de la *Passiflora ligularis* (granadilla) no presenta actividad antimicrobiana frente a las cepas de *E. coli*.
4. El extracto acuoso de hojas de la *Passiflora ligularis* (granadilla) no presenta actividad antimicrobiana frente a las cepas de *P.aeruginosa*.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar investigaciones para fraccionar y aislar metabolitos secundarios del extracto acuoso de hojas de la *Passiflora ligularis* (granadilla) que puedan presentar efecto antibacteriano frente a *S aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*
- Realizar investigaciones para determinar el efecto antibacteriano del acuoso de hojas de la *Passiflora ligularis* (granadilla) de diferentes orígenes.
- Realizar investigaciones para determinar el efecto antibacteriano del extracto acuoso de hojas de la *Passiflora ligularis* (granadilla) en animales de experimentación.
- Realizar investigaciones de toxicidad del extracto acuoso de hojas de la *Passiflora ligularis* (granadilla)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pérez V. Estudio de mercado de los frutos granadilla, palta, lúcuma y chirimoya. Proyecto Parques en Peligro. Oxapampa, Pasco. Perú; 2006.
2. Herrera R, M. Jornada de Capacitación UNALM- Agrobanco. Pasco. Peru; 2011
3. Claudio R, Nathanael D R, Mark P S. Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Rev Perú Med Exp Salud Pública*. 2015; 32(1):139–45.
4. Fariña, N. Resistencia bacteriana: un problema de salud pública mundial de difícil solución. *Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud*, 2016; 14(1), 04-05.
5. Yagui, M. Resistencia antimicrobiana: nuevo enfoque y oportunidad. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 2018; 35(1), 7-8.
6. Serra V, Miguel Á. Resistencia microbiana. Un problema de salud a nivel mundial. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 2017; 16(3), 310-311.
7. World Health Organization. Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance. World Health Organization. Geneva. April 2015
8. Casellas JM. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: Consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Pública*. 2011; 30(6):519-28.
9. OMS. La OMS pública la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. 27 febrero de 2017
10. Calderón, Adrián (2017) “Comparación *in vitro* del efecto antimicrobiano y citotóxico del extracto etanólico del fruto de la *Passiflora mollissima* (TUMBO) sobre cepas cultivadas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus oralis* (ATCC 6249), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) y *Candida albicans* (ATCC 10231)”
11. Salas, Franco (2016) “Etiología y control de la mancha foliar en el cultivo de la granadilla (*Passiflora ligularis*. Juss), a nivel *in vitro* - La convención - CUSCO”
12. Mendocilla, Laura (2012) “Velocidad de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en mostos de *passiflora edulis*, *Ananas Comosus*, y *Vitis Vinifera* durante el proceso de fermentación alcohólica”
13. Lizcano A., Vergara J. (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de la especies vegetales *Valeriana pilosa*, *Hesperomeles ferruginea*, *Myrcianthes rhopaloides* y *Passiflora manicata* frente a microorganismos patógenos y fitopatógenos.

14. Cabrera Navarro, Sergio Andrés, Sandoval Aldana, Angélica Piedad, & Forero Longas, Freddy. (2014). Potencial antioxidante y antimicrobiano de extractos acuosos e hidroalcohólicos de granadilla (*Passiflora ligularis*).
15. Bussmann Rainer, Brown William (2008). Actividad antibacteriana de plantas medicinales del norte del Perú. USA
16. C. Mohanasundari , D. Natarajan , K. Srinivasan , S. Umamaheswari and A. Ramachandran. (2006) Antibacterial properties of *Passiflora foetida* L. – a common exotic medicinal plant.
17. Troncoso, Hugo (2014) Valoración del cultivo de *Bixa orellana* (Achiote), Evaluando su actividad antibacteriana, concentración mínima inhibitoria y concentración bactericida mínima in vitro de los extractos acuoso y etanólico de hojas y corteza frente al crecimiento de *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomona*
18. CASS, H. y COTT, J. Herbal Medicine. Handbook of complementary and alternatives therapies in mental health. 1 ed. Estados Unidos: Academic Press, Inc., 2002, p. 377-401
19. López, M.A., Beltran, M.C., Cardona, J.E. y Yepes, H. F. La fruta de la pasión, potencial contribución de la naturaleza a la seguridad alimentaria. Investigación Andina, XX (8), 2006, p. 57-66.
20. Pallo, M. Evaluación del efecto ansiolítico del extracto hidroalcohólico de flor de granadilla *Passiflora ligularis* en ratones (*Mus musculus*). Tesis de pregrado. Escuela superior Politecnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador. 104 p.
21. Narain et al “ANTIOXIDAN, ANTIMICROBIAL, ANALGESIC, ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIPYRETIC EFFECTS OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM *Passiflora* Species” (31):971 – 974 U.S.A (2021)
22. Bernal, J. El cultivo de la granadilla. En: Memorias 1º simposio internacional de pasifloras. Palmira. Colombia; 1991.
23. Sanjinés Asturizaga, Adriana, Benjamin Ollgaard, y Henrik Balslev. «Frutos comestibles.» Botánica Económica de los Andes Centrales, 2006: 329-346.
24. Maradan C., Moreira B., Boyle-Vavra S. et al. 1997. Antimicrobial resistance in *Staphylococci*. Infectious Diseases of North America. Vol.11 4:813-841.
25. Trilla A., Barrio JL. Infecciones nosocomiales. En Farreras y Rozman. Medicina Interna. España: Ediciones Mosby- Doyma Libros S.A. [Ed. en CD-ROM]. Decimotercera edición. 1996; 2553-2558.

26. Poole K. Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and related organisms. *J of Microbiol Biotechnol*, 2001. 3: 255-64.
27. Von Eiff EC.,Becker K., Machka K., Stammer H . Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *N Engl J Med*, 2001. 344: 11- 16.
28. Forbes B. Micología. In: *Diagnóstico microbiológico*. 12th Ed. Madrid: Panamericana; 2009. p. 683–721.
29. Forbes B. Micología. In: *Diagnóstico microbiológico*. 12th Ed. Madrid: Panamericana; 2009. p. 683–721.

