



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



Efecto inhibitorio *in vitro* de los extractos etanólicos de *Rubus robustus* (Mora) frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y evaluación de su toxicidad sobre *Artemia salina* (Camarón de salmuera)

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN
BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA

AUTORAS:

Bach. Danelly Lisbeth Muñoz Heredia

Bach. Judith Paola Zeta Herrera

ASESOR:

MSc. Mario Cecilio Moreno Mantilla

LAMBAYEQUE, PERÚ

2023

Efecto inhibitorio *in vitro* de los extractos etanólicos de *Rubus robustus* (Mora) frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y evaluación de su toxicidad sobre *Artemia salina* (Camarón de salmuera)

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN BIOLOGÍA – MICROBIOLOGÍA – PARASITOLOGÍA

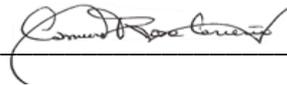
APROBADA POR:

Dra. Martha Arminda Vergara Espinoza



PRESIDENTA

Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán



SECRETARIA

Lic. Julio César Silva Estela



VOCAL

MSc. Mario Cecilio Moreno Mantilla



ASESOR

LAMBAYEQUE, PERÚ 2023

DEDICATORIA

DE: JUDITH PAOLA ZETA HERRERA

El siguiente trabajo investigativo le brindo principalmente a Dios, por ser el inspirador y darme fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más codiciados. A nuestros padres, por su amor, trabajo y sacrificio en todo este tiempo, gracias a ustedes he logrado llegar hasta aquí y convertirme en lo que soy.

A mis hermanas por estar siempre a mi lado, acompañándome y por el apoyo moral, que me brindaron a lo largo de esta etapa de mi vida. A todas las personas que me han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que nos abrieron las puertas y colaboraron con sus conocimientos.

DE: DANELLY LISBETH MUÑOZ HEREDIA

La presente tesis está dedicada a nuestro Creador, quien guía mis pasos, cuidándome y protegiéndome, dándome fuerzas para continuar y lograr mis objetivos; a mis padres Víctor Alfredo Muñoz Vega y Mary Aydee Heredia Quiroz por darme ese apoyo incondicional, esa motivación e impulso para seguir adelante. A cada uno de mis familiares, que confiaron en mí, dándome esas palabras de aliento que necesitaba para lograr esta meta.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios por honrarnos con la vida, por guiarnos a lo largo de nuestra existencia, ser el sostén y por fortalecernos en aquellos momentos de duda y de agotamiento. Gracias a nuestros Padres por ser los primordiales inspiradores de nuestros sueños, por confiar y creer en nuestras expectativas, por los consejos, valores y principios que nos han inculcado.

Nuestro más sincero agradecimiento a los docentes de Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, por haber intervenido con sus conocimientos a lo largo de la preparación de nuestra profesión, de manera especial a Mario Moreno Mantilla, asesor de nuestro proyecto de investigación quien nos ha guiado con su paciencia, y su integridad como docente.

RESUMEN

En la actualidad, las infecciones bacterianas provocadas por *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* han provocado los peores pronósticos de supervivencia a estas en países subdesarrollados tanto socialmente como económicamente. El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto inhibitorio *in vitro* de los extractos etanólicos de *Rubus robustus* (Mora) frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa* y evaluar su toxicidad sobre *Artemia salina* (Camarón de salmuera). El estudio fue de tipo experimental en el cual se utilizaron tres cepas de cada especie bacteriana que fueron enfrentadas con cinco concentraciones del extracto, utilizando tallos, hojas y raíces de la planta en mención, considerando tres repeticiones por cepa se totalizaron 270 unidades experimentales. Para probar el efecto inhibitorio se empleó el método Kirby-Bauer, utilizando discos de papel filtro Whatman N°1 embebidos con las concentraciones de los extractos. Para el caso de la toxicidad, se trabajó con 30 nauplios de *A. salina* por cada concentración de extracto, tomando 10 especímenes por repetición. En los resultados se encontró que, los extractos etanólicos de *R. robustus* inhibieron a *S. aureus* y *P. aeruginosa*, siendo el extracto de hojas el de mayor efecto, seguido del de tallos y por último el de raíces. Por otro lado, la concentración letal 50 (CL₅₀) de los extractos etanólicos tallos y hojas de *R. robustus* frente al camarón de salmuera mostraron valores de 3034,82 mg/ml y 2885,58 mg/ml respectivamente.

Palabras clave: Efecto inhibitorio, *Rubus robustus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, Toxicidad, *Artemia salina*.

ABSTRACT

At present, bacterial infections caused by *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* have caused the worst survival prognoses in underdeveloped countries, both socially and economically. The objective of this research was to determine the *in vitro* inhibitory effect of ethanolic extracts of *Rubus robustus* (Mora) against *S. aureus* and *P. aeruginosa* and to evaluate its toxicity on *Artemia salina* (Brine Shrimp). The study was of an experimental type in which three strains of each bacterial species were used, which were confronted with five concentrations of the extract, using stems, leaves and roots of the plant in question, considering three repetitions per strain, totaling 270 experimental units. To test the inhibitory effect, the Kirby-Bauer method was used, using Whatman No. 1 filter paper discs embedded with the concentrations of the extracts. In the case of toxicity, 30 *A. salina* nauplii were used for each extract concentration, taking 10 specimens per repetition. In the results it was found that the ethanolic extracts of *R. robustus* inhibited *S. aureus* and *P. aeruginosa*, with the leaf extract having the greatest effect, followed by the stems and finally the roots. On the other hand, the lethal concentration 50 (LC₅₀) of the ethanolic extracts of *R. robustus* stems and leaves against brine shrimp showed values of 3034.82 mg/ml and 2885.58 mg/ml respectively.

Keywords: Inhibitory effect, *Rubus robustus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, Toxicity, *Artemia salina*.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	iv
TABLA DE CONTENIDOS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	4
2.1. Antecedentes bibliográficos	4
2.2. Base teórica	8
III. MATERIALES Y MÉTODOS	12
3.1. Tipo de investigación y diseño de contrastación de hipótesis	12
3.2. Población y muestra	12
3.3. Métodos, técnicas e instrumentos	13
3.4. Materiales	13
3.5. Procedimiento	14
3.6. Análisis de datos	22
IV. RESULTADOS	23
4.1. Resultados del efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de <i>Rubus robustus</i> (Mora) frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	23
4.2. Análisis de varianza (ANOVA) de los halos de inhibición de los extractos etanólicos de <i>R. robustus</i> (Mora) y sus concentraciones frente a las cepas de <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i>	27
4.3. Evaluación de la toxicidad del extracto etanólico de <i>Rubus robustus</i> (Mora) frente a <i>Artemia salina</i> (Camarón de salmuera)	30
V. DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	39
RECOMENDACIONES	40
REFERENCIAS	41
ANEXOS	48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Concentraciones de <i>Rubus robustus</i> para el efecto inhibitorio.	18
Tabla 2 Concentraciones de <i>Rubus robustus</i> para el Bioensayo de toxicidad.....	21
Tabla 3 Promedios de halos de inhibición de las cepas de <i>S. aureus</i> por efecto de los extractos etanólicos de <i>Rubus robustus</i> (Mora).....	24
Tabla 4 Promedios de halos de inhibición de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> por efecto de los extractos de <i>Rubus robustus</i> (Mora).	25
Tabla 5 Análisis de Varianza (ANOVA) de los halos de inhibición (mm) generados en las cepas de <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> por efecto de los extractos etanólicos de <i>R. robustus</i> (Mora) a diferentes concentraciones.....	28
Tabla 6 Prueba de significancia de Tukey de los promedios de halos de inhibición de <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i>	28
Tabla 7 Prueba de significancia de Tukey de los promedios de halos de inhibición de según el tipo de cepa de <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i>	29
Tabla 8 Prueba de significancia de Tukey de los promedios de halos de inhibición según la concentración de los extractos etanólicos de <i>R. robustus</i> (Mora).....	30
Tabla 9 Prueba de significancia de Tukey de los promedios de halos de inhibición según el tipo de extracto etanólico de <i>R. robustus</i> (Mora).	30
Tabla 10 Recuento de mortalidad de <i>Artemia salina</i> frente a las concentraciones de extracto etanólico de los tallos de <i>Rubus robustus</i> (Mora).	31
Tabla 11 Recuento de mortalidad de <i>Artemia salina</i> frente a las concentraciones de extracto etanólico de hojas de <i>Rubus robustus</i> (Mora).....	32
Tabla 12 Concentración letal 50 (CL50) de los extractos etanólicos de tallos y hojas de <i>Rubus robustus</i> (Mora) frente a <i>Artemia salina</i> (Camarón de salmuera).	33

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	14
Figura 2 Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15
Figura 3 Recolección de flores, frutos, hojas ,tallos y raíces de <i>Rubus robustus</i>	16
Figura 4 Concentraciones de los extractos etanólicos de hojas (A), tallos (B) y raíces (C) de <i>Rubus robustus</i>	17
Figura 5 Cistos de <i>Artemia salina</i> obtenidos comercialmente.....	20
Figura 6 Halos de inhibición generados por el extracto etanólico de <i>Rubus robustus</i> frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	26
Figura 7 Halos de inhibición generados por el extracto etanólico de <i>Rubus robustus</i> frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	26

I. INTRODUCCIÓN

Recientemente se ha originado un incremento en las cifras de muertes y discapacidades ocasionadas por las infecciones respiratorias, que han afectado a más de 190 países en el mundo, evidenciando, que los peores pronósticos de supervivencia a estas enfermedades se observan en países subdesarrollados tanto socialmente como económicamente, considerando como factores de riesgo el tabaquismo, la contaminación ambiental y los índices de masa corporal (IMC) elevados de las personas. Además, en el mundo, las enfermedades respiratorias siguen siendo un problema de salud pública, con una estimación aproximada de 4 millones de fallecimientos en el año 2017, representando el 7% de todas las muertes a nivel mundial (Infosalud, 2018).

Sabiendo ello, una de las causas más habituales de padecer este tipo de infecciones son la presencia de microorganismos, en especial, de bacterias como lo son *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, encontrando que el primer microorganismo en mención, ha causado cuadros de neumonía en distintos países como Corea, Grecia, Colombia y Estados Unidos, siendo más frecuente en el país oriental con una prevalencia de más del 50% (Carballo et al., 2017). Por otro lado, *P. aeruginosa* ha causado infecciones a nivel de los bronquios en países europeos mostrando más del 50% de cultivos positivos para muestra de pacientes enfermos de las vías respiratorias (Cantón et al., 2015).

En Perú, la situación de las enfermedades respiratorias de vías inferiores ha sido considerada como la primera causa de muerte en ese país hasta el año 2016, aunque hubo una reducción de la mortalidad por dicho tipo de infecciones, no ha dejado de ser un inconveniente de salud pública en ese país, hallando evidencias de que *P. aeruginosa* y *S. aureus* presentaban

una frecuencia en infecciones respiratorias de 31,5% y 12,6% respectivamente (Aquino et al., 2017).

En la región Lambayeque de Perú, hay reportes que demuestran la elevada frecuencia de aislados de muestras nasofaríngeas de *S. aureus* la cual fue de 92,9% (Aguilar et al., 2015). Por otro lado, *P. aeruginosa*, se ha aislado de muestras de pacientes hospitalizados en la mencionada región, con una frecuencia de 13,3%, siendo menor que la anterior bacteria. Aun así, ambas representan problemas en pacientes por infecciones respiratorias, a tal punto de llevar a hospitalización prolongada en unidades de cuidados intensivos (UCI) (Aguilar et al., 2016).

Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, *Rubus robustus* (Mora) es una especie de zarzamora muy habitual en países como Ecuador, Colombia y Perú, cuyos frutos contienen generalmente altos niveles de compuestos fenólicos, entre ellos antocianinas y elagitaninos, reconocidas por su potencial nutraceutico, antioxidante y protectoras para la salud. El uso de diversas especies de *Rubus* se reporta en la medicina tradicional de China, India, Europa y de las Américas. En el caso de *R. robustus* se reporta una buena acción antioxidante, la cual se relaciona directamente con la presencia de compuestos fenólicos y antocianinas en los frutos, lo que le brinda también un alto potencial antimicrobiano. Cabe destacar, entre otras propiedades de esta especie vegetal, los extractos de sus frutos deshidratados tienen un alto potencial de inhibir procesos enzimáticos relacionados al envejecimiento de la piel, y pueden considerarse en la preparación de cosméticos naturales (Fundación Agro Diversidad Andina [AGRODIVA], 2017).

Ante los problemas de salud evidentes, *R. robustus*, ha sido muy pocas veces investigado en relación a su actividad antimicrobiana, tanto identificando sus metabolitos

esenciales como analizando su efecto inhibitor sobre bacterias, hongos y otros microorganismos. Por ello se propuso lo siguiente: ¿Tienen efecto inhibitorio *in vitro* los extractos etanólicos de *Rubus robustus* (Mora) frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*? y ¿Los extractos etanólicos de *Rubus robustus* (Mora) presentan toxicidad sobre *Artemia salina* (Camarón de salmuera)?

Considerando las hipótesis propuestas de que los extractos etanólicos de *R. robustus* (Mora) tuvieran efecto inhibitorio *in vitro* frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa* y que los extractos etanólicos de *R. robustus* (Mora) no tienen efecto tóxico sobre *A. salina* (Camarón de salmuera), se planificó y ejecutó el presente estudio teniendo como objetivos determinar el efecto inhibitorio *in vitro* de los extractos etanólicos de *R. robustus* (Mora) frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*, a diferentes concentraciones y de extractos de diferentes partes de la planta, además de evaluar la toxicidad de los extractos etanólicos de *R. robustus* (Mora) sobre *A. salina* (Camarón de salmuera), a diferentes concentraciones y de extractos de diferentes partes de la planta. Con la presente investigación se pretende ampliar el conocimiento acerca de la especie vegetal ya mencionada y dilucidar acerca de su eficacia inhibitoria sobre organismos bacterianos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes bibliográficos

Grabek & Wojtowicz, (2014) determinaron la actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, sensibles y resistentes a meticilina utilizando extractos de *Rubus plicatus* y *R. idaeus* aplicando el método de difusión en placa. En los resultados se observó que, todos los extractos probados de frutas y hojas mostraron inhibición frente a la totalidad de las cepas, siendo la actividad antibacteriana más fuerte la del extracto de hojas. La inhibición bacteriana más fuerte se observó frente a las cepas de cultivo de colección, menor frente a cepas directamente aisladas de las heridas de los pacientes. Además, el extracto de hoja de *R. idaeus* exhibió actividades antibacterianas más fuertes que los extractos de hojas de *R. plicatus*.

Oliveira et al., (2016) determinaron el efecto antimicrobiano por el extracto fenólico de *R. rosaefolius* a concentraciones de 5902.8, 2951.4, 1475.4, 983.8 y 737.8 mg GAE/L mediante ensayo de difusión en placa utilizando bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens*, *Salmonella spp.*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*, obteniendo como resultado, la inhibición de todas las especies mencionadas al menos en dos concentraciones de extracto, siendo la bacteria más susceptible *P. fluorescens* en la cual se mostró halo de inhibición de 7,2 mm a la concentración más baja, asimismo, la segunda bacteria más inhibida fue *Salmonella spp.* con halo de inhibición de 10,0 mm a la concentración intermedia.

Prasanth & Chandran, (2017) evaluaron distintos extractos etanólicos de las especies *R. ellipticus*, *R. niveus*, *R. racemosus* y *R. rugosus* para determinar su actividad antimicrobiana y antifúngica en especies como *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *C. krusei* y *Trichoderma lignorum* mediante el método de difusión en placa. En los

resultados se evidenció que los extractos de las especies en estudio a una concentración de 40 mg/ml inhibieron la totalidad de los microorganismos a excepción de *Aspergillus flavus*, siendo *S. aureus* la bacteria más inhibida con una zona inhibitoria de 27,5 mm y *C. krusei* el hongo más inhibido con un halo inhibitorio de 22,5, para las especies de *Rubus ellipticus* y *Rubus rugosus*.

Hajaji et al., (2017) analizaron la actividad del extracto metanólico de *R. ulmifolius* Schott frente a cepas bacterianas como *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus agalactiae* y *C. albicans*, empleando el método de difusión en placa, utilizando la concentración de 15ul del extracto, obteniendo como resultado la inhibición de la totalidad de cepas bacterianas, siendo *S. agalactiae* la que presentó mayor halo de inhibición con 50,0 mm, seguida de *S. aureus* con 39,0 mm y *C. albicans* también con 39,0 mm, asimismo, la especie microbiana que presentó menor halo inhibitorio fue *E. faecium* con 16,0 mm.

Cetojevic et al., (2017) analizaron la actividad antimicrobiana del orujo de la mora (*R. fruticosus*) obtenido después de la separación del jugo de dos cultivares, en bacterias Gram positivas, Gram negativas y especies de hongos utilizando el método de difusión en placa. Se observó que la mayor inhibición se dio en la especie bacteriana *B. cereus* con un halo inhibitorio de 19,5 mm seguida de *Salmonella sp.* con un halo de 19,3 mm y *E. coli* con un halo de 17 mm, asimismo se evidenció que las cepas con menor zonas de inhibición fueron *S. aureus* con 11 mm, seguido de una cepa de *E. coli* silvestre con 13,5 mm y *P. aeruginosa* con 14,5 mm; además se encontró, que las cepas fúngicas *Saccharomyces cerevisiae* y *C. albicans* no fueron inhibidas.

Polischuk et al., (2019) estudiaron la actividad antimicrobiana del jugo de la especie *R. idaeus* mediante el método de difusión sobre agar en placa, mostrando efecto sobre *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis* y *C. albicans*. Además, la actividad antimicrobiana del jugo fue más alta que el antibiótico de control Clorofilipt manifestando un efecto en más del doble con respecto a las cepas microbianas en estudio, destacando, que el mayor efecto se manifestó en relación en la especie *S. aureus* con un promedio de halo de inhibición de 23 mm seguida de *B. subtilis* con 22,7 mm y *C. albicans* con 20,3 mm.

Weli et al., (2020) prepararon extractos de hojas de *R. fruticosus* utilizando hexano, cloroformo, acetato de etilo y disolventes hidroalcohólicos. Empleando el método de difusión en placa analizaron la actividad antibacteriana frente a bacterianas Gram positivas como *Enterococcus faecalis* y *S. aureus* y bacterias Gram negativas como *E. coli* y *Haemophilus influenzae*. Por otro lado, la actividad citotóxica se llevó a cabo contra el camarón de salmuera utilizando el método de los nauplios. Los resultados obtenidos para varios experimentos demuestran que el número total de extractos produce una actividad antibacteriana de moderada a fuerte contra todas las bacterias, siendo la mejor actividad la del extracto hidroalcohólico en todas las concentraciones, mientras que la zona de inhibición existe en el rango de 6 a 11 mm. Además, la prueba de actividad citotóxica confirma que los extractos hidroalcohólicos tienen la máxima toxicidad para los valores de concentración letal media (CL₅₀) (4,68–6,96 µg / ml), donde los valores de CL₅₀ para todos los extractos se sitúan en el rango de 4,68–6,96 µg / ml.

Junior et al., (2021) determinaron el efecto antimicrobiano de extractos no polares fenólicos de mora (*R. fruticosus*) utilizando bacterias como *E. coli* y *S. aureus* empleando la concentración mínima inhibitoria (CMI) según la técnica de placa de microdilución, con microplacas de 96 pocillos. Los extractos se probaron en concentraciones de 3,33, 1,67, 0,83 y

0,42 $\mu\text{g/L}$ para las dos bacterias en estudio. Los porcentajes de inhibición del extracto de mora con respecto a *E. coli* mostraron valores de 99%, 63%, 34% y 33% de mayor a menor concentración de extracto y para el caso de *S. aureus*, los índices de inhibición del extracto de mora fueron 91% y 33% solamente para las concentraciones de 3,33 y 1,67 $\mu\text{g/L}$, respectivamente.

Yousefbeyk et al., (2021) estudiaron las actividades citotóxicas y antibacterianas de extractos totales y diferentes fracciones de las raíces y hojas de *R. hyrcanus*, utilizando el método de concentración mínima inhibitoria (CIM). En los resultados se pudo evidenciar que, la fracción de metanol de la raíz y la fracción de metanol de hojas mostraron potentes actividades antibacterianas contra *B. subtilis* y *S. aureus* (CIM: 1,5 mg/ml). Para el caso de la citotoxicidad, se empleó el ensayo MTT, encontrando que las fracciones de acetato de etilo de las raíces y hojas exhibieron los mejores valores de citotoxicidad siendo las cifras de concentración inhibitoria media (CI_{50}) de 247 $\mu\text{g/ml}$ y 227 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

Veličković et al., (2021) exploraron las propiedades antimicrobianas y conservante de frutas silvestres de *Rubus discolor* extraídas para luego disolverlas en metanol, etanol, acetona y agua, empleando la CMI. En los resultados se encontró que, los extractos examinados mostraron actividad antimicrobiana, siendo más efectivos contra los microorganismos Gram positivos que los Gram negativos, siendo *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium* las especies más susceptibles, respectivamente mostrando una CMI de 1,2 mg/ml para ambos casos. Además, *Candida glabrata* fue la especie más susceptible entre las levaduras patógenas, también con una CMI de 1,2 mg/ml.

2.2. Base teórica

Medicina tradicional

Es el conjunto de conocimientos, técnicas y procedimientos, basados en teorías, creencias y experiencias oriundas de diversas culturas, necesarios para el mantenimiento sanitario, así como para la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades. En algunos países, los términos de medicina complementaria, alternativa, no convencional y tradicional se usan indistintamente (Zhang, 2000).

Extracto etanólico

Extracto adquirido a partir de materia prima vegetal desecada, ya sea por maceración o percolación en contacto con etanol, seguida de remoción del solvente por un proceso físico. Este tipo de extracto tiene un olor característico, además son parcialmente solubles en agua y en ocasiones completamente insolubles, especialmente extractos elaborados con alcohol altamente concentrado. Los extractos alcohólicos elaborados con hojas dan como resultado soluciones de color verde, ya que la excreción de clorofila no puede tener lugar por completo (Lizcano & Vergara, 2008).

Aspectos botánicos de *Rubus robustus*

Planta vigorosa con gruesos tallos ascendentes de 1 a 3 m de longitud. Crece en áreas con bosques altoandinos y sub-páramo en vegetación abierta o sombra moderada y a lo largo de las carreteras; coloniza arbustos y áreas en recreación ecológica por semillas diseminadas por aves u otros animales, y se disemina localmente por brotes incidentales de rizomas y raíces.

