

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA



FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*”

Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico

TESISTAS:

Bach. Anco Vega, Liz Noemi

Bach. Gálvez Chóquez, Flor Maribel

ASESOR:

Dr. Q.F. Pablo Enrique Bonilla Rivera

Lima – Perú

2019

DEDICATORIA

En primer lugar, a Dios por siempre cuidarme, guiarme y darme las fuerzas necesarias para el cumplimiento de mi objetivo profesional.

A mis padres y hermano, por ser mis motores y motivos para seguir día a día, ustedes son mi fortaleza siempre.

A mis amistades del trabajo y la Universidad que siempre me apoyaron incondicionalmente durante los años de estudio de mi carrera profesional.

Maribel

Por su infinito amor a DIOS, por darme la vida cada día, por protegerme, cuidarme como la niña de sus ojos.

A mis padres ejemplares, Adrián y Elisa por ser mi motivo, fortaleza y esperanza durante toda mi vida.

A mis hermanos por ser mi soporte, apoyo incondicional en los años de mi formación académica como profesional y futura Química Farmacéutica.

Liz

AGRADECIMIENTO

A nuestra alma máter la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímica, por brindarnos la formación de esta hermosa profesión.

A nuestro asesor de tesis, Dr. Q.F. PABLO ENRIQUE BONILLA RIVERA, por todo el apoyo, paciencia, dedicación, disponibilidad y profesionalismo para realizar el desarrollo de la investigación.

A la Dra. Q.F. MARIA ELENA SALAZAR SALVATIERRA, docente de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM, por su disponibilidad, paciencia, colaboración y sus aportes de conocimientos microbiológicos para la realización de esta tesis.

A todos nuestros profesores por su valiosa enseñanza.

Índice

Dedicatoria

Agradecimiento

Índice de tablas

Índice de figuras

Índice de anexos

Resumen

Abstract

Introducción1

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN2

1.1 Descripción de la realidad problemática2

1.2 Formulación del problema4

 1.2.1. Problema general4

 1.2.2. Problemas específicos4

1.3 Objetivos4

 1.3.1. Objetivo general4

 1.3.2. Objetivos específicos5

1.4 Justificación e importancia del estudio5

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO7

2.1 Antecedentes del estudio7

 2.1.1. Nacionales7

 2.1.2. Internacionales9

2.2 Bases teóricas10

2.3 Hipótesis	27
2.3.1. Hipótesis general	27
2.3.2. Hipótesis específicas	27
2.4 Variables	28
2.4.1. Tabla de operacionalización de variables	28
2.5 Marco conceptual	29
CAPÍTULO III: MÉTODO	31
3.1 Tipo de estudio	31
3.2 Diseño a utilizar	31
3.3 Población vegetal	31
3.4 Muestra vegetal	31
3.5 Población de cepas bacterianas	31
3.6 Muestra de cepas bacterianas	31
3.7 Técnicas e instrumentos de recolección de datos	32
3.7.1 Equipos, materiales y reactivos	32
3.7.2 Procedimiento experimental	34
3.8 Procesamiento de datos	43
CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	45
4.1 Presentación de resultados	45
4.2 Contrastación de hipótesis	67
4.3 Discusión de resultados	69
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	74

5.1 Conclusiones	74
5.2 Recomendaciones	76
REFERENCIAS	77
ANEXOS	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N°1: Clasificación de flavonoides según su estructura.....	17
Tabla N°2: Diferencias entre una bacteria Gram positiva y otra Gram negativa....	20
Tabla N°3: Principales compuestos antimicrobianos de las plantas.....	25
Tabla N°4: Operalización de variables.....	28
Tabla N°5: Tabla de solventes ordenados de acuerdo a su polaridad.....	36
Tabla N°6: Disposición para la incorporación de muestras e inóculos en la microplaca.....	43
Tabla N°7: Prueba de solubilidad del extracto seco de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha).....	45
Tabla N°8: Marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha).....	46
Tabla N°9: Identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha).....	47
Tabla N°10: Tipos de flavonoides elucidados mediante espectrofotometría UV-vis y con reactivos de desplazamientos.....	51
Tabla N°11: Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) por el método de difusión en agar.....	53
Tabla N°12: Análisis microbiológico del extracto etanólico frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591.....	56
Tabla N°13: Estadística descriptiva para los halos de inhibición obtenidos de cada extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591.....	57
Tabla N°14: Prueba de homogeneidad de varianzas (extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591).....	58