ANEXOS

ANEXO 1: MATRIZ DE CONSISTENCIA

Evaluación del potencial antimicrobiano in vitro del extracto acuoso de las hojas de la *Passiflora ligularis* (granadilla) frente a cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

PROBLEMAS DE INVESTIGACIÓN	OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN	HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN	TIPO Y NIVEL DE INVESTIGACION	METODO Y DISEÑO DE INVESTIGACION	VARIABLES	POBLACION Y MUESTRA
<p>Problema General ¿El extracto acuoso de las hojas de la granadilla (<i>Passiflora ligularis</i>) tendrá actividad antimicrobiana frente a las cepas de <i>E. coli</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>S. aureus</i>?</p> <p>Problemas Específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - ¿Cuáles son los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de las hojas de la granadilla (<i>Passiflora ligularis</i>)? - ¿Cuál es el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de las hojas de la granadilla (<i>Passiflora ligularis</i>)? 	<p>Objetivo General Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto acuoso de las hojas de la granadilla (<i>Passiflora ligularis</i>) frente a las cepas de <i>E.coli</i>, <i>P.aeruginosa</i>, <i>S.aureus</i>.</p> <p>Objetivos Específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> - Determinar los metabolitos secundarios presentes en el extracto acuoso de las hojas de la granadilla (<i>Passiflora ligularis</i>). - Demostrar en qué medida el extracto acuoso de las hojas de la granadilla (<i>Passiflora ligularis</i>) tendrá actividad antimicrobiana frente a las cepas de <i>E.coli</i>. 	<p>Hipótesis General El extracto acuoso de las hojas de la granadilla (<i>Passiflora ligularis</i>) presentan actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> frente a cepas <i>E.coli</i>, <i>P.aeruginosa</i>, <i>S.aureus</i></p> <p>Hipótesis Especificas</p> <ul style="list-style-type: none"> - El extracto acuoso de las hojas de la granadilla (<i>Passiflora ligularis</i>) presenta metabolitos secundarios con actividad farmacológica. - El extracto acuoso de las hojas de la granadilla (<i>Passiflora ligularis</i>) presenta actividad antimicrobiana frente a las cepas de <i>E.coli</i>. 	<p>Tipo de Investigación: Aplicada, experimental y prospectiva</p> <p>Nivel de Investigación: Es descriptivo, explicativo y correlacional.</p>	<p>Método de Investigación: Inductivo</p> <p>Diseño de Investigación: Experimental</p>	<p>Variable Independiente (x) X1 : Extracto de <i>Passiflora Ligularis</i> (granadilla)</p> <p>Indicadores: x1: Concentración 25%, 50%, 70%</p> <p>Dependiente (y) Efecto antimicrobiano</p> <p>Indicadores: Y1: Diámetro del halo de inhibición</p>	<p>Población : <i>Passiflora Ligularis</i> (granadilla)</p> <p>Muestra: Extracto de <i>Passiflora Ligularis</i> (granadilla)</p>

<p>frente a la cepa de <i>E.coli</i>?</p> <p>- ¿Cuál es el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de las hojas de la granadilla (<i>Passiflora ligularis</i>) frente a la cepa de <i>P.aeruginosa</i>?</p> <p>- ¿Cuál es el efecto antimicrobiano del extracto acuoso de las hojas de la granadilla (<i>Passiflora ligularis</i>) frente a la cepa de <i>S.aureus</i>?</p>	<p>- Demostrar en qué medida el extracto acuoso de las hojas de la granadilla (<i>Passiflora ligularis</i>) tendrá actividad antimicrobiana frente a las cepas de <i>P.aeruginosa</i>.</p> <p>- Demostrar en qué medida el extracto acuoso de las hojas de la granadilla (<i>Passiflora ligularis</i>) tendrá actividad antimicrobiana frente a las cepas de <i>S.aureus</i>.</p>	<p>- El extracto acuoso de hojas de la granadilla (<i>Passiflora ligularis</i>) presenta actividad antimicrobiana frente a las cepas de <i>P.aeruginosa</i>.</p> <p>- El extracto acuoso de hojas de la granadilla (<i>Passiflora ligularis</i>) presenta actividad antimicrobiana frente a las cepas de <i>S.aureus</i>.</p>				
---	---	---	--	--	--	--

ANEXO 2: VARIABLES

Variables	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores
VI: Extracto acuoso de hojas de <i>Passiflora ligularis</i>	Mezcla de metabolitos secundarios extraídos con agua a partir de hojas de <i>Passiflora ligularis</i>	Fitoquímica	Compuestos fenólicos y terpenos
VD: Actividad antimicrobiana	Se midió el halo de inhibición de las cepas bacterianas	Microbiológica	Halo de inhibición

ANEXO 3: Cuadro de recolección de resultados del Tamizaje Fitoquímico del extracto acuoso.

Tubo N°	Ensayo	Metabolito	Resultado
Metabolitos secundarios			
1	Espuma	Saponinas	+++
2	Gelatina	Taninos	+
3	FeCl ₃	Compuestos fenólicos	+++
4	Baljet	Lactonas α,β -insaturadas	+
5	Shinoda	Flavonoides	++
Metabolitos primarios			
6	Molish	Carbohidratos	+
7	Nihidrina	Proteínas	++
8	Fehling	Azúcares reductores	+

Negativo (-), poco (+), moderado (++), abundante (+++)

ANEXO 4: Ficha de recolección de datos para la evaluación del efecto antimicrobiano

Cepas microbianas de estudio:

- *E. coli* Derived from ATCC® 11775™
- *P.aeruginosa* Derived from ATCC® 9027™
- *S.aureus*. Derived from ATCC® 25923™

Tratamientos antimicrobianos:

- Ciprofloxacina 5 mcg(control positivo)
- Oxacilina 1 mcg (control positivo)
- Alcohol 96° (control negativo)
- Extracto acuoso de la *Passiflora ligularis*.

Hora de la aplicación del disco

Fecha de inicio..... Fecha de término.....

Concentraciones	1 mg/ml	2 mg/ml	3 mg/ml	4 mg/ml	5 mg/ml
Ciprofloxacina 5mcg					
Oxacilina 1mcg					
Extracto acuoso					
Alcohol 96°	-	-	-	-	-

ANEXO 5: CUADRO DE REGISTRO DE DATOS DE TAMAÑOS DE HALO DE INHIBICIÓN PRODUCIDOS EN CEPAS DE *Escherichia coli* ATCC 25923

Placa	Extracto Acuoso			
	Control (mm)	25% (mm)	50% (mm)	70% (mm)
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				

ANEXO 6: Ficha de validación del instrumento de recolección de datos

Título de la tesis: Evaluación del potencial Antimicrobiano “*in vitro*” del extracto acuoso de las hojas de la granadilla (*Passiflora ligularis*) frente a cepas de *E.coli* , *P.aeruginosa* , *S.aureus*.

1: Muy bajo; 2: Bajo; 3: Moderado; 4: Alto; 5: Muy Alto

Criterios de evaluación	Valoración				
	1	2	3	4	5
Es claro y preciso.					
Es de fácil aplicación.					
Reúne los datos principales del experimento.					
Contiene a todos los grupos a investigar.					
Relaciona el indicador con el ítem.					
Se logrará probar las hipótesis con el instrumento.					