Tallo poligonal con pubescencia blanquecina; normalmente sin glándulas, aunque a menudo se encuentran glándulas en tallos jóvenes. Estípulas pubescentes, lineares lanceoladas de 14-20 mm de largo y 3-4 mm de ancho. Hojas generalmente de 3 foliares y 5 foliares; los pecíolos del folíolo central miden 1-3 cm de largo, los laterales aproximadamente 0.5 a 2 cm de largo. Forma elíptica-lanceolada de los folíolos de 5 a 15 cm de largo, generalmente son 2-3 veces más largo que ancho; ápice agudo, base obtusa, borde aserrado fino. Haz de la hoja verde oscura, glabra con escasa pubescencia en la vena principal; envés con pubescencia blanco transparente sobre todo en las venas (Hummer & Peacock, 1994). Inflorescencias en racimos grandes con 25 a 40 flores; pedúnculos con espinas y pubescencia fina; cada flor mide de 1.5 a 2.0 cm de diámetro y tiene 5 sépalos, 5 pétalos y numerosos estambres. Sépalos ovado-trianguulares con ápice acuminado, pubescencia verdosa; los sépalos alcanzan un 50-60% del largo de los pétalos. Pétalos de color blancos con el borde rosado o de color rosada, obovados con ápice obtuso, de 5-8 mm de largo y 4-6 mm de ancho. El fruto es una polidrupa (un agregado de drupéolos); los frutos jóvenes son verdes a morado, los frutos maduros tienen un color rojo oscuro a negro y una forma cónica de 2-3 cm de longitud y 1.5-2cm de diámetro. Cada drupéolo del fruto mide 1-1.5 mm de diámetro y contiene una semilla de tamaño pequeño (1,5 a 1,8 mg/semilla) (Thompson, 1997).

Etnobotánica de *Rubus robustus*

Se reporta el uso de los frutos u otras partes de la planta en la medicina tradicional en combinación con otras plantas curativas para tratar problemas pulmonares como alergia, asma, bronquitis y gripe en Perú y Ecuador; además; destacando algunos ensayos a nivel de laboratorio que confirman efectos antimicrobianos de extractos de hojas de *R. robustus* (Bussmann et al., 2010).

Staphylococcus aureus

Desde que fue descubierta por Alexander Ogston en 1880, esta bacteria es considerada un patógeno con gran potencial infeccioso en animales y el humano. Además, es una de las especies de las Gram positivas, considerada la más virulenta, responsable de varias enfermedades, que van desde infecciones de la piel y tejidos blandos hasta infecciones graves. Esta bacteria puede ser resistente a antibióticos, en especial, a la meticilina. A través de los años se ha incrementado la tasa de mortalidad y morbilidad a pesar del gran número de antibióticos disponibles. *S. aureus* puede formar parte de nuestra microbiota, más o menos del 25 y 50% de la población sana muestra colonización por este microorganismo, representando un riesgo por su propagación. En los hospitales, las zonas de más riesgo para las infecciones con esta bacteria, son las salas de neonatos, los quirófanos, los servicios de cuidados intensivos y las salas de quimioterapias. La introducción masiva de *S. aureus* “epidémico” en estos lugares pueden ocasionar patologías clínicas importantes en el tracto respiratorio (Cervantes et al., 2014).

Pseudomonas aeruginosa

Las infecciones causadas por esta bacteria, son una gran preocupación en los hospitales, debido a que muchas son resistentes a diferentes antibióticos y muchos pacientes se contaminan con la *Pseudomonas aeruginosa*. El principal problema que es la aparición de cepas farmacorresistentes. Por consiguiente, en la actualidad se persigue muchos enfoques o nuevas alternativas para contrarrestar a esta bacteria Gram negativa. También se analiza los mecanismos asociados con la resistencia de *P. aeruginosa*, ya que es un patógeno que presenta un grande genoma y puede desarrollar una gran variedad de factores asociados con la resistencia a los antibióticos que involucran a casi todos los tipos de antibióticos. Se discuten

los enfoques clínicos para pacientes con neumonía asociada al ventilador, bacteriemia e infecciones. *P. aeruginosa* es el principal microorganismo intrahospitalario patógeno y su control es parecido a otros agentes intrahospitalarios. Su reproducción se da en medios húmedos, sin embargo, se debe de prestar mucha atención a los lavados, regaderas, las tinas de agua caliente, calentadores de agua y otras zonas húmedas (Bassetti et al., 2018).

Artemia Salina

Son camarones pequeños, de cuerpo blando, de color carmelita y transparentes a la luz; pertenecen al Phylum Arthropoda, clase Crustaceae, subclase Branchiopoda. Se les conoce con el nombre de artemia, llamados también “monos de mar” o “brine shrimp” en inglés. Estas especies lo podemos encontrar en todo el mundo y pueden vivir en diferentes concentraciones de salinidades de agua, de la misma manera pueden crecer a temperaturas entre 6 y 35°C. Se alimentan de algas y bacterias y son una fuente de alimento para peces, aves y diversos invertebrados (Pino & Jorge, 2010).

A. salina adulta suele tener un tamaño de alrededor de 8-10 mm, logrando alcanzar hasta 15 mm dependiendo de su entorno. Posee un cuerpo alargado dividido en al menos 20 segmentos y unido a su tronco hay alrededor de 10 conjuntos de apéndices planos, parecidos a hojas, llamados filopodios, que se mueven simétricamente. Las hembras producen huevos de los cuales eclosionan larvas de aproximadamente 1 mm de tamaño en condiciones externas favorables. Los huevos se transforman en quistes y permanecen así durante un año o más. Las artemias llegan a la fase adulta transcurridas 6 a 8 semanas. Hasta la fecha, *Artemia* es el único género animal en el mundo cuyo estado criptobiótico (quistes) está permanentemente disponible de manera comercial, como fuente de alimento para peces y mariscos en acuicultura. Este ha sido un elemento clave en ensayos biológicos (Pino & Jorge, 2010).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Tipo de investigación y diseño de contrastación de hipótesis

El presente trabajo de investigación es de tipo experimental, analítico, prospectivo y longitudinal (Argimon & Jiménez, 2013). El diseño de contrastación de hipótesis es el de estímulo creciente (Alvitres, 2000), teniendo como variable independiente las concentraciones de los extractos etanólicos de *Rubus robustus* y como variable dependiente el efecto inhibitorio en las especies de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, además de la población afectada de *Artemia salina*.

3.2. Población y muestra

La población estuvo conformada por cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de muestras clínicas en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Regional Lambayeque (HRL); el material botánico estuvo compuesto por hojas, tallos y raíces de *Rubus robustus*, y se emplearon flor, frutos, hojas y tallos para su identificación en el Herbario Pedro Ruiz Gallo – UNPRG y por último cistos de *Artemia salina* “Camarón de salmuera” obtenidos comercialmente.

La muestra para determinar el efecto inhibitorio fue 90, valor obtenido de la interacción entre tres cepas de dos especies bacterianas *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* con cinco concentraciones del extracto etanólico de *Rubus robustus*, teniendo en cuenta tres tipos de extractos provenientes de raíz, tallo y hojas de la especie vegetal (3x2x5x3), considerando tres repeticiones por cada cepa, obteniendo 270 unidades experimentales.

Para el caso de la toxicidad, la muestra estuvo conformada por ocho concentraciones de extractos etanólicos de *Rubus robustus* considerando tres tipos de extractos provenientes de

raíz, tallo y hojas de la especie vegetal a las cuales se agregó diez metanauplios de *Artemia salina* (8x3x10) obteniendo una muestra de 240. De cada muestra se realizó tres repeticiones teniendo en total 720 unidades experimentales.

3.3. Métodos, técnicas e instrumentos

Para ejecutar este trabajo se empleó como método la observación directa sobre la falta de crecimiento (si existe inhibición) o el crecimiento normal de *S. aureus* y *P. aeruginosa* y se procedió a evaluar el rango de inhibición del crecimiento de las bacterias en mención. Luego se usó instrumentos para su posterior registro como fichas de resultados, teléfono móvil y fichas de muestreo, entre otros.

Para determinación de la toxicidad de los extractos etanólicos se utilizó como método la observación directa frente a una luz para evaluar la movilidad de los metanauplios. Se contaron los metanauplios vivos y muertos. Luego se emplearon instrumentos para su posterior registro como fichas de resultados, teléfono móvil y fichas de muestreo, entre otros.

3.4. Materiales

Material Botánico

Las hojas, tallos y raíces de *Rubus robustus* recolectados en provincia de Cutervo – Cajamarca. Además, se recolectó hojas, fruto, flor y tallo para su identificación taxonómica respectiva en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional “Pedro Ruiz Gallo” (Anexo 1).

Material biológico y microbiológico

Las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de muestras clínicas en el Laboratorio de Bacteriología del Hospital Regional Lambayeque (HRL).

Cistos de *Artemia salina* “Camarón de salmuera” obtenidos comercialmente.

3.5. Procedimiento

Identificación de las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*

Las cepas de *Staphylococcus aureus* (Figura 1) se sembraron en placas previamente estériles con Agar sangre (se observó las características propias de las colonias de *S. aureus*) (Anexo 2), para su identificación se realizó las pruebas de fermentación del manitol en aerobiosis (Anexo 3) y la prueba de coagulasa (Anexo 4).

Figura 1

Cepas de *Staphylococcus aureus*.



Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* (Figura 2) se sembraron en placas previamente estériles con Agar Cetrimide, para observar las características fenotípicas de la bacteria (Anexo 5), se empleó como pruebas de identificación al Citrato Simmons, TSI (Agar Triple Azúcar Hierro), Agar Trypticasa soya y tiras de oxidasa (Anexo 6).

Figura 10

Cepas de *Pseudomonas aeruginosa*



Obtención y preparación de las concentraciones de los extractos etanólicos de *Rubus robustus* (mora)

Material Botánico

Las muestras vegetales se obtuvieron en la provincia de Cutervo – Cajamarca, recolectando ejemplares de *Rubus robustus* que incluyeron hojas, fruto, flor y tallo para su identificación taxonómica respectiva en el Laboratorio de Botánica de la Facultad de Ciencias Biológicas de dicha universidad, además se recolectaron hojas, tallos y raíces de la planta para la obtención de los extractos etanólicos (Figura 3).

Figura 3

Recolección de flores, frutos, hojas ,tallos y raíces de *Rubus robustus*.



Selección y desinfección del material botánico

Se seleccionaron hojas, tallos y raíces que se encuentren enteras, libres de polvo y desarrollo de estructuras fúngicas macroscópicas (Anexo 7). Para la desinfección se realizó de dos a tres ciclos de lavado con abundante agua, posteriormente con una solución de hipoclorito de sodio al 0,5% de cinco a ocho minutos (Anexo 8).

Secado

Se eliminó la presencia de humedad como consecuencia del lavado empleando papel absorbente estéril, luego se colocó las muestras vegetales bajo sombra a temperatura ambiente por aproximadamente tres semanas para asegurar la total eliminación de agua (Anexo 9) (Vidaurre et al., 2007).

Obtención de los extractos etanólicos

Después del secado se procedió a triturar el material botánico en un mortero (Anexo 10). Luego las muestras de hojas, tallos y raíces se sumergieron en etanol 70° en proporción de 25% p/v (Anexo 11) y se dejaron macerar durante siete días en un frasco de vidrio, siempre en oscuridad (Anexo 12)

Pasados los siete días, el material vegetal se filtró con la ayuda de papel Whatman N°1 y un embudo (Anexo 13) para luego completar la sequedad del filtrado en estufa a 37°C empleando crisoles o placas Petri hasta lograr la evaporación y obtención del extracto (Anexo 14).

Preparación de las concentraciones de los extractos etanólicos.

Se preparó una solución madre empleando 20g del extracto obtenido y lo cual se diluyó en 20 mL de alcohol 40° haciendo una concentración final de 1000 mg/ml (Anexo 15). Partiendo de ella, se realizaron diluciones de los extractos etanólicos de hojas, tallos y raíces empleando agua destilada estéril como diluyente (Anexo 16), obteniendo las concentraciones de 100mg/ml, 200mg/ml, 300mg/ml, 400mg/ml y 500mg/ml (Figura 4).

Figura 4

Concentraciones de los extractos etanólicos de hojas (A), tallos (B) y raíces (C) de Rubus robustus (Mora).