Tabla N°15: ANOVA de un factor (extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591).....	58
Tabla N°16: Comparaciones múltiples HSD Tukey (Variable dependiente: HALOS) para el extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591.....	59
Tabla N°17: Prueba de Subconjunto de Tukey (extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591).....	60
Tabla N°18: Análisis microbiológico del extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984.....	61
Tabla N°19: Estadística descriptiva para los halos de inhibición obtenidos de cada extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984.....	62
Tabla N°20: Prueba de homogeneidad de varianzas (extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984).....	63
Tabla N°21: ANOVA de un factor (extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> (Llancahuasha) Wedd frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984).....	63
Tabla N°22: Comparaciones múltiples HSD Tukey (Variable dependiente: HALOS) para el extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984.....	64
Tabla N°23: Prueba de Subconjunto de Tukey (extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984).....	65

Tabla N° 24: Valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 y *Escherichia coli* ATCC 2592266

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA N°1: <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha).....	13
FIGURA N°2: Estructura base de flavonoide	16
FIGURA N°3: Estructuras de Gram positivas y Gram negativas	19
FIGURA N°4: Diagrama de flujo del procedimiento experimental	34
FIGURA N°5: Cromatografía en capa fina para la identificación de compuestos fenólicos	47
FIGURA N°6: Cromatografía en capa fina para la identificación de flavonoides	48
FIGURA N°7: Cromatografía en capa fina para la identificación de alcaloides	49
FIGURA N°8: Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) a 200 mg/mL (100%), 100 mg/mL (50%) y 50 mg/mL (25%) por el método de difusión en agar frente a <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	54
FIGURA N°9: Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) a 200 mg/mL (100%), 100 mg/mL (50%) y 50 mg/mL (25%) por el método de difusión en agar frente a <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984.....	54
FIGURA N°10: Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) a 200 mg/mL (100%), 100 mg/mL (50%) y 50 mg/mL (25%) por el método de difusión en agar frente a <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922.....	55
FIGURA N°11: Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) a 200 mg/mL (100%), 100 mg/mL (50%) y 50 mg/mL (25%) por el método de difusión en agar frente a <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15448.....	55
FIGURA N°12: Determinación de la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) por el	

método de microdilución colorimétrica en microplaca contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 y <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922. Donde CE=Control de esterilidad y CC=Control positivo.....	67
FIGURA N°13: <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) en el distrito de Laraos, provincia de Yauyos – Lima	93
FIGURA N°14: Selección de las hojas	93
FIGURA N°15: Lavado de las hojas	93
FIGURA N°16: Secado bajo sombra	94
FIGURA N°17: Hojas secas	94
FIGURA N°18: Molienda de las hojas (mecánica)	94
FIGURA N°19: Hojas molidas	94
FIGURA N°20: Peso de las hojas molidas	94
FIGURA N°21: Preparación del extracto	95
FIGURA N°22: Filtración de las hojas	95
FIGURA N°23: Extracto etanólico líquido de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha).....	95
FIGURA N°24: Extracto etanólico seco de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha).....	95
FIGURA N°25: Disolución de la muestra con etanol para la prueba de solubilidad.	96
FIGURA N°26: Solventes	96
FIGURA N°27: Prueba de solubilidad del extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha)	96
FIGURA N°28: Preparación de la muestra para la marcha fitoquímica	97
FIGURA N°29: Reactivos usados en la marcha fitoquímica	97

FIGURA N°30: Marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha)	97
FIGURA N°31: Preparación de cromatoplasmas	98
FIGURA N°32: Cromatoplasmas secas	98
FIGURA N°33: Sembrado de la muestra	98
FIGURA N°34: Cromatoplasma sembrada	98
FIGURA N°35: Recorrido de la muestra en la cámara cromatográfica y cromatoplasma seca después del recorrido	98
FIGURA N°36: Sembrado en la cromatoplasma (20x5 cm) y cromatoplasma sembrada.....	99
FIGURA N°37: Recorrido de la muestra en la cámara cromatográfica y cromatoplasma seca	99
FIGURA N°38: Lectura de la placa con luz UV a 254 nm	100
FIGURA N°39: Lectura de la placa con luz UV a 365 nm	100
FIGURA N°40: Raspado y separación de fracciones	101
FIGURA N°41: Disolución con etanol y filtración de las fracciones obtenidas del raspado	101
FIGURA N°42: Soluciones obtenidas de la filtración (10 muestras)	101
FIGURA N°43: Reactivos de desplazamiento	102
FIGURA N°44: Espectrofotómetro UV-vis	102
FIGURA N°45: Celdas de cuarzo	102
FIGURA N°46: Espectro UV-vis y propuesta estructural de la muestra 3 de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha).....	103