Puntaje final: _____

Aprobado _____

Desaprobado _____

(puntaje mayor a 20)

(puntaje menor a 20)

Observaciones: _____

Docente

Responsable: _____

ANEXO 7: BASE DE DATOS 1

Descriptivos^{a,b,c,d,e,f,g,h,i}					
	Grupos		Estadístico	Error estándar	
S aureus	Ext 25%	Media		10,4780	,40125
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	9,3639	
			Límite superior	11,5921	
		Media recortada al 5%		10,4961	
		Mediana		10,5600	
		Varianza		,805	
		Desviación estándar		,89723	
		Mínimo		9,08	
		Máximo		11,55	
		Rango		2,47	
		Rango intercuartil		1,44	
		Asimetría		-,846	,913
		Curtosis		1,936	2,000
		Ext 50%	Media		12,4540
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	11,4897	
			Límite superior	13,4183	
	Media recortada al 5%		12,4156		
	Mediana		12,2600		
	Varianza		,603		
	Desviación estándar		,77658		
	Mínimo		11,80		
	Máximo		13,80		
	Rango		2,00		
Rango intercuartil			1,07		

		Asimetría	1,879	,913	
		Curtosis	3,955	2,000	
	Ext 70	Media	13,3660	,23834	
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	12,7043	
			Límite superior	14,0277	
		Media recortada al 5%	13,3517		
		Mediana	13,4300		
		Varianza	,284		
		Desviación estándar	,53294		
		Mínimo	12,83		
		Máximo	14,16		
		Rango	1,33		
		Rango intercuartil	,95		
		Asimetría	,716	,913	
		Curtosis	,054	2,000	
		Control positivo	Media	19,3480	,83333
	95% de intervalo de confianza para la media		Límite inferior	17,0343	
			Límite superior	21,6617	
	Media recortada al 5%		19,3350		
	Mediana		19,1300		
	Varianza		3,472		
	Desviación estándar		1,86338		
	Mínimo		17,35		
	Máximo		21,58		
	Rango		4,23		
	Rango intercuartil		3,67		
	Asimetría		,194	,913	
	Curtosis		-2,546	2,000	

E coli	Control positivo	Media		38,1260	,28795
		95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior	37,3265	
			Límite superior	38,9255	
		Media recortada al 5%		38,1372	
		Mediana		38,1000	
		Varianza		,415	
		Desviación estándar		,64388	
		Mínimo		37,15	
		Máximo		38,90	
		Rango		1,75	
		Rango intercuartil		1,08	
		Asimetría		-,680	,913
		Curtosis		1,280	2,000
		P aeruginosa	Control positivo	Media	
95% de intervalo de confianza para la media	Límite inferior			49,0386	
	Límite superior			49,6614	
Media recortada al 5%				49,3606	
Mediana				49,3800	
Varianza				,063	
Desviación estándar				,25080	
Mínimo				48,95	
Máximo				49,56	
Rango				,61	
Rango intercuartil				,44	
Asimetría				-1,204	,913
Curtosis				1,319	2,000
a. S aureus es constante cuando Grupos = Control negativo. Se ha omitido.					
b. E coli es constante cuando Grupos = Ext 25%. Se ha omitido.					

c. E coli es constante cuando Grupos = Ext 50%. Se ha omitido.
d. E coli es constante cuando Grupos = Ext 70. Se ha omitido.
e. E coli es constante cuando Grupos = Control negativo. Se ha omitido.
f. P aeruginosa es constante cuando Grupos = Ext 25%. Se ha omitido.
g. P aeruginosa es constante cuando Grupos = Ext 50%. Se ha omitido.
h. P aeruginosa es constante cuando Grupos = Ext 70. Se ha omitido.
i. P aeruginosa es constante cuando Grupos = Control negativo. Se ha omitido.

Figura 1: halos de inhibición evidenciados por el extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* (granadilla) al 25, 50 y 70% frente al control negativo del ensayo microbiológico contra la cepa bacteriana de *S. aureus*

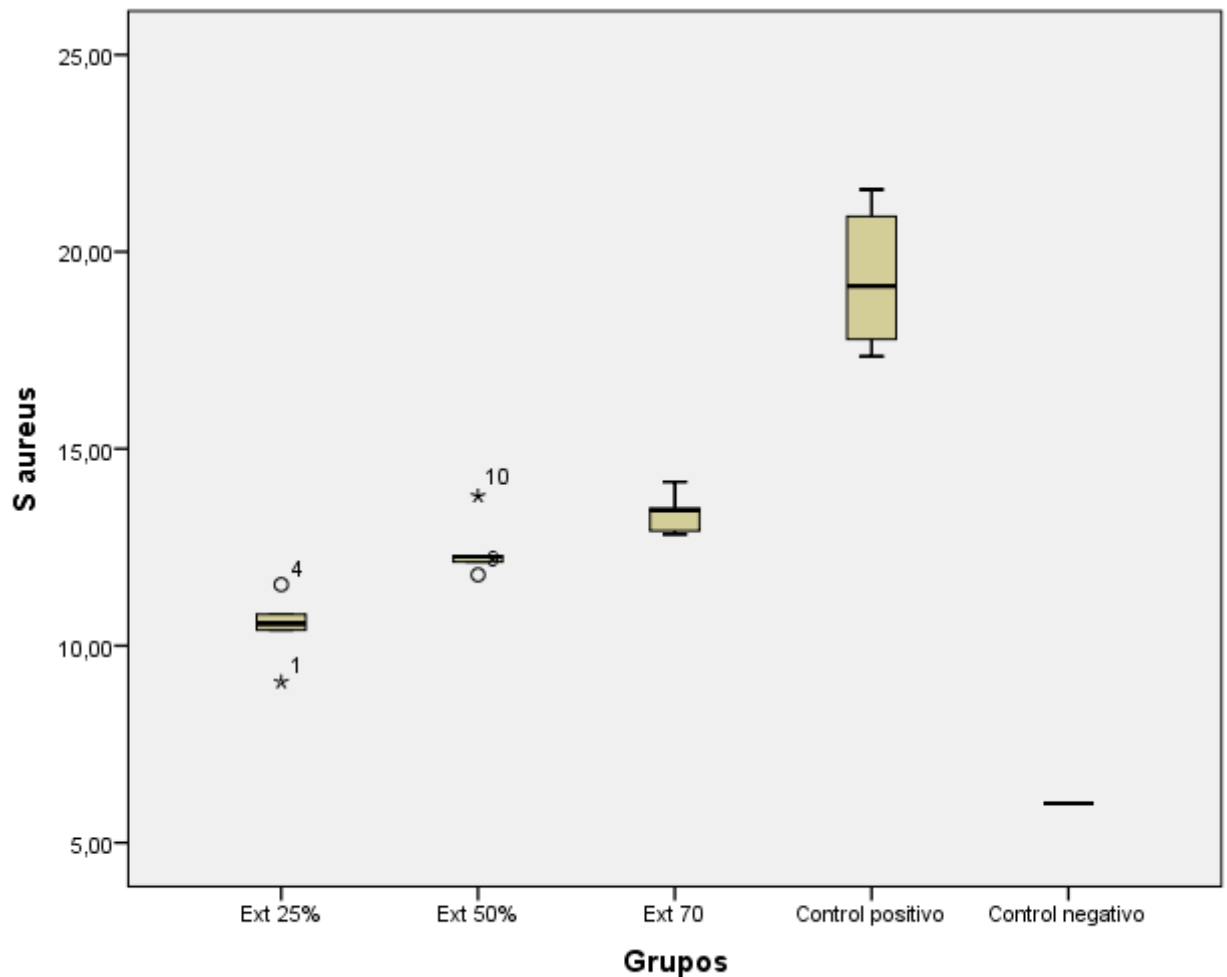


Figura 2: Ensayos microbiológicos del extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* frente a las cepas bacterianas *E. coli*.