Tabla 1

Concentraciones de Rubus robustus para el efecto inhibitorio.

Solución madre (ml)	Agua destilada estéril (ml)	Concentración (mg/ml)
1	0	500*
0.8	0.2	400
0.6	0.4	300
0.4	0.6	200
0.2	0.8	100

Nota: *Concentración de la solución madre.

Preparación y estandarización del inóculo bacteriano

Las cepas se sembraron en Agar Tripticasa Soya y se incubaron a 24 horas, se seleccionaron 1 o 2 colonias aisladas y se realizó una suspensión en solución salina estéril. La suspensión se estandarizó igualándolo con la turbidez del tubo N.º 0,5 del nefelómetro de Mac Farland (1.5×10^8 bacterias / ml, agregándole caldo) (INS, 2021).

Efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de *Rubus robustus* (Mora)

- **Preparación de los discos de sensibilidad**

Se empleó papel filtro Whatman N.º 1 y un perforador para obtener discos de 6 mm de diámetro, estos discos se colocaron en frascos de vidrio para ser esterilizarlos en autoclave a 15 lb de presión y 121°C por 15 minutos, para luego ser secados en el horno 80° C por 24 h.

Se utilizó una pinza estéril para impregnar los discos en las concentraciones (500, 400, 300, 200 y 100 mg/mL) de extracto etanólico hojas, tallos y raíces de *Rubus robustus* (Mora) y se dejó secar a temperatura ambiente por 5 minutos.

Como control negativo se tuvieron en cuenta a discos impregnados con 20 µl de alcohol 40° con la finalidad de determinar alguna sustancia contaminante en el papel filtro, medio de cultivo o diluyente que inhiba el crecimiento bacteriano afectando los resultados del estudio.

- **Ensayo según el método Kirby-Bauer (Clinical Laboratory Standard Institute [CLSI], 2012)**

Se preparó Agar Müller – Hinton que fue vertido en placas Petri de 10 cm obteniendo un grosor de 5 mm, lo requerido para realizar pruebas de sensibilidad.

Para el control de esterilidad se dejó 24 horas a temperatura ambiente; una vez pasado ese tiempo, se verificó que no haya crecimiento de colonias contaminantes.

Se sumergió un hisopo estéril en la suspensión estandarizada, rotando el hisopo varias veces presionando firmemente sobre la pared interior del tubo por encima del nivel del líquido para remover el exceso de inóculo e inocular sobre la superficie seca de la placa de Müller - Hinton, estriando en tres direcciones para asegurar una distribución homogénea del inóculo, dejándolas secar por 30 minutos antes de colocarles los discos impregnados con diferentes concentraciones de los extractos etanólicos de hojas , tallos y raíces de *Rubus robustus* (Mora) junto con los discos de control (Anexo 17). Estas placas se incubaron en estufa a 37°C por un periodo de 18 a 24 horas.

- **Lectura de los halos de inhibición**

Se realizó la lectura después de 18 – 24 horas de la siembra, mediante la observación y medición en milímetros (mm) de las zonas claras de inhibición del crecimiento bacteriano de las cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, para lo cual se utilizó una regla, registrándose los diámetros de estas zonas en una ficha de recolección de datos.

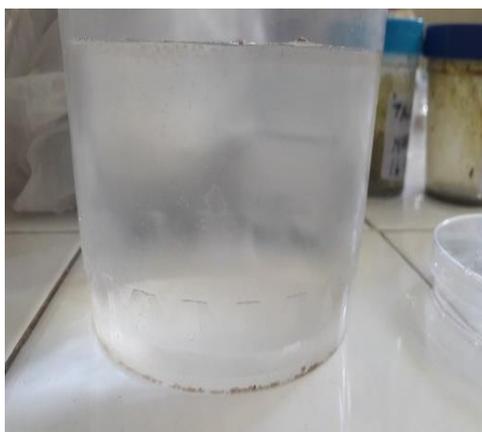
**Evaluación de la toxicidad de *Rubus robustus* (Mora) sobre *Artemia salina*
“Camarón de salmuera”**

- **Incubación de los huevos para la obtención de las larvas de *Artemia salina*
“Camarón de salmuera”**

Se obtuvo cistos de *Artemia salina* de manera comercial (Figura 5). Para el medio de cultivo de *A. salina*, se procedió a traer agua marina y se esterilizó en autoclave. Luego se colocó el agua de mar esterilizada a oxigenación mecánica por una hora a doble presión. Pasado el tiempo se colocaron los cistos a una fuente luminosa de aproximadamente de 400 Watts por 1 hora, luego fueron incubados a 25 °C por 24 horas de oscuridad. A las 24 horas de incubación, las larvas se encontraron en estado de instar I (Nauplius I). Pasada la incubación se colocaron los nauplios que se encuentran en estado instar I (recién nacidos) a una placa con medio fresco, y se incubaron a 25°C por 24 horas en oscuridad hasta que alcanzaron el estado de instar II. (Camarón de salmuera). Transcurridas las 24 horas estuvieron listas para ser utilizadas en el ensayo.

Figura 5

Cistos de Artemia salina obtenidos comercialmente.



- **Obtención de concentraciones para evaluar la toxicidad de *Artemia salina* “Camarón de salmuera”**

Para la preparación de la concentración se tomó en cuenta una solución madre de 1000 mg/mL de los extractos etanólicos de hojas, tallos y raíces de *Rubus robustus*. Luego se realizó la dilución respectiva para obtener las concentraciones de 50mg/mL, 100mg/mL 200mg/mL, 300 mg/mL, 400 mg/mL, 500 mg/mL, 750mg/mL y 1000mg/mL por cada extracto se retiró un volumen de solución madre, agregando agua de mar.

Tabla 2

Concentraciones de Rubus robustus para el Bioensayo de toxicidad.

Solución madre (mL)	Diluyente (mL)	Concentración (mg/mL)
10	0	1000
7.5	2.5	750
5	5	500
4	6	400
3	7	300
2	8	200
1	9	100
0.5	9.5	50

Volumen total: 10 mL = 100%; solución madre: 1000mg/mL; diluyente: agua de mar

- **Realización del bioensayo de toxicidad sobre *Artemia salina* “Camarón de salmuera”**

Se tuvo en cuenta la temperatura y el pH y para la realización del ensayo se expusieron 10 nauplios de *Artemia salina* (Camarón de salmuera) a las concentraciones de los extractos etanólicos de hojas, tallos y raíces de *Rubus robustus*, considerando un control y realizando tres réplicas. Fueron incubados por 24 horas a temperatura ambiente (Anexo 18).

Finalmente se contabilizó el número de nauplios muertos con la ayuda de un estereoscopio. Si los nauplios no presentaron movimiento luego de transcurrir 40 segundos de observación se consideraron como muertos.

3.6. Análisis de datos.

Los datos fueron procesados y analizados en el software estadístico SPSS v26. En el análisis estadístico de los datos se aplicó el análisis de varianza (ANOVA), para evaluar si hay diferencia entre las concentraciones de los extractos etanólicos de *R. robustus* y el efecto inhibitorio *in vitro* de las diferentes cepas, este análisis se complementó con la prueba de Tukey, a nivel de significancia 0,05 con la finalidad de evaluar la diferencia del efecto por dilución.

Los resultados se presentaron en tablas para poder comparar e interpretar la efectividad de los extractos etanólicos a distintas concentraciones, además de cuadros estadísticos.

Para el caso de la toxicidad en *Artemia salina*, se encontró el valor de Concentración Letal Media (CL₅₀) a las 24 horas de los nauplios empleando también el software estadístico SPSS v26, el cual calculó dicho valor con su respectivo intervalo de confianza.

RESULTADOS

4.1. Resultados del efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de *Rubus robustus* (Mora) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Se determinó que los extractos etanólicos de *Rubus robustus* (Mora) logró inhibir el crecimiento de las cepas de *S. aureus* donde el efecto inhibitorio presentó una relación directamente proporcional a las concentraciones de los productos vegetales, siendo a la mayor concentración (500 mg/ml) donde se mostró el mayor promedio de halo de inhibición (15,55 mm). Además, se evidenció que, el extracto etanólico a base de hojas de la especie botánica mostró mayor inhibición frente a las cepas en estudio, a la más alta concentración, seguido de los extractos de tallo, y en último lugar, los extractos de raíz de *R. robustus* (Tabla 3).

Sumado a lo anteriormente mencionado, los extractos etanólicos de *R. robustus* (Mora) también logró inhibir el crecimiento de las cepas de *P. aeruginosa* donde el efecto inhibitorio también presentó una relación directamente proporcional a las concentraciones de los productos vegetales, siendo a la mayor concentración (500 mg/ml) donde se mostró el mayor promedio de halo de inhibición (14,55 mm). Asimismo, se observó que, el extracto etanólico de hojas de la planta mostró mayor inhibición frente a dichas cepas, a la más elevada concentración, seguido de los extractos de tallo y los extractos de raíz de *R. robustus* (Tabla 4).

Tabla 3

Promedios de halos de inhibición de las cepas de S. aureus por efecto de los extractos etanólicos de Rubus robustus (Mora).

Concentración (mg/ml)	Tipo de extracto	Promedios de halos de inhibición (mm)			
		SA-1	SA-2	SA-3	Promedio
100	Hoja	12,33	10,33	12,00	11,55
	Tallo	11,00	11,00	10,00	10,67
	Raíz	6,63	6,43	6,60	6,55
200	Hoja	13,33	11,33	13,00	12,55
	Tallo	12,00	12,00	12,00	12,00
	Raíz	6,73	6,53	6,70	6,65
300	Hoja	14,33	12,33	14,00	13,55
	Tallo	13,00	13,00	13,00	13,00
	Raíz	6,83	6,63	6,80	6,75
400	Hoja	15,33	13,33	15,00	14,55
	Tallo	14,00	14,00	14,00	14,00
	Raíz	6,93	6,73	6,90	6,85
500	Hoja	16,33	14,33	16,00	15,55
	Tallo	15,00	15,00	15,00	15,00
	Raíz	7,03	6,83	7,00	6,95

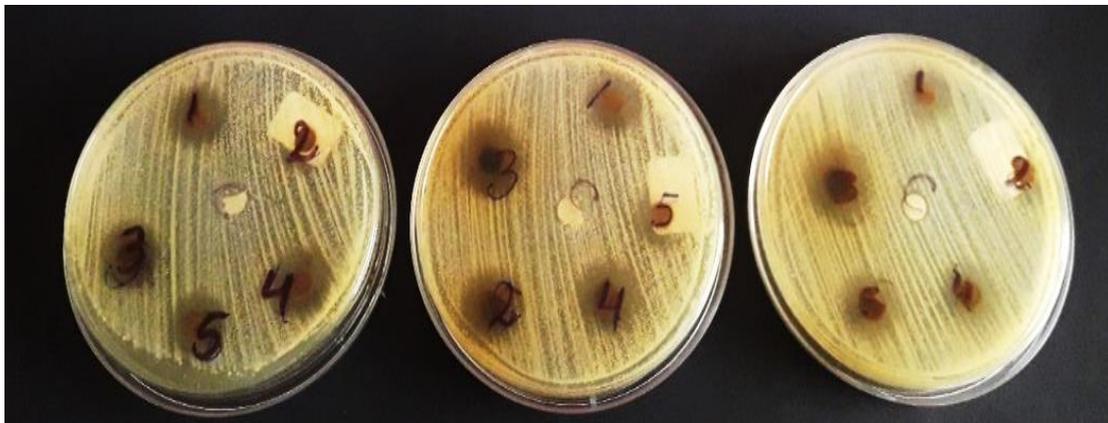
Tabla 4

Promedios de halos de inhibición de las cepas de P. aeruginosa por efecto de los extractos de Rubus robustus (Mora).