FIGURA N°47: Espectro UV-vis de muestra 3 con Metóxido de sodio (CH ₃ ONa), espectro UV-vis de muestra 3 con AlCl ₃ 5% y espectro UV-vis de muestra 3 con AlCl ₃ 5% + HCl 50%.....	103
FIGURA N°48: Espectro UV-vis y propuesta estructural de la muestra 5 de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha).....	104
FIGURA N°49: Espectro UV-vis de muestra 5 con Metóxido de sodio (CH ₃ ONa), espectro UV-vis de muestra 5 con AlCl ₃ 5% y espectro UV-vis de muestra 5 con AlCl ₃ 5% + HCl 50%.....	104
FIGURA N°50: Espectro UV-vis y propuesta estructural de la muestra 7 de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha).....	105
FIGURA N°51: Espectro UV-vis de muestra 7 con Metóxido de sodio (CH ₃ ONa), espectro UV-vis de muestra 7 con AlCl ₃ 5% y espectro UV-vis de muestra 7 con AlCl ₃ 5% + HCl 50%.....	105
FIGURA N°52: Espectro UV-vis y propuesta estructural de la muestra 8 de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha).....	106
FIGURA N°53: Espectro UV-vis de muestra 8 con Metóxido de sodio (CH ₃ ONa), espectro UV-vis de muestra 8 con AlCl ₃ 5% y espectro UV-vis de muestra 8 con AlCl ₃ 5% + HCl 50%.....	106
FIGURA N°54: Espectro UV-vis y propuesta estructural de la muestra 9 de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha).....	107
FIGURA N°55: Espectro UV-vis de muestra 9 con Metóxido de sodio (CH ₃ ONa), espectro UV-vis de muestra 9 con AlCl ₃ 5% y espectro UV-vis de muestra 9 con AlCl ₃ 5% + HCl 50%.....	107
FIGURA N°56: Espectro UV-vis y propuesta estructural de la muestra 10 de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha).....	108
FIGURA N°57: Espectro UV-vis de muestra 10 con Metóxido de sodio (CH ₃ ONa), espectro UV-vis de muestra 10 con AlCl ₃ 5% y espectro UV-vis de muestra 10 con AlCl ₃ 5% + HCl 50%.....	108

FIGURA N°58: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de UNMSM	109
FIGURA N°59: Diluciones del extracto etanólico en Dimetilsufóxido (DMSO) ...	109
FIGURA N°60: Cepas de microorganismos usados para los ensayos microbiológicos (<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922, <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591, <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15448).....	110
FIGURA N°61: Microorganismos con turbidez N° 0.5 (1.5×10^8 UFC/mL) según escala de Mc Farland	110
FIGURA N°62: Placas Petri preparadas con <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	111
FIGURA N°63: Placas Petri preparadas con <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984.....	111
FIGURA N°64: Placas Petri preparadas con <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591 y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15448	111
FIGURA N°65: Cabina de flujo laminar Telstar del laboratorio de Microbiología de UNMSM	112
FIGURA N°66: Realizando las microdiluciones en la cabina de flujo laminar	112
FIGURA N°67: Microplaca posterior a la incorporación de las muestras e inóculos.....	113