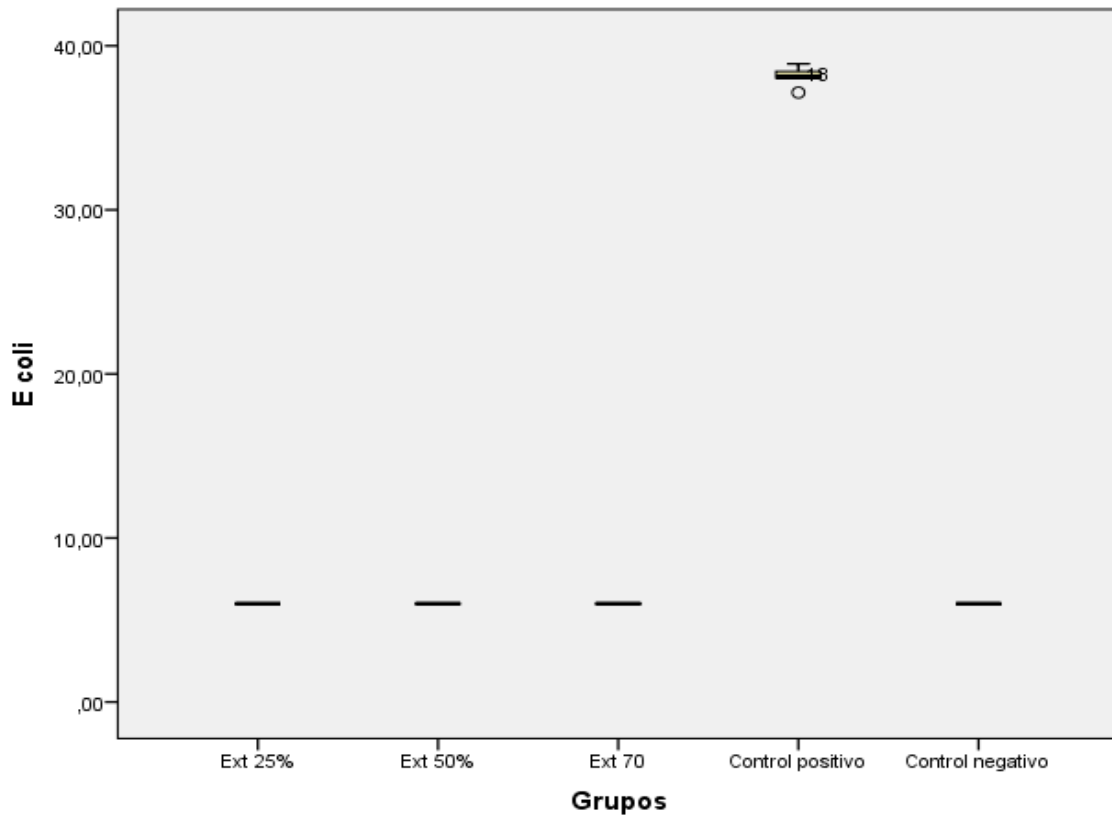
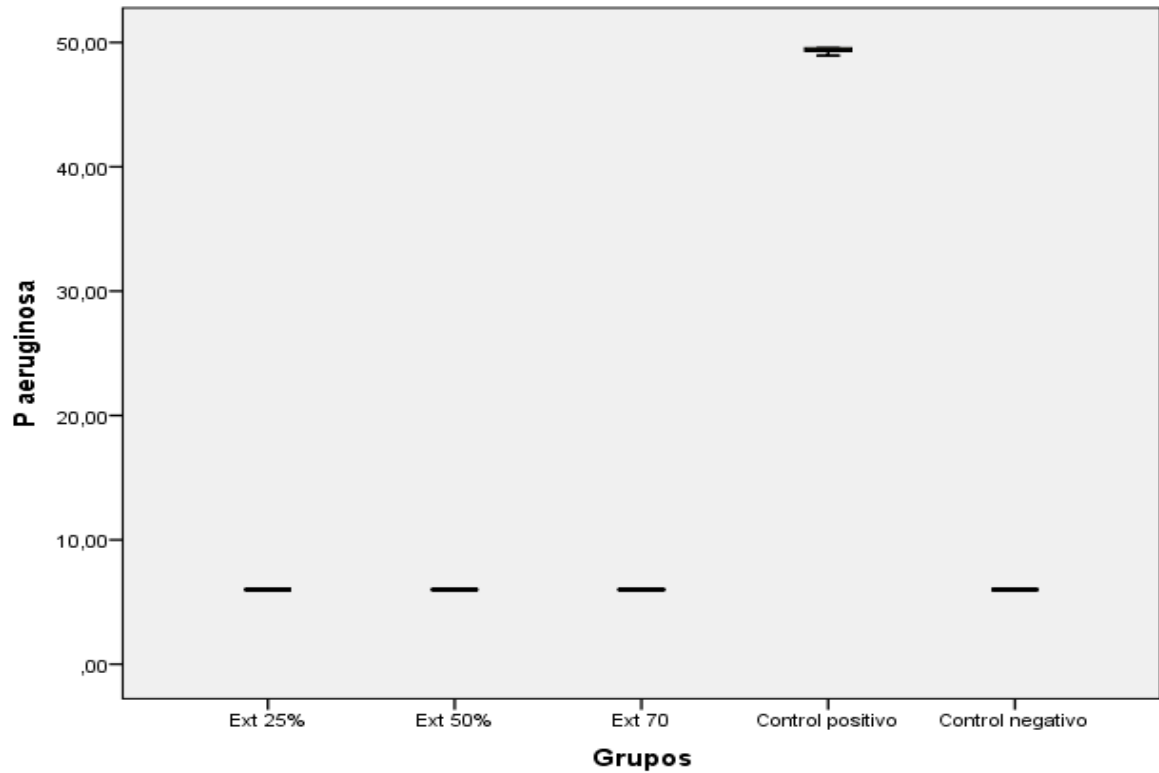


Figura 3: Ensayos microbiológicos del extracto acuoso de hojas de *Passiflora ligularis* (granadilla) frente a las cepas bacterianas *P. aeruginosa*



ANEXO 8: BASE DE DATOS 2

Comparaciones múltiples							
T3 Dunnett							
Variable dependiente	(I) Grupos	(J) Grupos	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
S aureus	Ext 25%	Ext 50%	-1,97600*	,53068	,047	-3,9292	-,0228
		Ext 70	-2,88800*	,46670	,005	-4,7058	-1,0702
		Control positivo	-8,87000*	,92490	,001	-12,6333	-5,1067
		Control negativo	4,47800*	,40125	,002	2,5452	6,4108
	Ext 50%	Ext 25%	1,97600*	,53068	,047	,0228	3,9292
		Ext 70	-,91200	,42121	,387	-2,5088	,6848
		Control positivo	-6,89400*	,90280	,003	-10,6765	-3,1115
		Control negativo	6,45400*	,34730	,000	4,7811	8,1269
	Ext 70	Ext 25%	2,88800*	,46670	,005	1,0702	4,7058
		Ext 50%	,91200	,42121	,387	-,6848	2,5088
		Control positivo	-5,98200*	,86674	,009	-9,8453	-2,1187
		Control negativo	7,36600*	,23834	,000	6,2180	8,5140
	Control positivo	Ext 25%	8,87000*	,92490	,001	5,1067	12,6333
		Ext 50%	6,89400*	,90280	,003	3,1115	10,6765
		Ext 70	5,98200*	,86674	,009	2,1187	9,8453
		Control negativo	13,34800*	,83333	,001	9,3340	17,3620
		Ext 25%	-4,47800*	,40125	,002	-6,4108	-2,5452