Concentración (mg/ml)	Tipo de extracto	Promedios de halos de inhibición (mm)			
		PA-1	PA-2	PA-3	Promedio
100	Hoja	10,33	11,33	10,00	10,55
	Tallo	10,00	9,67	10,00	9,89
	Raíz	6,43	6,53	6,50	6,49
200	Hoja	11,33	12,33	11,00	11,55
	Tallo	11,00	10,67	11,00	10,89
	Raíz	6,53	6,63	6,60	6,59
300	Hoja	12,33	13,33	12,00	12,55
	Tallo	12,33	11,67	12,00	12,00
	Raíz	6,63	6,73	6,70	6,69
400	Hoja	13,33	14,33	13,00	13,55
	Tallo	13,00	13,00	13,00	13,00
	Raíz	6,73	6,83	6,80	6,79
500	Hoja	14,33	15,33	14,00	14,55
	Tallo	14,00	14,00	14,00	14,00
	Raíz	6,83	6,93	6,90	6,89

Figura 6

Halos de inhibición generados por el extracto etanólico de Rubus robustus frente a Staphylococcus aureus.

**Figura 7**

Halos de inhibición generados por el extracto etanólico de Rubus robustus frente a Pseudomonas aeruginosa



4.2. Análisis de varianza (ANOVA) de los halos de inhibición de los extractos etanólicos de *R. robustus* (Mora) y sus concentraciones frente a las cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*

El ANOVA pudo comprobar la existencia de diferencias significativas en el efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de *R. robustus* (Mora) según las cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, las concentraciones de los extractos y el tipo de extracto (Tabla 5).

Se planteó como hipótesis lo siguiente:

H₀₋₁: No existen diferencias significativas en el efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de *R. robustus* (Mora) frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

H₀₋₂: No existen diferencias significativas en el efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de *R. robustus* (Mora) a distintas concentraciones.

H₀₋₃: No existen diferencias significativas en el efecto inhibitorio de los tipos de extracto etanólico de *R. robustus* (Mora).

H₀₋₄: No existen diferencias significativas en el efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de *R. robustus* (Mora) frente a las cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*.

Tabla 5

Análisis de Varianza (ANOVA) de los halos de inhibición (mm) generados en las cepas de S. aureus y P. aeruginosa por efecto de los extractos etanólicos de R. robustus (Mora) a diferentes concentraciones.

FV	SC	GL	CM	F	p-valor	Decisión
Modelo	2522,28	11	229,30	301,88	<0,0001	
Bacteria	31,35	1	31,35	41,27	<0,0001	Rechazar H ₀₋₁
Concentración	277,42	4	69,36	91,31	<0,0001	Rechazar H ₀₋₂
Tipo de extracto	2196,85	2	1098,43	1446,11	<0,0001	Rechazar H ₀₋₃
Tipo de cepa	16,66	4	4,16	5,48	0,0003	Rechazar H ₀₋₄
Error	195,97	258	0,76			
Total	2718,25	269				

SC: Suma de cuadrados, GL: Grados de libertad, CM: Cuadrado medio, F: Test, P: Probabilidad

Por otra parte, *S. aureus* y *P. aeruginosa* mostraron diferencia significativa en sus halos de inhibición promedio provocados por los extractos etanólicos de *R. robustus* (Mora), siendo el de mayor sensibilidad la bacteria Gram positiva en estudio (Tabla 6).

Tabla 6

Prueba de significancia de Tukey de los promedios de halos de inhibición de S. aureus y P. aeruginosa.

Bacteria	Medias	N	E.E.	
<i>S. aureus</i>	11,08	135	0,08	A
<i>P. aeruginosa</i>	10,40	135	0,08	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Además, se encontró diferencias significativas entre las cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, sin embargo, se observan que las cepas SA-1 y SA-3 de *S. aureus*, mostraron ser iguales, sucediendo lo mismo para la cepa SA-2 y las cepas de *P. aeruginosa*, siendo las cepas de este último grupo, significativamente iguales, en cuanto al promedio de halos de inhibición (Tabla 7).

Tabla 7

Prueba de significancia de Tukey de los promedios de halos de inhibición de según el tipo de cepa de S. aureus y P. aeruginosa.

Tipo de cepa	Medias	N	E.E.	
SA-1	11,39	45	0,13	A
SA-3	11,20	45	0,13	A
SA-2	10,66	45	0,13	B
PA-2	10,62	45	0,13	B
PA-1	10,34	45	0,13	B
PA-3	10,23	45	0,13	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Se encontró diferencias significativas entre el efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de *R. robustus* (Mora) a diferentes concentraciones, mostrándose de manera directamente proporcional a la concentración de los extractos vegetales (Tabla 8).

Tabla 8

Prueba de significancia de Tukey de los promedios de halos de inhibición según la concentración de los extractos etanólicos de R. robustus (Mora).

Concentración de extracto	Medias	N	E. E.	
500	12,16	54	0,12	A
400	11,46	54	0,12	B
300	10,76	54	0,12	C
200	10,04	54	0,12	D
100	9,29	54	0,12	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Se encontró diferencias significativas entre el efecto inhibitorio de los extractos etanólicos de la hoja, tallo y raíz de *R. robustus* (Mora), siendo el extracto de hojas el que presentó mayor promedio de halo de inhibición, seguido del extracto de tallo y en último lugar, el producto etanólico de raíz (Tabla 9).

Tabla 9

Prueba de significancia de Tukey de los promedios de halos de inhibición según el tipo de extracto etanólico de R. robustus (Mora).

Tipo de extracto	Medias	N	E.E.	
Hoja	13,06	90	0,09	A
Tallo	12,44	90	0,09	B
Raíz	6,72	90	0,09	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

4.3. Evaluación de la toxicidad del extracto etanólico de *Rubus robustus* (Mora) frente a *Artemia salina* (Camarón de salmuera)

Se realizó el cálculo del porcentaje de mortalidad de individuos de *A. salina* (Camarón de salmuera) por acción del extracto etanólico de *R. robustus* (Mora), considerando diferentes muestras botánicas (tallo, hoja y raíz), en el cual, no se evidenció nauplios muertos utilizando el extracto de raíces de mora; por otro lado, el efecto del extracto de tallos a la mayor concentración (1000 mg/ml) mostró una mortalidad promedio del 33,3% (Tabla 10), mientras que la mortalidad promedio que mostró el efecto del extracto de hojas fue de 26,7% (Tabla 11), cifra menor en comparación al otro extracto en estudio.

Tabla 10

Recuento de mortalidad de Artemia salina frente a las concentraciones de extracto etanólico de los tallos de Rubus robustus (Mora).

Concentración de extracto (mg/ml)	Total de individuos por repetición	Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3	
		Muertos	%	Muertos	%	Muertos	%
50	10	0	0	1	10	0	0
100	10	1	10	1	10	1	10
200	10	1	10	2	20	1	10
300	10	1	10	2	20	2	20
400	10	2	20	2	20	2	20
500	10	2	20	3	30	2	20
750	10	2	20	3	30	3	30
1000	10	3	30	4	40	3	30

Nota: El testigo estuvo conformado por 10 naupleos de *Artemia salina* expuesto en agua de mar en el cual no se observaron individuos muertos.

Tabla 11

Recuento de mortalidad de Artemia salina frente a las concentraciones de extracto etanólico de hojas de Rubus robustus (Mora)

Concentración de extracto (mg/ml)	Total de individuos por repetición	Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3	
		Muertos	%	Muertos	%	Muertos	%
50	10	0	0	0	0	0	0
100	10	1	10	0	0	0	0
200	10	1	10	1	10	0	0
300	10	1	10	1	10	1	10
400	10	2	20	1	10	1	10
500	10	2	20	2	20	1	10
750	10	2	20	2	20	2	20
1000	10	3	30	3	30	2	20

Nota: El testigo estuvo conformado por 10 nauplios de *Artemia salina* expuesto en agua de mar en el cual no se observaron individuos muertos.

Para el caso de la concentración letal 50 (CL₅₀) de los extractos de *R. robustus* (Mora) frente a los nauplios de *A. salina* (Camarón de salmuera) se pudo determinar que el extracto de tallo mostró un valor de CL₅₀ igual a 3034,82 mg/ml (IC:95% = 1309,52 – 46869,69), mientras

que, el extracto de hojas mostró un valor de 2885,58 mg/ml (IC:95% = 1405,85 – 25741,15) (Tabla 12).

Tabla 12

Concentración letal 50 (CL50) de los extractos etanólicos de tallos y hojas de Rubus robustus (Mora) frente a Artemia salina (Camarón de salmuera).

Especie	Tipo de extracto	CL₅₀ (mg/ml)	IC 95%
<i>Artemia salina</i>	Tallo	3034,82	1309,52 – 46869,69
	Hojas	2885,58	1408,85 – 25741,15

IC: Intervalo de confianza

IV. DISCUSIÓN

Finalizando el presente estudio, se determinó que los extractos etanólicos de hojas, tallos y raíces de *Rubus robustus* (Mora) tuvieron efecto contra *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, no obstante, este efecto es muy notorio cuando se utilizan los extractos a base de hojas y tallo, siendo el primero en mención, el que muestra mayor inhibición a la concentración más alta (500 mg/ml) exhibiendo un halo inhibitorio medio de 15,55 mm en el caso de *S. aureus* y 14,55 mm en el caso de *P. aeruginosa*. Además, esto último, nos indica que la bacteria más susceptible fue la de tipo Gram positiva. Esto coincide con Bussmann, et al., (2010), quienes en su estudio dieron a conocer que el extracto etanólico de la especie en mención inhibía a *S. aureus*, con una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 32 mg/ml; aunque, en dicho estudio no se trabajó con *P. aeruginosa*, se evaluó a *Escherichia coli*, en la cual no se reportó una CMI o ésta era muy elevada para registrar.

Esto sugiere que la sensibilidad de las bacterias a los extractos vegetales está relacionada con la composición química de la pared celular, considerando que las bacterias Gram positivas y Gram negativas difieren en este sentido, ya que las primeras contienen mureína y ácido teicoico en su pared, lo que les confiere la composición química de la pared celular, estructura la solubilidad en agua, lo que permite que los metabolitos secundarios de los extractos de plantas ingresen a la bacteria; las bacterias Gram negativas tienen una membrana externa lipopolisacárida, lo que la hace hidrofóbica y limita el paso de metabolitos. En este caso, sin embargo, los ingredientes activos del extracto etanólico de mora pudieron prevenir el crecimiento de bacterias Gram negativas como *P. aeruginosa*. Para esta especie en particular no se ha encontrado referencias acerca de su marcha fitoquímica, pero se ha logrado reportar metabolitos de otras especies de su mismo género, que son muy idénticos, algunos principios

activos como fenoles, saponinas, flavonoides, taninos, triterpenoides, esteroides y esteroles (Prasanth & Chandran, 2017).

Cada uno de estos metabolitos ejerce su respectiva actividad sobre los microorganismos bacterianos, como es el caso de los fenoles que intervienen en la membrana celular microbiana ya sea Gram positiva o Gram negativa, dañándola y provocando la liberación de componentes intracelulares (Al-Adham et al., 1998). Asimismo, los fenoles causan coagulación intracelular de componentes citoplasmáticos que conducen a la muerte celular (Park et al., 2001). También se encuentran a las saponinas, que al igual que los fenoles, actúan a nivel de la membrana celular de ambos grupos de bacterias formando poros (Desai et al., 2009). Por otro lado, los flavonoides poseen distintos mecanismos para inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y negativas como por ejemplo la inhibición de síntesis de ácidos nucleicos, inhibición fisiológica de la membrana citoplasmática, inhibición del metabolismo energético, entre otros (Cushnie & Lamb, 2005).