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo N° 1: Matriz de consistencia	86
Anexo N°2: Certificación botánica de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha).....	87
Anexo N° 3: Instrumento de recolección de datos	88
Anexo N° 4: Instrumento de recolección de datos	89
Anexo N° 5: Instrumento de recolección de datos	91
Anexo N° 6: Instrumento de recolección de datos	92
Anexo N° 7: Muestra vegetal	93
Anexo N° 8: Tratamiento del material botánico (hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha)).....	93
Anexo N° 9: Preparación del extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha)	95
Anexo N° 10: Ensayos fitoquímicos: Prueba de solubilidad	96
Anexo N° 11: Ensayos fitoquímicos: Marcha fitoquímica	97
Anexo N° 12: Ensayos Cromatográficos: Cromatografía en capa fina analítica	98
Anexo N° 13: Ensayos Cromatográficos: Cromatografía en capa fina preparativa	99
Anexo N° 14: Elucidación estructural de Flavonoides mediante espectroscopia UV-vis y con reactivos de desplazamiento	101
Anexo N° 15: Determinación de la actividad antimicrobiana: Método de difusión en agar.....	109
Anexo N° 16: Determinación de la actividad antimicrobiana: Método de dilución colorimétrica en microplaca	112

RESUMEN

El presente trabajo tuvo por objetivo evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha). Se determinaron los compuestos químicos mediante la marcha fitoquímica y se encontraron principalmente compuestos fenólicos tipo flavonoides. Utilizando técnicas cromatográficas y espectrofotometría UV-vis, se propuso la estructura de cinco flavonas y un flavonol: 4',7-dihidroxi flavona; 3',4',7-trihidroxi-6,8-dimetoxi flavona; 4',7-dihidroxi-6,8-dimetoxi flavona; 6,8-dihidroxi-3',4',7-trimetoxi flavona; 4',7-dihidroxi-3',5',6,8-tetrametoxi flavona; 4',7-dihidroxi-3'-metoxi-3-O-R flavonol. La actividad antimicrobiana se evaluó mediante el método de difusión en agar y el método de microdilución colorimétrico en microplaca. El método de difusión en agar se realizó con el extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a diferentes concentraciones de 200 mg/mL (100%), 100 mg/mL (50%) y 50 mg/mL (25%) frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. Se observó que a concentraciones de 200 mg/mL, 100 mg/mL y 50 mg/mL presentan halos de inhibición promedio de 19 mm, 18 mm y 17.3 mm respectivamente frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591; halos de inhibición promedio de 18 mm, 17 mm y 16.6 mm respectivamente frente a cepas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984; así mismo, frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15448 no presentó halos de inhibición en las diferentes concentraciones. En la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución colorimétrico en microplaca, el extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) de 200 mg/mL presentó una CMI=1000 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 y no presenta actividad a la concentración de ≤ 4000 µg/mL contra *Escherichia coli* ATCC 25922. Se concluye que el extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) tiene actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984.

Palabras clave: *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha), extracto etanólico, flavonoides, actividad antimicrobiana.

ABSTRACT

The present work had as objective to evaluate the antimicrobial activities “*in vitro*” of the ethanolic extract of the leaves of *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha). The chemical compounds were determined by phytochemical gait and mainly flavonoid-type phenolic compounds were found. Metabolites Chromatographic techniques and UV-vis spectrophotometry were used to propose the structure of five flavones and one flavonol: 4',7-dihydroxyflavone; 3',4',7-trihydroxy-6,8-dimethoxyflavone; 4',7-dihydroxy-6,8-dimethoxyflavone; 6,8-dihydroxy-3',4',7-trimethoxyflavone; 4',7-dihydroxy-3',5',6,8-tetramethoxyflavone and 4',7-dihydroxy-3'-methoxy-3-O-R flavonol. The antimicrobial activity was evaluated by the agar diffusion method and microdilution colorimetric method. The agar diffusion method was performed with the ethanolic extract of the leaves of *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) at different concentrations of 200 mg/mL, (100%), 100 mg/mL (50%) and 50 mg/mL (25%) against strains of *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442. It was observed that at concentrations of 200 mg / mL, 100 mg / mL and 50 mg / mL they show average inhibition halos of 19 mm, 18 mm and 17.3 mm respectively against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 33591; average inhibition halos of 18 mm, 17 mm and 16.6 mm respectively against strains of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984; likewise, against strains of *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15448 did not show inhibition halos in the different concentrations. At the minimum inhibitory concentration (MIC) by the microplate colorimetric microdilution method, the ethanolic extract of the leaves of *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) of 200 mg / mL presented a MIC = 1000 µg / mL against *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 and not It has activity at the concentration of ≤ 4000 µg / mL against *Escherichia coli* ATCC 25922. It is concluded that the ethanolic extract of the leaves of *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) has *in vitro* antimicrobial activity against strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 and *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984.

Keywords: *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha), ethanol extract, flavonoids, antimicrobial activity.