	Control negativo	Ext 50%	-6,45400*	,34730	,000	-8,1269	-4,7811
		Ext 70	-7,36600*	,23834	,000	-8,5140	-6,2180
		Control positivo	-13,34800*	,83333	,001	-17,3620	-9,3340
E coli	Ext 25%	Ext 50%	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Ext 70	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Control positivo	-32,12600*	,28795	,000	-33,5130	-30,7390
		Control negativo	,00000	,00000	.	,0000	,0000
	Ext 50%	Ext 25%	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Ext 70	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Control positivo	-32,12600*	,28795	,000	-33,5130	-30,7390
		Control negativo	,00000	,00000	.	,0000	,0000
	Ext 70	Ext 25%	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Ext 50%	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Control positivo	-32,12600*	,28795	,000	-33,5130	-30,7390
		Control negativo	,00000	,00000	.	,0000	,0000
	Control positivo	Ext 25%	32,12600*	,28795	,000	30,7390	33,5130
		Ext 50%	32,12600*	,28795	,000	30,7390	33,5130
		Ext 70	32,12600*	,28795	,000	30,7390	33,5130
		Control negativo	32,12600*	,28795	,000	30,7390	33,5130
	Control negativo	Ext 25%	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Ext 50%	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Ext 70	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Control positivo	-32,12600*	,28795	,000	-33,5130	-30,7390

P aeruginosa	Ext 25%	Ext 50%	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Ext 70	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Control positivo	-43,35000*	,11216	,000	-43,8903	-42,8097
		Control negativo	,00000	,00000	.	,0000	,0000
	Ext 50%	Ext 25%	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Ext 70	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Control positivo	-43,35000*	,11216	,000	-43,8903	-42,8097
		Control negativo	,00000	,00000	.	,0000	,0000
	Ext 70	Ext 25%	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Ext 50%	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Control positivo	-43,35000*	,11216	,000	-43,8903	-42,8097
		Control negativo	,00000	,00000	.	,0000	,0000
	Control positivo	Ext 25%	43,35000*	,11216	,000	42,8097	43,8903
		Ext 50%	43,35000*	,11216	,000	42,8097	43,8903
		Ext 70	43,35000*	,11216	,000	42,8097	43,8903
		Control negativo	43,35000*	,11216	,000	42,8097	43,8903
	Control negativo	Ext 25%	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Ext 50%	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Ext 70	,00000	,00000	.	,0000	,0000
		Control positivo	-43,35000*	,11216	,000	-43,8903	-42,8097

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Pruebas de normalidad ^{c,d,e,f,g,h,i,j,k}							
	Grupos	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Estadístico	gl	Sig.	Estadístico	gl	Sig.
S aureus	Ext 25%	,265	5	,200 [*]	,938	5	,654
	Ext 50%	,389	5	,013	,773	5	,048
	Ext 70	,208	5	,200 [*]	,919	5	,520
	Control positivo	,200	5	,200 [*]	,915	5	,497
E coli	Control positivo	,247	5	,200 [*]	,957	5	,786
P aeruginosa	Control positivo	,221	5	,200 [*]	,871	5	,271

*. Esto es un límite inferior de la significación verdadera.

a. Corrección de significación de Lilliefors

c. S aureus es constante cuando Grupos = Control negativo. Se ha omitido.

d. E coli es constante cuando Grupos = Ext 25%. Se ha omitido.

e. E coli es constante cuando Grupos = Ext 50%. Se ha omitido.

f. E coli es constante cuando Grupos = Ext 70. Se ha omitido.

g. E coli es constante cuando Grupos = Control negativo. Se ha omitido.

h. P aeruginosa es constante cuando Grupos = Ext 25%. Se ha omitido.

i. P aeruginosa es constante cuando Grupos = Ext 50%. Se ha omitido.

j. P aeruginosa es constante cuando Grupos = Ext 70. Se ha omitido.

k. P aeruginosa es constante cuando Grupos = Control negativo. Se ha omitido.

ANEXO 9: JUCIO DE EXPERTOS

UNIVERSIDAD PRIVADA DE HUANCAYO



"FRANKLIN ROOSEVELT"

ESCUELA PROFESIONAL DE
CIENCIAS FARMACEUTICAS Y
BIOQUIMICA

Huancayo 29 de Noviembre del 2021

CARTA Nro.01-2021-YSG/MOMM/UPFR

Señores (as): Dr. QF José Edwin Rodríguez Lichtenheldt

Mg. Diaz Uribe, Julio Luis.

Mg. Miranda Paredes Jean Paul.

PRESENTE

ASUNTO: VALIDEZ DE INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN

Por medio del presente me dirijo a Ud. Para saludarle cordialmente y solicitarle su participación en la validez de instrumentos de investigación a través de "juicio de expertos" del proyecto de investigación que estoy realizando, para obtener el título profesional; teniendo como tesis titulado, **"EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO "in vitro" DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Passiflora ligularis* (granadilla) FRENTE A CEPAS DE *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*."**

. Para lo cual adjunto:

- Formato de apreciación al instrumento: formato A y B.
- Matriz de consistencia.
- Operacionalización de variables.
- Instrumento de recolección de datos.

Esperando la atención del presente le reitero las muestras de mi especial consideración y estima personal

Atentamente,

Bach. OJEDA VERGARA BILLY KARL

Bach. YAURI VELARDE DIEGO JESUS



FORMATO: A

VALIDEZ DEL INSTRUMENTO DE INVESTIGACIÓN PORJUICIO DE EXPERTO

TESIS: "EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO *in-vitro* DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Passiflora Ligularis* (granadilla) FRENTE A CEPAS DE *E. Coli*, *P. Aeruginosa*, *S. Aureus*"

Investigadores: **Bach. OJEDA VERGARA, BILLY KARL**
 Bach. YAURI VELARDE, DIEGO JESUS

ESPECIES	CEPAS	La concentración del extracto acuoso de <i>Passiflora Ligularis</i> (granadilla).																			
		10 ul (25%)				10 ul (50%)				10 ul (70%)				Ciprofloxacino				Oxacilna			
		R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
<i>Escherichia coli</i>	ATCC11775																				
<i>P. Aeruginosa</i>	ATTC 9027																				
<i>S. Aureus</i>	ATTC 25923																				

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Indicación: Señor calificador se le pide su colaboración para que luego de un riguroso análisis de los ítems de la ficha de recolección de datos que le mostramos, marque con un aspa el casillero que crea conveniente de acuerdo a su criterio y experiencia profesional, denotando si el instrumento cuenta con los requisitos mínimos de formación para su posterior aplicación.