Además, se pudo observar que, de las tres cepas de *S. aureus*, una fue inhibida de distinta manera con relación a las otras dos, siendo ese efecto de menor intensidad, por lo que se sugiere que esa cepa fue más resistente que las otras dos cepas, lo cual pudo haber ocurrido debido a la procedencia y sensibilidad de las bacterias; en relación a lo primero, las cepas de *S. aureus* tuvieron distinto grado de presencia de adhesinas, pilis o cápsulas, que rodean la superficie bacteriana, así como también diferente espesor según la patogenicidad de cada cepa. Sumado a ello, no se ha considerado el nivel de resistencia de cada cepa a los antimicrobianos, por lo que, se asume que la cepa que presenta una inhibición significativamente diferente a las otras restantes, posee mayor cantidad de genes de resistencia a antibióticos (Pantosti et al., 2007).

En el caso de las concentraciones del extracto etanólico, se ha evidenciado que a medida que se aumenta sus concentraciones, incrementa el tamaño de los halos de inhibición producidos por el extracto etanólico. Este hallazgo guarda mucha similitud con dos estudios internacionales, que encontraron los mismos resultados cuando se aumentaba la concentración del extracto (Oliveira et al., 2016; Weli et al., 2020). Esto sugiere que, si se incrementa las concentraciones de un extracto vegetal, también se aumenta la concentración de principios activos que éste posee y, por ende, tiene una relación directamente proporcional al efecto inhibitorio que se manifiesta en las cepas bacterianas.

Por otro lado, se ha observado que, el extracto de hojas de mora, mostró un efecto significativamente mayor en relación al extracto de tallo, que fue el segundo más inhibitorio, y en último lugar el extracto de raíces. Esto no guarda relación con lo investigado por Yousefbeyk et al., (2021) donde se trabajó con la especie vegetal *R. hyrcanus* y sus respectivos extractos totales, hexánicos, de acetato de etilo y metanólicos a base de raíces mostraron mayores valores de zonas de inhibición frente a *S. aureus* con respecto a los extractos con los mismos solventes, pero a base de hojas. Sin embargo, tomando como referencia que también se trabajó con una bacteria Gram negativa, en el estudio citado, los extractos de raíces no fueron capaces de inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*, mientras que, el extracto total y metanólico de hojas logró hacerlo.

Lo anteriormente mencionado, pudo haber ocurrido debido a que, mediante el análisis cuantitativo de los metabolitos de los extractos de *R. hyrcanus*, se observó que los extractos de raíces presentaban mayor cantidad de compuestos fenólicos que los extractos de hojas, mientras que estos últimos mostraban mayor cantidad de flavonoides con respecto a los extractos de raíces. En este caso, se sugiere que, los extractos que contienen en su composición química a

los flavonoides, podrán inhibir con más facilidad a bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas, sin dejar de lado, el efecto de los compuestos fenólicos. Por ello, también, se asume que, los extractos de hojas de *R. robustus* tuvieron mayor cantidad de flavonoides, ya que logró inhibir de manera clara a ambos tipos de bacterias, caso contrario de las raíces, quienes tuvieron un efecto muy reducido, por lo que, se puede decir, que no poseen mucho compuesto flavonoide y fenólico en su composición.

Finalmente, en el caso de la toxicidad del extracto etanólico de *R. robustus* (Mora) no se evidenció nauplios de camarón de salmuera muertos utilizando el extracto de raíces; mientras que, el efecto del extracto de tallos a la mayor concentración (1000 mg/ml) mostró una mortalidad promedio del 33,3% y la mortalidad promedio que mostró el efecto del extracto de hojas fue de 26,7%. Asimismo, la CL_{50} encontrada para el caso del extracto de hojas fue de 2885,58 mg/ml y en el extracto de tallo fue de 3034,82 mg/ml. Esto difiere con lo reportado por Weli et al., (2020) quienes trabajaron con hojas de *R. fruticosus* y con Ali et al., (2017) donde utilizaron la especie *R. ulmifolius*, reportaron cifras muy inferiores de CL_{50} para distintos extractos de las especies vegetales mencionadas. En el primer estudio citado, el extracto metanólico mostró un valor de CL_{50} igual a 6,96 ug/ml y el extracto hidroalcohólico igual a 4,68 ug/ml; mientras que, el otro autor encontró un valor de 16,7 ug/ml para el extracto crudo.

En este punto, se debe tener en cuenta que, las especies son distintas, por lo que, existe una diferencia en la concentración de sus compuestos fotoquímicos, y eso explicaría el poco potencial de toxicidad sobre del extracto de *R. robustus* frente a otras especies de su mismo género. Además, se sugiere que, los extractos de raíces de *R. robustus* contiene concentraciones de metabolitos tóxicos muy reducidas en comparación con los otros extractos. Sumado a ello, se ha demostrado que existen algunos factores que pueden influir en la toxicidad, como lo son

la procedencia geográfica, el clima en el cual se encuentra la especie vegetal, el método de extracción para obtener los extractos y el solvente utilizado (Al-Mqbali & Hossain, 2019), por lo que, ello explicaría porque en el presente estudio se encontró una toxicidad baja con respecto a los otros autores.

CONCLUSIONES

Los diversos experimentos realizados en la presente investigación nos han permitido concluir lo siguiente:

1. Los extractos etanólicos de *Rubus robustus* (Mora) en todas sus concentraciones tienen efecto inhibitorio in vitro sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* estudiadas, siendo el extracto etanólico a base de hojas el que tiene mejor actividad antibacteriana en la concentración más alta experimentada (500mg/ml).

2. Los extractos etanólicos de *Rubus robustus* (Mora) muestra baja toxicidad con una CL50 de 3034, 84 mg/ml y 2885,58 mg/ml respectivamente frente a *Artemia salina*, mientras que, los extractos etanólicos de la raíz no demuestran dicho efecto.

RECOMENDACIONES

Realizar estudios para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Máxima Bactericida de los extractos etanólicos de hojas, tallos y raíces de *Rubus robustus* frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Llevar a cabo investigaciones de extractos etanólicos de diferentes partes de *Rubus robustus* (Mora) como las flores y semillas frente a otros tipos de microorganismos como virus, hongos o parásitos, además de realizar la marcha fitoquímica de dichos extractos.

Evaluar el efecto *in vivo* de los extractos de *R. robustus* (Mora) con la finalidad de utilizarlo a futuro en personas con algún tipo de infección respiratoria.

Considerar su consumo de *R. robustus* (Mora) en la dieta de individuos con afecciones respiratorias a largo plazo.

REFERENCIAS

- Aguilar, F., Aguilar, S., Cubas, D., Coaguila, L., Fernández, D., Moreno, M., Román, N., Guevara, G., & Díaz, R. (2016). Portadores de bacterias multirresistentes de importancia clínica en áreas críticas (UCI-UCIN) de un hospital al norte del Perú. *Horizonte Médico*, 16(3), 50-57. http://usmp.edu.pe/medicina/medicina/horizonte/2016_3/Art7_Vol16_N3.pdf
- Aguilar, F., Niño, J., & Moreno, M. (2015). Portadores nasofaríngeos *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae* en personal de salud del hospital provincial docente Belén de Lambayeque. *Revista Experiencia en Medicina del Hospital Regional Lambayeque*, 1(2), 47-51.
- Al-Adham, I. S. I., Dinning, A. J., Eastwood, I. M., Austin, P., & Collier, P. J. (1998). Cell membrane effects of some common biocides. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 21, 6-10. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900554>
- Al-Mqbali, L. R. A., & Hossain, M. A. (2019). Cytotoxic and antimicrobial potential of different varieties of ripe banana used traditionally to treat ulcers. *Toxicology Reports*, 6(1), 1086-1090. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2019.10.003>
- Ali, N., Shaoib, M., Shah, S. W. A., Shah, I., & Shuaib, M. (2017). Pharmacological profile of the aerial parts of *Rubus ulmifolius* Schott. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(59). <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1564-z>
- Alvitres, V. (2000). *Metodo científico, Planificacion de la investigacion* (2° Edición). Editorial Ciencia.

- Aquino, R., Gonzáles, E., Samaniego, S., Rivera, J., Cedeño, V., Urbina, Y., & Diringer, B. (2017). Molecular characterization of pathogenic bacteria of the respiratory tract in Peruvian patients with cystic fibrosis. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 34(3), 423-435. <https://doi.org/10.17843/rpmesp.2017.343.2529>
- Argimon, J., & Jiménez, J. (2013). *Métodos de Investigación Clínica y Epidemiológica* (4^o Edición). Elsevier.
- Bassetti, M., Vena, A., Croxatto, A., Righi, E., & Guery, B. (2018). How to manage *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Drugs in Context*, 7. <https://doi.org/10.7573/dic.212527>
- Bussmann, R. W., Glenn, A., Meyer, K., Kuhlman, A., & Townesmith, A. (2010). Herbal mixtures in traditional medicine in Northern Peru. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 6(10). <https://doi.org/10.1186/1746-4269-6-10>
- Bussmann, R. W., Malca-García, G., Glenn, A., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., Pourmand, K., Jonat, B., Somogy, S., Guardado, G., Aguirre, C., Chan, R., Meyer, K., Kuhlman, A., Townesmith, A., Effio, J., Frías, F., & Benito, M. (2010). Minimum inhibitory concentrations of medicinal plants used in Northern Peru as antibacterial remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 132(1), 101-108. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.07.048>
- Cantón, R., Máiz, L., Escribano, A., Oliveira, C., Oliver, A., Asensio, O., Gartner, S., Roma, E., Quintana-gallego, E., Salcedo, A., Girón, R., Isabel, M., Dolores, M., Prados, C., Martínez-martínez, M. T., Barberán, J., José, J., Martínez-martínez, L., Luis, J., ... Quística, F. (2015). Consenso español para la prevención y el tratamiento de la infección

- bronquial por *Pseudomonas aeruginosa* en el paciente con fibrosis quística. *Archivos de Bronconeumología*, 51(3), 140-150. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2014.09.021>
- Carballo, N., De Antonio-Cuscó, M., Echeverría-Esnal, D., Luque, S., Salas, E., & Grau, S. (2017). Community-acquired pneumonia caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in critically-ill patients: Systematic review. *Farmacia Hospitalaria*, 41(2), 187-203. <https://doi.org/10.7399/fh.2017.41.2.10591>
- Cervantes, E., García-González, R., & Salazar-Schetinno, P. M. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Anti-Corrosion Methods and Materials*, 61(1), 28-40. <https://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2014/pt141e.pdf>
- Cetojevic, D., Ranitovic, A. S., Cvetkovic, D. D., Markov, S. L., Vincic, M. N., & Djilas, S. M. (2017). Bioactivity of blackberry (*Rubus fruticosus* L.) Pomace: Polyphenol Content, Radical Scavenging, Antimicrobial and Antitumor Activity. *Acta Periodica Technologica*, 48, 63-76. <https://doi.org/10.2298/APT1748063C>
- Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI). (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* (9th Editio).
- Cushnie, T. P. T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343-356. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2005.09.002>
- Desai, S. D., Desai, D. G., & Kaur, H. (2009). Saponins and their biological activities. *Pharma Times*, 41(3), 13-16. <https://www.researchgate.net/publication/288126191>

Fundación Agro Diversidad Andina (Fundación AGRODIVA). (2017). *Ficha Técnica: Rubus robustus – Morauva, Zarzamora*.