INTRODUCCIÓN

El Perú representa una vasta riqueza y potencial etnobotánica, se conoce que desde tiempos muy antiguos las culturas ancestrales indígenas usan las plantas medicinales como medio de curación para diversas enfermedades y dolencias. Esta larga historia de miles de años de costumbres, conocimientos, empleo y dominio popular de “hierbas” como medicina, se transfiere de generación en generación como una tradición que se sigue practicando en la actualidad ⁽¹⁾.

El género *Senecio* comprende un gran número de especies vegetales que en su mayoría se pueden encontrar en el Perú, se utilizan principalmente como antiinflamatorios, antimicrobianos y analgésicos; en investigaciones realizadas al género *Senecio* se ha comprobado su acción antibacteriana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Basillus subtilis*, *Escherichia coli* y actividad antifúngica sobre *Candida albicans* ^{(2) (3) (4)}.

La transformación y evolución constante de las bacterias infecciosas se produce tan aceleradamente que los nuevos fármacos antimicrobianos sólo tienen acción efectiva determinado tiempo, éstos quedan sin uso debido a la rápida resistencia microbiana; resulta entonces urgente identificar, impulsar y desarrollar estrategias para combatir las enfermedades causadas por microorganismos patógenos ⁽⁵⁾.

Conocedores de esta problemática, la presente investigación evaluó la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de las hojas *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha), a diferentes concentraciones, con la finalidad de buscar nuevos tratamientos antimicrobianos de origen vegetal que sirvan como alternativa farmacéutica o en combinación con los tratamientos convencionales frente a bacterias resistentes. Así mismo, se aportan posibles estructuras químicas de compuestos fenólicos tipo flavonoides (5 flavonas y 1 flavonol) elucidadas mediante técnicas cromatográficas y espectrofotometría UV-vis, probablemente responsables del efecto inhibitorio de determinados microorganismos.

CAPÍTULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1 Descripción de la realidad problemática

Las enfermedades infecciosas representan un problema crítico de salud pública y una de las principales causas de morbilidad y mortalidad, estas enfermedades causan el 26 por ciento de todas las muertes en el mundo, principalmente por cepas patógenas de bacterias resistentes, motivo por lo cual es considerado un problema de salud a nivel mundial ⁽⁶⁾.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2017 publicó un informe de patógenos prioritarios resistentes, este informe fue elaborado para tratar de dirigir y fomentar las investigaciones en el desarrollo de nuevos antibióticos y así responder a necesidades urgentes de salud pública. La OMS como gestor de las políticas sanitarias a escala global ha advertido sobre las tasas estadísticas muy altas de resistencia que presentan los fármacos antimicrobianos frente a microorganismos que producen infecciones bacterianas que se adquieren en la comunidad (infecciones de las vías urinarias, infecciones respiratorias, infecciones del torrente sanguíneo y neumonía) ⁽⁷⁾. Tal es el caso de *Staphylococcus aureus* del grupo de bacterias Gram positivas, es de los microorganismos de mayor importancia debido a sus altas tasas de morbilidad tanto como factor etiológico de enfermedades asociadas a partes blandas, así como su diseminación en la comunidad por portadores asintomáticos ⁽⁸⁾. *S. aureus* solía ser sensible a antibióticos de bajo espectro como la penicilina, en los últimos años se ha detectado una mayor incidencia de *Staphylococcus aureus* metilino resistente (MRSA), tanto de infecciones adquiridas en la comunidad, como de infecciones nosocomiales ⁽⁹⁾. El INS en el año 2016 informa que en nuestro país los agentes infecciosos más frecuentes reportados como aislados en pacientes de diferentes áreas de hospitalización son *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*

pneumoniae y *Pseudomonas aeruginosa*; además, que el 84 por ciento de infecciones asociadas a *S. aureus* no son susceptibles a betalactámicos por lo que se necesita antibióticos de amplio espectro para su tratamiento ⁽¹⁰⁾.

Desde que empezaron a utilizarse los antibióticos, se viene advirtiendo que, si no se lleva a cabo un uso racional de estos potentes fármacos, los agentes patógenos pueden crear resistencia contra ellos en poco tiempo ⁽¹¹⁾. La resistencia a los antibióticos es una acción desarrollada por las bacterias, siendo esta acelerada por procesos de selección y propagación debido al consumo inapropiado y diseminación de estos fármacos en la industria. Esto se traduce socialmente en un elevado costo en la salud pública al ser mayores los tiempos de tratamiento, mayor tiempo de hospitalización, mayor presupuesto en atención médica y aumento de la mortalidad ante el fracaso de tratamientos convencionales.