NOTA: Para cada ítem se considera la escala de 1 a 5 dónde:

1= Muy Deficiente o	2= Deficiente	3= Regular	4= Bueno	5= Muy Bueno				
Dimensión: Concentración / 6				1	2	3	4	5
INDICADOR: Extracto acuoso de <i>Passiflora Ligularis</i> (granadilla) al 25%								
Diámetro (mm)							X	

INDICADOR: Extracto acuoso de <i>Passiflora Ligularis</i> (granadilla) al 50%								
Diámetro (mm)							X	
INDICADOR: Extracto acuoso de <i>Passiflora Ligularis</i> (granadilla) al 70%								
Diámetro (mm)							X	
INDICADOR: Control negativo (alcohol 96°)								
Diámetro (mm)							X	
INDICADOR: Control positivo (Ciprofloxacino 5 mg)								
Diámetro (mm)							X	
INDICADOR: Control positivo (Oxacilina 1 mg)								
Diámetro (mm)							X	

RECOMENDACIONES

FICHAS DE VALIDACIÓN DEL INFORME DE OPINIÓN POR JUICIO DE EXPERTO
I. DATOS GENERALES

1.1. Título de la Investigación : **“EFECTO ANTIMICROBIANO *in-vitro* DEL EXTRACTO ACUOSO DE LAS HOJAS DE *Passiflora Ligularis* (granadilla) FRENTE A CEPAS DE *E. Coli*, *P. Aeruginosa*, *S. Aureus*”**

1.2. Nombre del instrumento : Ficha de recolección de datos

II. ASPECTOS DE VALIDACIÓN

Indicadores	Criterios	Deficiente				Baja				Regular				Buena				Muy Buena			
		5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
1. Claridad	Está formulado con lenguaje apropiado																X				
2. Objetividad	Está expresado en conductas observables																X				
3. Actualidad	Adecuado al avance de la ciencia pedagógica																X				
4. Organización	Existe una organización lógica																X				
5. Suficiencia	Comprende los aspectos en cantidad y calidad																X				
6. Intencionalidad	Adecuado para valorar los instrumentos de investigación																X				
7. Consistencia	Basado en aspectos teóricos científicos																X				
8. Coherencia	Entre los índices e Indicadores																X				
9. Metodología	La estrategia responde al propósito del diagnóstico																X				
10. Pertinencia	Es útil y adecuado para la Investigación																X				

PROMEDIO DE VALORACIÓN

4

OPINIÓN DE APLICABILIDAD

1) Muy deficiente 2) Deficiente 3) Regular 4) Buena 5) Muy buena

Nombres y Apellidos : Dr. QF José Edwin Rodríguez Lichtenheldt.

DNI N° : 10734121

Dirección domiciliaria : Av. Bolivia 1109. Dpto. 1512 - Breña

Título Profesional : Químico Farmacéutico

Grado Académico : Doctor en Farmacia y Bioquímica



Firma
DNI:
10734121

Lugar y fecha: 29 de Noviembre del 2021

PROMEDIO DE VALORACIÓN

80

OPINIÓN DE APLICABILIDAD

1) Muy Deficiente 2) Deficiente 3) Regular 4) Buena 5) muy buena

Nombres y Apellidos : Dr. QF José Edwin Rodríguez Lichtenheldt.

DNI N° : 10734121

Dirección domiciliaria : Av. Bolivia 1109. Dpto 1512 - Breña

Título Profesional : Químico Farmacéutico

Grado Académico : Doctor en Farmacia y Bioquímica



Firma DNI:
10734121

Lugar y fecha: 29 de Noviembre del 2021

PROMEDIO DE VALORACIÓN

4

OPINIÓN DE APLICABILIDAD

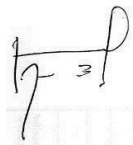
1) Muy deficiente 2) Deficiente 3) Regular 4) Buena 5) muy buena

Nombres y Apellidos : Mg. Diaz Uribe, Julio Luis.DNI N°
07247790

Dirección domiciliaria : Av Canevaro 742-902 Lince

Título Profesional : Químico Farmacéutico Grado Académico
: Magister

Mención : Ciencia de los alimentos



Firma DNI: 07247790

Lugar y fecha: 29 de Noviembre del 2021

PROMEDIO DE VALORACIÓN

80

OPINIÓN DE APLICABILIDAD

1) Muy Deficiente 2) Deficiente 3) Regular **4) Buena** 5) muy buena

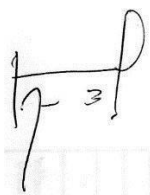
Nombres y Apellidos : Mg. Diaz Uribe, Julio Luis.DNI N° 07247790

Dirección domiciliaria : Av Canevaro 742-902 Lince

Título Profesional : Químico Farmacéutico Grado Académico

: Magister

Mención : Ciencia de los alimentos



Firma DNI: 07247790

PROMEDIO DE VALORACIÓN

4

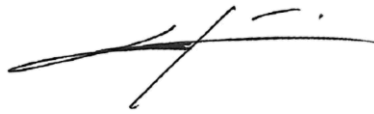
OPINIÓN DE APLICABILIDAD

1) Muy deficiente 2) Deficiente 3) Regular 4) Buena 5) muy buena

Nombres y Apellidos : Mg. Miranda Paredes Jean Paul. DNI N°
10118769

Dirección domiciliaria : Jr. Emilio de los Ríos N° 5450 Los Olivos

Título Profesional : Maestro en docencia universitaria y gestión educativa Grado Académico
: Magister



Firma DNI: 10118769

Lugar y fecha: 17 de Noviembre del 2021

PROMEDIO DE VALORACIÓN

80

OPINIÓN DE APLICABILIDAD

1) Muy Deficiente 2) Deficiente 3) Regular **4) Buena** 5) muy buena

Nombres y Apellidos : Mg. Miranda Paredes Jean Paul.DNI N°
10118769

Dirección domiciliaria : Jr. Emilio de los Ríos N° 5450 Los Olivos

Título Profesional : Maestro en docencia universitaria y gestión educativa Grado Académico
: Magister



Firma DNI: 10118769

ANEXO 10: CONSTANCIA BOTANICA



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA
VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
MUSEO DE HISTORIA NATURAL



"Año del Diálogo y la Reconciliación Nacional"

CONSTANCIA N° 434-USM-2018

EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:

La muestra vegetal (rama con hojas) recibida de **Diego Jesús Yauri Velarde y Billy Karl Ojeda Vergara**, estudiantes de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega; ha sido estudiada y clasificada como: *Passiflora ligularis* Juss. y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988).

DIVISION: MAGNOLIOPHYTA

CLASE: MAGNOLIOPSIDA

SUBCLASE: DILENIIDAE

ORDEN: VIOALES

FAMILIA: PASSIFLORACEAE

GENERO: *Passiflora*

ESPECIE: *Passiflora ligularis* Juss.