Grabek, D., & Wojtowicz, K. (2014). Comparison of Antibacterial and Antioxidant Properties of Fruits and Leaves of Blackberry (*Rubus plicatus*) and Raspberry (*Rubus idaeus*). *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 3(6), 514-518. https://www.jmbfs.org/wp-content/uploads/2014/06/jmbfs_xk2_grabek_lejko.pdf

Hajaji, S., Jabri, M. A., Sifaoui, I., López-Arencibia, A., Reyes-Batlle, M., B'chir, F., Valladares, B., Pinero, J. E., Lorenzo-Morales, J., & Akkari, H. (2017). Amoebicidal, antimicrobial and in vitro ROS scavenging activities of Tunisian *Rubus ulmifolius* Schott, methanolic extract. *Experimental Parasitology*, 183, 224-230. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.09.013>

Hummer, K. E., & Peacock, D. N. (1994). Seed dimension and weight of selected *Rubus* species. *HortScience*, 29(9), 1034-1036. <https://doi.org/10.21273/hortsci.29.9.1034>

Infosalus. (2018). *Las enfermedades pulmonares causan más muertes y discapacidades en todo el mundo en los últimos 30 años*. <https://www.infosalus.com/salud-investigacion/noticia-enfermedades-pulmonares-causan-mas-muertes-discapacidades-todo-mundo-ultimos-30-anos-20200220081442.html>

Junior, T. K., de Moura, C., Do Carmo, M. A. V., Azevedo, L., Esmerino, L. A., Tardivo, R. C., Kilpeläinen, P., & Granato, D. (2021). Chemical composition, antioxidant, antimicrobial and cytotoxic/cytoprotective activity of non-polar extracts of grape (*Vitis labrusca* cv. Bordeaux) and blackberry (*Rubus fruticosus*) Seeds. *Molecules*, 26(13). <https://doi.org/10.3390/molecules26134057>

- Lizcano, A., & Vergara, J. (2008). *Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a microorganismos patógenos y fitopatóge* [Pontificia Universidad Javeriana]. <https://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis151.pdf>
- Oliveira, B. D. Á., Rodrigues, A. C., Cardoso, B. M. I., Ramos, A. L. C. C., Bertoldi, M. C., Taylor, J. G., Cunha, L. R. da, & Pinto, U. M. (2016). Antioxidant, antimicrobial and anti-quorum sensing activities of *Rubus rosaefolius* phenolic extract. *Industrial Crops and Products*, 84, 59-66. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.037>
- Pantosti, A., Sanchini, A., & Monaco, M. (2007). Microbiology of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*, 2(3), 323-334. <https://doi.org/10.2217/17460913.2.3.323>
- Park, E. S., Moon, W. S., Song, M. J., Kim, M. N., Chung, K. H., & Yoon, J. S. (2001). Antimicrobial activity of phenol and benzoic acid derivatives. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 47(4), 209-214. [https://doi.org/10.1016/S0964-8305\(01\)00058-0](https://doi.org/10.1016/S0964-8305(01)00058-0)
- Pino, O., & Jorge, F. (2010). Ensayo de Artemia: Útil herramienta de trabajo para ecotoxicólogos y químicos de productos naturales. *Rev. Protección Veg*, 22(1), 34-43. <http://scielo.sld.cu/pdf/rpv/v25n1/rpv08110.pdf>
- Polischuk, I., Komisarenko, M., Upyr, T., Kovaleva, A., & Komisarenko, A. (2019). Study of *Rubus idaeus* Juice Ellagitannins and Its Antimicrobial Activity. *International Journal of Pharmacy and Chemistry*, 5(6), 68-71. <https://doi.org/10.11648/j.ijpc.20190506.11>

- Prasanth, S. C., & Chandran, P. R. (2017). Phytochemical and antimicrobial analysis of leaf samples of different Rubus species. *International Journal of ChemTech Research*, 10(4), 359-368. <https://www.researchgate.net/publication/317087242>
- Thompson, M. M. (1997). Survey of chromosome numbers in Rubus (Rosaceae: Rosoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 84(1), 128-164. <https://doi.org/10.2307/2399958>
- Veličković, I., Živković, J., Stojković, D., Sokovic, M. D., Marin, P. D., & Grujić, S. (2021). Evaluation of Antioxidant, Antimicrobial and Potential Food Preserving Properties of Rubus Discolor (Rosaceae) Fruit Extracts. *Natural Product Communications*, 16(4). <https://doi.org/10.1177/1934578X211009692>
- Vidaurre, M., Querevalú, L., De Los Ríos, E., & Ruiz, S. (2007). Características farmacognósticas de las hojas de Capparis avicennifolia. *Revista Médica Vallejiana*, 4(2), 121-131.
- Weli, A. M., Al-Saadi, H. S., Al-Fudhaili, R. S., Hossain, A., Putit, Z. B., & Jasim, M. K. (2020). Cytotoxic and antimicrobial potential of different leaves extracts of R. fruticosus used traditionally to treat diabetes. *Toxicology Reports*, 7, 183-187. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2020.01.006>
- Yousefbeyk, F., Ghasemi, S., Evazalipour, M., Dabirian, S., Schubert, C., Hekmatnia, S., Habibi, Y., Eghbali Koochi, D., & Böhm, V. (2021). Phytochemical analysis, antioxidant, antibacterial, and cytotoxic activities of leaves and roots of Rubus hyrcanus Juz. *European Food Research and Technology*. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03866-z>

Zhang, X. (2000). *Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional* (1º Ed.).
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/67719/WHO_EDM_TRM_2000.1_spa.pdf;jsessionid=7A6701EDA95210551E8C22EAFC1D757D?sequence=1

ANEXOS

Anexo 1

Constancia de Identificación botánica de la especie Rubus robustus (Mora).



**HERBARIO
PEDRO RUIZ GALLO**
UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

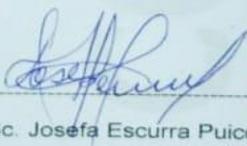
CONSTANCIA

LA DIRECTORA DEL HERBARIO PRG DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO, QUE SUSCRIBE,

Hace constar:

Que, las señoritas Bachiller en Biología **Danelly Lisbeth Muñoz Heredia** y **Judith Paola Zeta Herrera**, han hecho llegar al Herbario PRG 03 muestras botánicas, como parte de su tesis denominada: "Efecto inhibitorio in vitro de los extractos etanólicos de *Rubus robustus* (Mora) frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* y evaluación de su toxicidad sobre *Artemia salina* (Camarón de salmuera)", las mismas ha sido identificada como *Rubus robustus* C.Presl.

Lambayeque, 18 de diciembre del 2019



MSc. Josefa Escurra Puicón



Anexo 2

Cultivo de Staphylococcus aureus en Agar sangre.

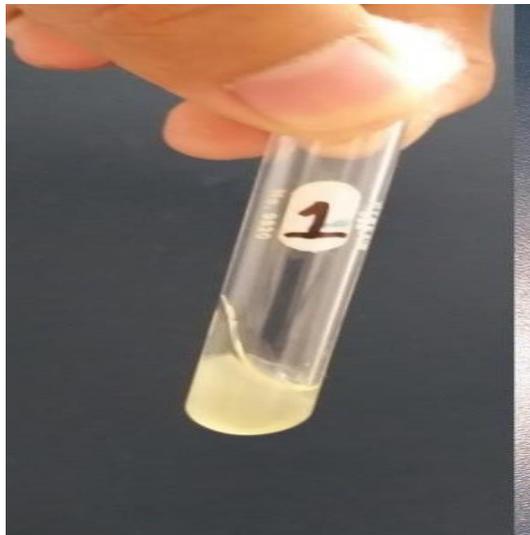
**Anexo 3**

Cultivo de Staphylococcus aureus en Agar manitol salado.

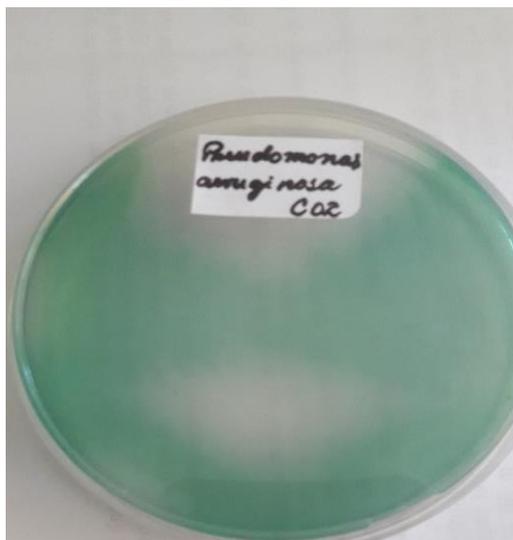


Anexo 4

Prueba de coagulasa: positivo.

**Anexo 5**

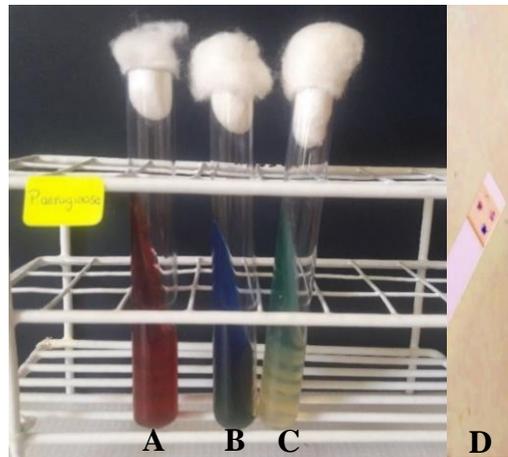
Cultivo de Pseudomonas aeruginosa en Agar cetrimide.



Anexo 6

A) *Agar Triple Azúcar Hierro: K/K.* B) *Agar Citrato de Simons: Positivo.*

C) *Agar Trypticase soya.* D) *Prueba de oxidasa: Positivo.*

**Anexo 7**

Selección del Material botánico de A)Hojas B)Tallos y raíces.

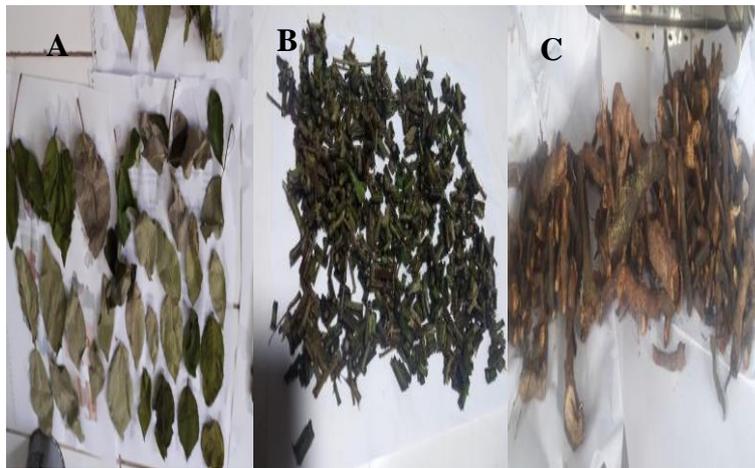


Anexo 8

Proceso de lavado y desinfección de hojas, tallos y raíces.

**Anexo 9**

Finalización del proceso de secado: A)Hojas B)Tallos C)Raíces



Anexo 10

Material botánico de Rubus robustus triturado

**Anexo 11**

Incorporación del etanol al 70% al frasco conteniendo el material botánico.



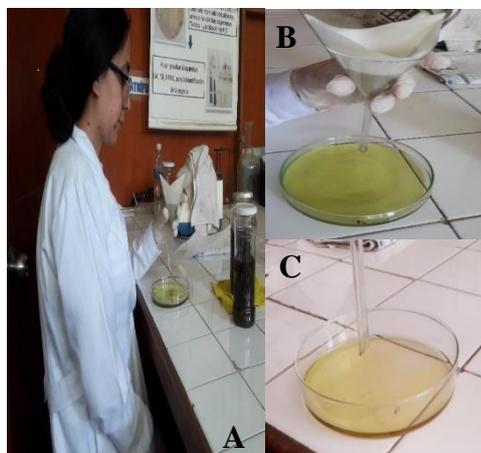
Anexo 12

Maceración de los extractos de raíces , hojas y tallos de Rubus robustus.