La industria farmacéutica ha ido buscando alternativas para la elaboración de nuevos antibióticos capaces de combatir los mecanismos de supervivencia adoptados por las nuevas cepas de súper bacterias. Sin embargo, estos nuevos compuestos químicos sólo son eficaces por tiempo determinado debido al uso implacable e indiscriminado de antibióticos por parte del personal de salud y la comunidad ⁽¹²⁾.

Los extractos vegetales y productos naturales o tradicionales de curación, poseen un gran potencial al inhibir el crecimiento de gérmenes patógenos y no provocar efectos indeseables ni resistencia bacteriana, por esto y ante la situación problemática descrita se ha realizado la presente investigación, cuyo propósito es evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a cepas de interés clínico. Se ha evidenciado su amplio uso en la medicina tradicional como antireumático, antiinflamatorio y tratamiento de heridas. En ese sentido este trabajo busca aprovechar y revalorar la riqueza biológica de nuestro país; así mismo, acelerar el proceso de nuevas investigaciones para el control de microorganismos involucrados en diferentes patologías y dar respaldo científico al conocimiento popular.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

¿Cuál es la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*?

1.2.2 Problemas específicos

- 1- ¿Cuáles serán los tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha)?
- 2- ¿El extracto etanólico de hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) presentará actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Escherichia coli*, a diferentes concentraciones?
- 3- ¿El extracto etanólico de hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) presentará actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, a diferentes concentraciones?
- 4- ¿El extracto etanólico de hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) presentará actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus epidermidis*, a diferentes concentraciones?
- 5- ¿El extracto etanólico de hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) presentará actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, a diferentes concentraciones?

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Determinar la actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a cepas de *Escherichia*

coli, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

1.3.2 Objetivos Específicos

- 1- Identificar los tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) posibles responsables de la actividad antimicrobiana.
- 2- Determinar diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) que presentan actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Escherichia coli*.
- 3- Determinar diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) que presentan actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.
- 4- Determinar diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) que presentan actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus epidermidis*.
- 5- Determinar diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) que presentan actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

1.4 Justificación e importancia del estudio

Desde tiempos muy antiguos el hombre ha usado los recursos vegetales como elementos para la elaboración de sus remedios curativos o preparaciones tradicionales, los cuales son tan antiguos como la propia humanidad y que fueron usados para el tratamiento y control de diversas enfermedades. Actualmente la aplicación de la medicina tradicional posee gran importancia ya que lejos de provocar efectos colaterales y resistencia microbiana, inhiben el crecimiento de microorganismos causantes de patologías ⁽¹³⁾.

Las plantas medicinales representan una alternativa muy importante para aislar nuevos metabolitos secundarios con propiedades antimicrobianas. Los estudios preliminares que evalúan actividad antimicrobiana de un microorganismo comienzan con demostrar el efecto de inhibición del crecimiento de bacterias en condiciones controladas. Posteriormente, se caracterizan cualitativa y cuantitativamente los compuestos orgánicos mediante fracciones que demuestren un rendimiento efectivo sobre un determinado microorganismo. De esta forma se podrían sintetizar nuevas moléculas con valor terapéutico innovador y de menores costos de producción.

Los medicamentos con los que se dispone en la actualidad pueden producir efectos adversos, en ocasiones efectos tóxicos; así mismo, recurrencia o resistencia ⁽¹⁴⁾. Por estas razones las investigaciones realizadas tienen como objetivo principal la búsqueda de principios activos de origen vegetal que puedan tener actividad inhibitoria de microorganismos mediante mecanismos de acción diferentes a los que poseen los fármacos de uso actual, esto significaría encontrar sustitutos mucho más seguros y eficaces que los fármacos antimicrobianos sintéticos ⁽¹⁵⁾.