Nombre vulgar: "granadilla"

Determinado por: Mg. Hamilton Beltrán Santiago

Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para fines de estudios.

Lima, 23 de noviembre de 2018



Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRIA
JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)

ACE/ddb

ANEXO 11: CERTIFICADO DE CALIDAD DE CIPROFLOXACINO

<b style="font-size: 1.2em;">Liofilchem S.r.l.	CERTIFICATO CONTROLLO QUALITÀ <i>QUALITY CONTROL CERTIFICATE</i>	N°9056 - 9056/1 Revisione 7 del 09.10.2013 Pag. 1 di 1
---	--	--

CARATTERISTICHE DEL PRODOTTO / PRODUCT CHARACTERISTICS

Prodotto / <i>Product</i>	CIPROFLOXACIN
Sigla / <i>Initial</i>	CIP 5 ug
Lotto / <i>Batch</i>	021017059
Data produzione / <i>Production date</i>	10.02.2017
Data scadenza / <i>Expiry date</i>	2020.02.10
Contenuto antibiotico del disco / <i>Antimicrobial Disk content</i>	Ciprofloxacin 5 ug

CONTROLLO QUALITÀ / QUALITY CONTROL

Riferimento / <i>Reference</i>	CLSI M100-S21 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, January 2011	
Terreno di coltura / <i>Culture medium</i>	Mueller Hinton Agar Haemophilus Test Agar¹ GC Agar Base and 1% Deflated Growth Supplement²	
Tempo di incubazione / <i>Incubation time</i>	16-18 h	20-24 h^{1,2}
Temperatura / <i>Temperature</i>	35 ± 2 °C	
Modalità di incubazione / <i>Procedure of incubation</i>	O₂	5% CO₂^{1,2}
Microrganismo / <i>Microorganism</i>	SPECIFICATION Diametro di inibizione accettabile (mm) <i>Acceptable diameter of inhibition (mm)</i>	RESULTS mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	30-40	37
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	22-30	26
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	25-33	27
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49247 ¹	34-42	40
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 49226 ²	48-58	50

Riferimento / <i>Reference</i>	EUCAST Tables of Quality Control targets and ranges. Version 1.3. December 2010	
Terreno di coltura / <i>Culture medium</i>	Mueller Hinton Agar Mueller Hinton Fastidious Agar³	
Tempo di incubazione / <i>Incubation time</i>	18 ± 2 h	
Temperatura / <i>Temperature</i>	35 ± 1 °C	
Modalità di incubazione / <i>Procedure of incubation</i>	O₂	5% CO₂³
Microrganismo / <i>Microorganism</i>	SPECIFICATION Diametro di inibizione accettabile (mm) <i>Acceptable diameter of inhibition (mm)</i>	RESULTS mm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	30-40	37
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	25-33	27
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	21-27	26
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619 ³	22-28	24
<i>Haemophilus influenzae</i> NCTC 8468 ³	31-39	35

LOTTO / BATCH : Idoneo / Approved

Non Idoneo / Not approved

DATA / DATE : 17.02.2017

Responsabile Controllo Qualità
Quality Control Manager
(D. Vitagliano)

Dario Vitagliano

ANEXO 12: CERTIFICADO DE CALIDAD DE OXACILINA

Liofilchem® Certificate of Analysis

Page 1 of 1

Product	Batch	Expiration date
Oxacillin OX 1 µg	102018013	2021.10.19

Ref.

9036 – 9036/1

Antimicrobial Susceptibility Testing

Tested according to current CLSI and/or EUCAST methodology

Control strains	Medium	Inoculum	Incubation	Expected Results Zone range (mm)	Results Zone (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 25923	Mueller Hinton II Agar	0.5 McFarland	35 ± 1°C, ambient 16-18 h	18-24	22
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC® 29213	Mueller Hinton II Agar	0.5 McFarland	35 ± 1°C, ambient 16-18 h	19-25*	21
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	Mueller Hinton II Agar with 5% Sheep Blood	0.5 McFarland	35 ± 1°C, 5% CO ₂ 20-24 h	≤ 12	11
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC® 49619	Mueller Hinton Fastidious Agar	0.5 McFarland	35 ± 1°C, 5% CO ₂ 16-20 h	8-14*	10

*Established and validated by EUCAST

Batch Release

Approved

Date

25.10.2018

Signature

Quality Control
(D. Vitagliano)

Dario Vitagliano

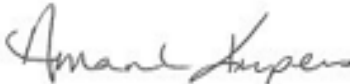
The results reported were obtained at the time of release.

ANEXO 13: CERTIFICADO DE CALIDAD DE *Escherichia coli* ATCC 11775



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Escherichia coli</i> (serovar O1:K1:H7) Catalog Number: 0485 Lot Number: 465-110** Reference Number: ATCC® 11775™* Passage from Reference: 2	Expiration Date: 2019/1/31 Release Information: Quality Control Technologist: Tracy A. Bleeker Release Date: 2017/3/28
--	---

Performance	
Macroscopic Features: Two colony types present. One type is large, circular, convex, entire edge, gray and smooth. The other type is slightly larger, irregular, convex, slightly opaque edge, gray and slightly rough.	Medium: SBAP
Microscopic Features: Gram negative straight rod.	Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE

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

Note for users: Although the ~~Micro~~ panel uses many conventional tests, the unique environment of the ~~osm~~, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, MICROBIOLOGICS, INC. (S-1000000) to use these trademarks and to sell products derived from ATCC's cultures.



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

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: Escherichia coli (serovar O1:K1:H7)
 Sample Description: 0465
 Sample ID: 465-110
 Sample Creation Date/Time: 2017-03-16T10:14:46.898 TB
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
E2 (+++)(A)	465-110	Escherichia coli	2.40

Comments:

closely related to Shigella and not definitely distinguishable at the moment


ANEXO 14: CERTIFICADO DE CALIDAD DE *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 9027



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Catalog Number: 0484 Lot Number: 484-854** Reference Number: ATCC® 9027™* Passage from Reference: 2	Expiration Date: 2019/5/31 Release Information: Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2017/6/16
--	---

Performance	
Macroscopic Features: Large, flat, circular to irregular shaped, gray with silver sheen. A second colony type may also be present as small, round, shiny colonies.	Medium: SBAP
Microscopic Features: Straight or slightly curved <u>gram negative</u> rod.	Method: Gram Stain (1)

ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): positive (1) Motility B Medium: positive Pseudomonas P Agar: positive (blue-green color diffusing into the agar) Growth at 42 C: positive  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE
---	--

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

Note for users: Although the USE-1 panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC, AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION, INC. USE-1 is used to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.

(1) These tests conform to ISO/IEC 17025.



Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Interpretation	Symbols	Color
2.00 - 3.00	High-confidence identification	(+++)	green
1.70 - 1.99	Low-confidence identification	(+)	yellow
0.00 - 1.69	No Organism Identification Possible	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A - C)

Category	Interpretation
(A)	High consistency: The best match is a high-confidence identification. The second-best match is (1) a high-confidence identification in which the species is identical to the best match, (2) a low-confidence identification in which the species or genus is identical to the best match, or (3) a non-identification.
(B)	Low consistency: The requirements for high consistency are not met. The best match is a high- or low-confidence identification. The second-best match is (1) a high- or low-confidence identification in which the genus is identical to the best match or (2) a non-identification.
(C)	No consistency: The requirements for high or low consistency are not met.

Sample Name: Pseudomonas aeruginosa
 Sample Description: 0484
 Sample ID: 484-854
 Sample Creation Date/Time: 2017-06-13T14:45:45.547 CC
 Applied MSP Library(ies): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, Listeria

Sample Name	Sample ID	Organism (best match)	Score Value
A7 (+++)(A)	484-854	Pseudomonas aeruginosa	2.36

Comments:

N/A

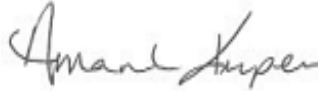
ANEXO 15: CERTIFICADO DE CALIDAD DE *Staphylococcus aureus* ATCC 25923



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Catalog Number: 0360 Lot Number: 360-283** Reference Number: ATCC® 25923™** Passage from Reference: 2	Expiration Date: 2018/7/31 Release Information: Quality Control Technologist: <u>Kieshia L. Negro</u> Release Date: 2018/9/1
--	---



Performance	
Macroscopic Features: Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters	Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)
ID System: MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 mm (1) Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): 28 - 37 mm (1) Oxacillin (1 mcg - Disk Susceptibility): 18 - 24 mm <div style="text-align: center;">  Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE </div>

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

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

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



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

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



TESTING CERT #2655.01

Bruker Daltonik MALDI Biotyper Classification Results



Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

Meaning of Consistency Categories (A – C)

Category	Description
A	Species Consistency: The best match <u>was classified</u> as 'green' (see above). Further 'green' matches are of the <u>same</u> species as the first one. Further 'yellow' matches are at least of the same genus as the first one.
B	Genus Consistency: The best match <u>was classified</u> as 'green' or 'yellow' (see above). Further 'green' or 'yellow' matches have at least the same genus as the first one. The conditions of species consistency <u>are not fulfilled</u> .
C	No Consistency: Neither species nor genus consistency (Please check for synonyms of names or microbial <u>mixture</u>).

Analyte Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus
Analyte Description: 0360
Analyte ID: 360-283
Analyte Creation Date/Time: 2016-08-22T12:47:59.700kn
Applied MSP Library(s): BDAL, Mycobacteria Library (bead method), Filamentous Fungi Library 1.0, IVD, Listeria
Applied Taxonomy Tree:

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	Staphylococcus aureus <u>ssp.</u> aureus DSM 20231T DSM	2.298	46170
2 (++)	Staphylococcus aureus <u>ssp.</u> aureus DSM 20232 DSM	2.279	46170
3 (++)	Staphylococcus aureus ATCC 29213 THL	2.264	1280
4 (++)	Staphylococcus aureus ATCC 33882 THL	2.232	1280
5 (++)	Staphylococcus aureus ATCC 25923 THL	2.227	1280
6 (++)	Staphylococcus aureus <u>ssp.</u> aureus DSM 4910 DSM	2.222	46170
7 (++)	Staphylococcus aureus <u>ssp.</u> aureus DSM 348 DSM	2.175	46170
8 (++)	Staphylococcus aureus ATCC 33591 THL	2.16	1280
9 (++)	Staphylococcus aureus <u>ssp.</u> aureus DSM 799 DSM	2.112	46170
10 (++)	Staphylococcus aureus <u>ssp.</u> aureus DSM 20491 DSM	2.108	46170

Comments:

N/A

ANEXO 16: EVIDENCIAS DEL TRABAJO DE CAMPO

Figura 4: ACTIVACIÓN DE LA CEPA Y PREPARACIÓN DEL INOCULO DE TRABAJO

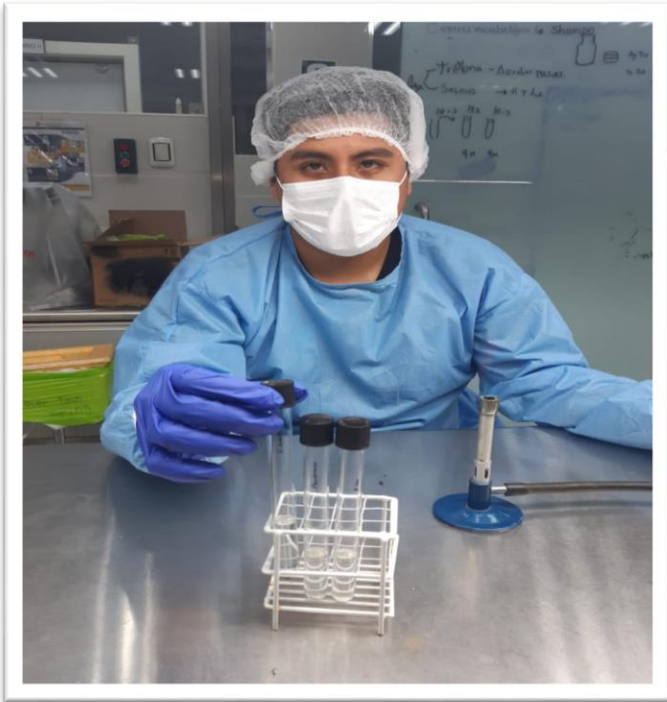


Figura 5: PREPARACIÓN DE POZOS EN PLACAS

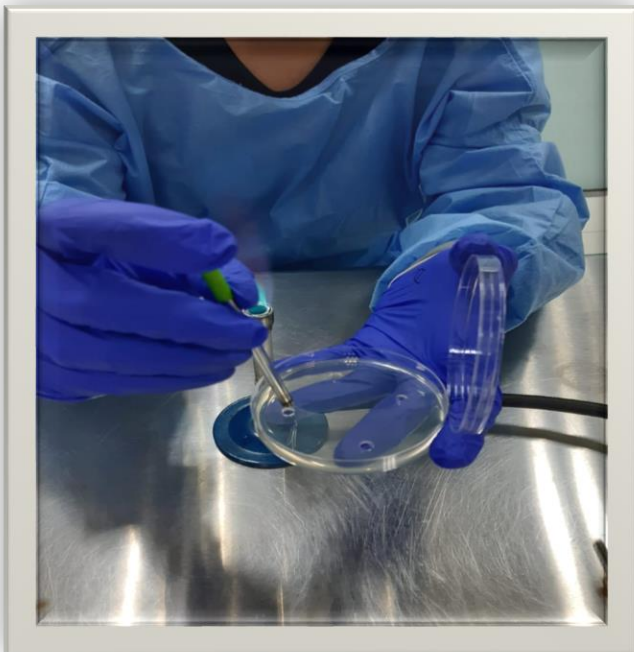


Figura 6: MEDICIÓN DE LOS HALOS DE INHIBICIÓN