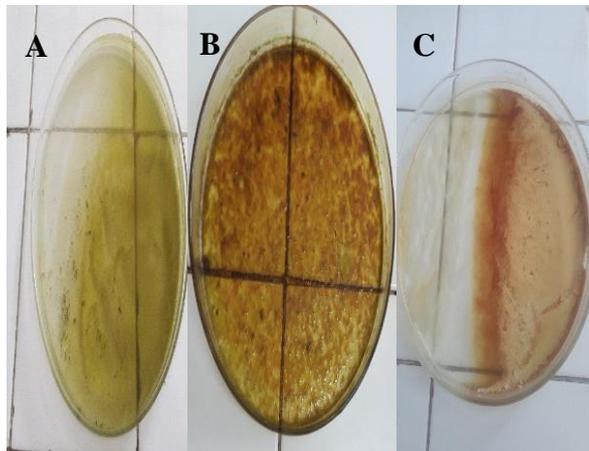
Anexo 13

Proceso de Filtración de los extractos etanólicos de hojas (A), tallos (B) y raíces (C) de Rubus robustus.



Anexo 14

Extractos secos de hojas (A), tallos (B) y raíces (C) de Rubus robustus.

**Anexo 15**

Preparación de la solución madre.



Anexo 16

Preparación de las concentraciones de los Extractos Etanólicos de hojas, tallos y raíces de Rubus robustus(mora).

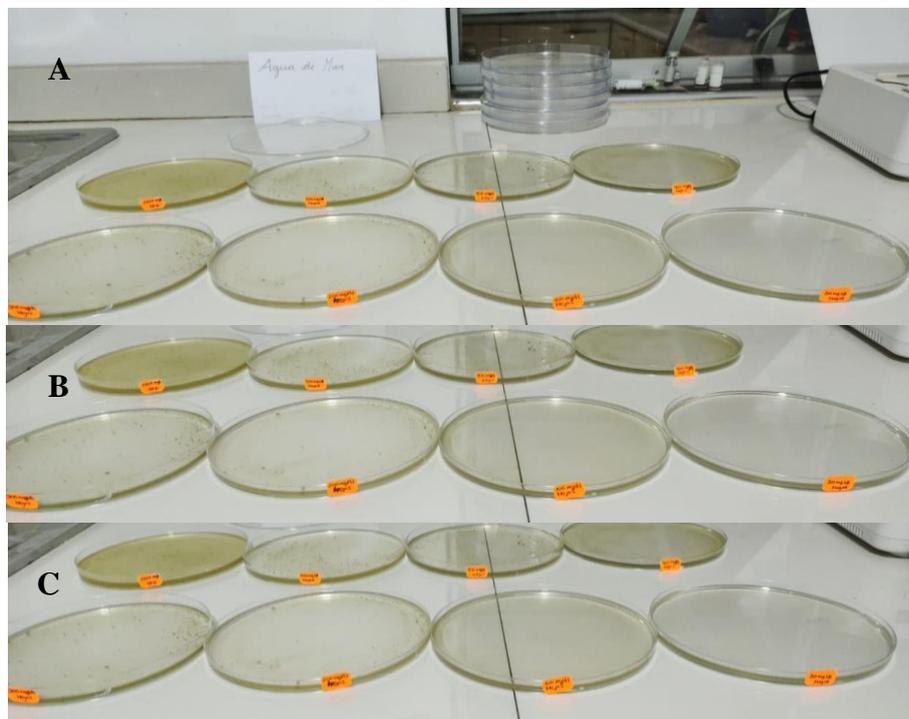
**Anexo 17**

Prueba de susceptibilidad antimicrobiana – Método de Kirby -Bauer



Anexo 18

Evaluación de la Toxicidad en Artemia salina de los extractos etanólicos de Rubus robustus : A) Repetición 1 B) Repetición 2 y C) Repetición 3.





UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUÍZ GALLO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN



ACTA DE SUSTENTACIÓN



**ACTA DE SUSTENTACIÓN VIRTUAL N° 007-
2023-FCCBB-UI**



Siendo las 9:00 horas del día 26 de mayo de 2023, se reunieron vía plataforma virtual, meet.google.com/ocw-mksy-sua los miembros del jurado evaluador de la tesis titulada “**Efecto inhibitorio in vitro de los extractos etanólicos de *Rubus robustus* (Mora) frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y evaluación de su toxicidad sobre *Artemia salina* (Camarón de salmuera)**”, designados por Resolución N° 034-2019-FCCBB/D de fecha 24 de enero de 2019, con la finalidad de evaluar y calificar la sustentación de la tesis antes mencionada, conformada por los siguientes docentes:

Dra. Martha Arminda Vergara Espinoza
Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán
Lic. Julio César Silva Estela
MSc. Mario Cecilio Moreno Mantilla

Presidenta
Secretaria
Vocal
Asesor

Acto de sustentación fue autorizado por Resolución N° 123-2023-VIRTUAL-FCCBB/D, de fecha 24 de mayo de 2023.

La Tesis presentada y sustentada por la **Bachiller DANELLY LISBETH MUÑOZ HEREDIA** y la **Bachiller JUDITH PAOLA ZETA HERRERA**, tuvo una duración de 30 minutos. Después de la sustentación y absueltas las preguntas y observaciones de los miembros del jurado; se procedió a la calificación respectiva, otorgándole el calificativo de **(DIECINUEVE) (MUY BUENO)** en la escala vigesimal.

Por lo que la Bachiller **DANELLY LISBETH MUÑOZ HEREDIA** y la Bachiller **JUDITH PAOLA ZETA HERRERA** quedan **APTAS** para obtener el título profesional de Licenciada en Biología – Microbiología - Parasitología, de acuerdo con la Ley Universitaria 30220 y la normatividad vigente de la Facultad de Ciencias Biológicas y la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Siendo las 10:35 am se dio por concluido el presente acto académico, dándose conformidad al presente acto, con la firma de los miembros del jurado.

Firman



Dra. Matha Arminá, Vergara Espinoza
DNI N° 16581832

Presidenta



Dra. Carmen Rosa Carreño Farfán
Secretaria



Lic. Julio César Silva Estela
Vocal



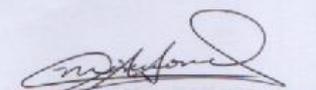
MSc. Mario Cecilio Moreno Mantilla
Asesor

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS

Yo, **Mario Cecilio Moreno Mantilla**, Asesor de la tesis de las bachilleres Danelly Lizbeth Muñoz Heredia y Judith Paola Zeta Herrera, autoras de la tesis titulada "**Efecto inhibitorio in vitro de los extractos etanólicos de *Rubus robustus* (Mora) frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y evaluación de su toxicidad sobre *Artemia salina* (camarón de salmuera)**", luego de la revisión exhaustiva del documento en mención, dejo constancia que la misma tiene un índice de similitud de **19%** verificable en el reporte de similitud del programa de Turnitin.

El suscrito analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas no constituye plagio. A mi leal saber y entender la tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo.

Lambayeque 23 de mayo del 2023



MSC. Mario Cecilio Moreno Mantilla

DNI: 16505740

ASESOR

Tesis

INFORME DE ORIGINALIDAD

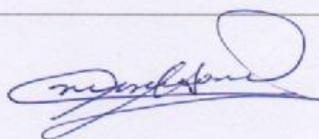
19%	19%	6%	%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

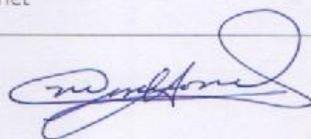
1	revistas.uss.edu.pe Fuente de Internet	3%
2	cybertesis.unmsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
3	tesis.ucsm.edu.pe Fuente de Internet	1%
4	repositorio.umsa.bo Fuente de Internet	1%
5	repositorio.unap.edu.pe Fuente de Internet	1%
6	repositorio.utp.edu.co Fuente de Internet	1%
7	alicia.concytec.gob.pe Fuente de Internet	1%
8	www.medigraphic.com Fuente de Internet	1%
9	repositorio.unamba.edu.pe Fuente de Internet	1%



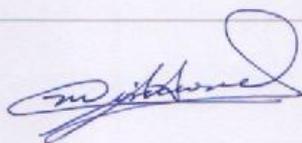
10	repositorio.uoosevelt.edu.pe Fuente de Internet	1 %
11	www.coursehero.com Fuente de Internet	1 %
12	repositorio.uncp.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
13	dspace.unapiquitos.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
14	recursosbiblioteca.utp.edu.co Fuente de Internet	<1 %
15	www.dspace.uce.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
16	repositorio.uigv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
17	www.researchgate.net Fuente de Internet	<1 %
18	Gloria Holguín Martínez. "Memorias del XI Congreso Colombiano de Fitoquímica", Vitae, 2011 Publicación	<1 %
19	1library.co Fuente de Internet	<1 %
20	hdl.handle.net Fuente de Internet	<1 %



21	ri.agro.uba.ar Fuente de Internet	<1 %
22	dspace.unl.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
23	www.infosalus.com Fuente de Internet	<1 %
24	www.revistas.unitru.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
25	repositorio.unicach.mx Fuente de Internet	<1 %
26	repositorio.upagu.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
27	worldwidescience.org Fuente de Internet	<1 %
28	repositorio.uns.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
29	repositorioacademico.upc.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
30	cicese.repositorioinstitucional.mx Fuente de Internet	<1 %
31	repositorio.udec.cl Fuente de Internet	<1 %
32	repositorio.uladech.edu.pe Fuente de Internet	<1 %



33	www.fceqyn.unam.edu.ar Fuente de Internet	<1 %
34	es.slideshare.net Fuente de Internet	<1 %
35	repositorio.ucss.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
36	repositorio.unal.edu.co Fuente de Internet	<1 %
37	repositorio.unfv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
38	ojs.unemi.edu.ec Fuente de Internet	<1 %
39	idoc.pub Fuente de Internet	<1 %
40	jbb-repositorio.metabiblioteca.org Fuente de Internet	<1 %
41	pt.scribd.com Fuente de Internet	<1 %
42	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
43	ri.ues.edu.sv Fuente de Internet	<1 %
44	repositorio.lamolina.edu.pe Fuente de Internet	<1 %





Recibo digital

Este recibo confirma que su trabajo ha sido recibido por Turnitin. A continuación podrá ver la información del recibo con respecto a su entrega.

La primera página de tus entregas se muestra abajo.

Autor de la entrega:	Danely Muñoz Heredia
Título del ejercicio:	Tesis de Muñoz y Zeta
Título de la entrega:	Tesis
Nombre del archivo:	INFORME_DE_TESIS_DANNELY_Y_PAOLA_01-02-23.docx
Tamaño del archivo:	11.41M
Total páginas:	66
Total de palabras:	10,853
Total de caracteres:	59,883
Fecha de entrega:	15-feb.-2023 08:48a. m. (UTC-0500)
Identificador de la entrega...	2014783564


UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Este documento es copia de los extractos analíticos de datos subidos (línea base a
 Superficie de cobertura y Prácticas de asignatura y evaluación de sostenibilidad sobre el medio
 natural a través de software)

PRESENTADO POR:
 Bach. Danely Lucheth Muñoz Heredia
 Bach. Judith Paola Zeta Huanca

ASESOR:
 MSc. Marco Cecilio Urbano Manríquez

TESIS
 PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADA EN BIODIVERSIDAD -
 MICROBIOLOGÍA - PARASITOLOGÍA

Lambayeque - Perú
 2023