La presente investigación en su procedimiento se propuso evaluar el efecto antimicrobiano *in vitro* que posee el *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a diferentes cepas de microorganismos causantes de diversas enfermedades. Con ello, obtener datos para mostrar los efectos antimicrobianos no estudiados con anterioridad, ya que por muchos años esta planta ha sido utilizada sólo como medicina tradicional y popular.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes del estudio

2.1.1 Nacionales

Vega L, et al. (2013). “Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de tallos y hojas de *Baccharis genistelloides*, *Perezia multiflora*, *Senecio sublutescens* y *Jungla paniculata* del Parque Nacional Huascarán (Perú) frente a cepas de interés clínico”. Realizaron trabajos con extractos hidroalcohólicos de hojas y tallos de la especie *Senecio sublutescens* a concentraciones de 25, 20, 15, 10 y 5 mg/mL, usaron el método de microdilución colorimétrica en microplacas para hallar la concentración mínima inhibitoria CMI del extracto frente a cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* en microplacas en un ambiente estéril. La evaluación se realizó mediante la observación del crecimiento bacteriano y reportaron los siguientes resultados: los tallos de *Senecio sublutescens* sólo tuvieron efecto sobre *Staphylococcus aureus* a una CMI de 20 mg/mL mientras que las hojas presentaron efecto sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* a CMI de 5 y 10 mg/mL respectivamente; las hojas y tallos no tuvieron efecto antimicrobiano frente a *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* ⁽¹⁶⁾.

Soto M. (2015). “Determinación del efecto antimicrobiano *in vitro* de un gel elaborado con extracto etanólico de hojas de *Senecio rhizomatus* Rusby (Asteraceae)”. La autora de esta investigación evaluó la actividad antimicrobiana de un gel que elaboró a concentraciones de 12,5 y 25 mg/mL del extracto etanólico de las hojas de *Senecio rhizomatus* Rusby; para evaluar el efecto antimicrobiano del gel utilizó el método de difusión en agar, usando como agente patógeno cepas de *Staphylococcus aureus* aislados de pacientes hospitalizados y de personas de la comunidad; mediante la

lectura e interpretación de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano se comprobó el efecto antibacteriano significativo del gel a concentración de 25 mg/mL, las placas presentaron halos de inhibición promedio de 18 mm para las cepas de *S. aureus* aislados de las muestras de pacientes hospitalizados y halos de inhibición promedio de 20 mm de las muestras de personas de la comunidad ⁽¹⁷⁾.

Marcos R, et al. (2015). “Determinación de fitoconstituyentes del extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera y su efecto antibacteriano *in vitro* frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*”. Reportaron gran variedad de metabolitos como aminoácidos, azúcares reductores, lactonas, triterpenos, esteroides, taninos, saponinas, alcaloides, antocianinas y flavonoides. Evaluaron la actividad antimicrobiana *in vitro* por el método de difusión en agar, usaron extractos hidroetanólicos a concentraciones crecientes (5,15 y 30%), el extracto al 30% (300 mg/mL) presentó halos de inhibición promedio de 23 mm y 18 mm frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* respectivamente ⁽¹⁸⁾.

Alderete E. (2017). “Actividad antimicrobiana, antioxidante *in vitro* y determinación de la composición química de tres aceites esenciales del género *Senecio* del Perú”. Para determinar el efecto antimicrobiano usó el método de microdilución colorimétrica en microplaca y así determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI). Frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 presentaron una CMI de 20 µL/mL para el aceite esencial de *Senecio nutans* Sch. Bip (Wiskataya), una CMI de 10 µL/mL para *Senecio calvus* Cuatrec (Huamanripa) y una CMI de 5 µL/mL para *Senecio chiquianensis* Cabrera. Así mismo frente a *Bacillus subtilis* ambiental el aceite esencial de *Senecio nutans* Sch. Bip (Wiskataya) presentó una CMI de 10 µL/mL, *Senecio calvus* Cuatrec (Huamanripa) una CMI de 0,625 µL/mL y *Senecio chiquianensis* Cabrera una CMI de 2,5 µL/mL. También, frente a *Escherichia coli* cepa clínica el aceite esencial de *Senecio nutans* Sch. Bip (Wiskataya) presentó una CMI de 40 µL/mL, *Senecio calvus* Cuatrec (Huamanripa) una CMI de 40 µL/mL y *Senecio chiquianensis* Cabrera una CMI de 20 µL/mL. Por último, reportó concentraciones inhibitorias mínimas para cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 para los aceites esenciales de *Senecio nutans* Sch. Bip (Wiskataya) presentó una CMI>40

$\mu\text{L}/\text{mL}$, *Senecio calvus* Cuatrec (Huamanripa) una CMI $>40\mu\text{L}/\text{mL}$ y *Senecio chiquianensis* Cabrera una CMI $=40\mu\text{L}/\text{mL}$. Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* fueron los más resistentes de los cuatro microorganismos usados por la autora en esta investigación ⁽¹⁹⁾.

Mamani L. (2017). “Actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos de *Senecio* spp (CHACHACOMA) en el crecimiento de *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* sp”. La autora de esta investigación realizada en la ciudad de Puno evaluó el efecto antibacteriano de los extractos alcohólicos de hojas y tallos de *Senecio* spp (CHACHACOMA) en concentraciones de 20,40,60,80 y 100% en el crecimiento in vitro de bacterias aisladas de pacientes con infección urinaria (logró aislar bacterias de *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Staphylococcus aureus* y no logró aislar *Enterococcus* sp), usó el método de Kirby Bauer o de difusión en agar con discos de sensibilidad. Los extractos alcohólicos de hojas y tallos presentaron efecto inhibitorio sólo en bacterias de *Staphylococcus aureus*, los extractos alcohólicos de hojas presentaron halos de inhibición promedio de 11mm (20%), 14mm (40%), 15mm (60%), 17mm (80%), 23mm (100%) y los extractos alcohólicos de tallos presentaron halos de inhibición promedio de 5mm (20%), 6mm (40%), 7mm (60%), 12mm (80%), 22mm (100%); mientras tanto *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp resultaron resistentes ⁽⁷³⁾.

2.1.2 Internacionales

Benites J, et al. (2011). “Composición y detección antimicrobiana del aceite esencial de las hojas y tallos de *Senecio atacamensis* Phil”. Este trabajo de investigación se realizó en Chile y tuvo como objetivo determinar la composición y la actividad antimicrobiana de las hojas y tallos de *Senecio atacamensis* Phil. La actividad antibacteriana de *S. atacamensis* fue evaluada por el método de microdilución colorimétrica en microplaca frente a cuatro cepas: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*. El aceite esencial de los tallos a concentraciones de 150 y 300 mg/mL tuvo actividad antibacteriana para

Klebsiella pneumoniae y *Staphylococcus aureus*, las hojas a concentraciones de 260 y 152.9 µg/mL tuvo actividad frente a *Klebsiella pneumoniae*. Así mismo *Enterococcus faecalis* y *Escherichia coli* fueron las cepas más resistentes a ambos aceites ⁽²⁰⁾.

Kahriman N, et al. (2011). “Composición química y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de la flor, hoja y tallo de *Senecio pandurifolius*”. Este trabajo de investigación se realizó en Turquía y los autores usaron el método de difusión en agar para determinar efecto antimicrobiano de la flor, hoja y tallo de la especie en estudio. Los aceites esenciales de hojas y flores presentaron buena actividad antimicrobiana frente a cepas de bacterias Gram-positivas y leve actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* con halos de inhibición de 7-8 mm; el aceite esencial del tallo presentó efecto antimicrobiano con halos de inhibición mayores a 10 mm sólo frente a cepas de bacterias Gram-positivas ⁽²¹⁾.

Deuschle R, et al. (2006). “Actividad Antimicrobiana de *Senecio Desiderabilis* Vellozo (Asteraceae)”. Este trabajo de investigación se realizó en Brasil y los autores analizaron extractos diclorometánico y etanólico de *S. desiderabilis* Vellozo en relación a su actividad antimicrobiana por el método de microdilución en caldo. El efecto más fuerte ocurrió con el extracto diclorometánico frente a *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* y *C. neoformans* var. *gatti* (MIC 50 µg/mL), *Saccharomyces cerevisiae* (25 µg/mL) y *Microsporium canis* (25 µg/mL). *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente y *Escherichia coli* no fueron inhibidos por ninguno de los extractos ⁽⁷⁴⁾.

2.2 BASES TEÓRICAS

2.2.1. Plantas Medicinales:

Numerosas especies vegetales contienen en su estructura una serie de principios activos, que pueden tener aplicación para el tratamiento de diversas afecciones, por sus atributos curativos estos vegetales son llamados “plantas medicinales”. Es innegable el valor que tienen las plantas medicinales para la medicina actual, desde épocas remotas, los preparados medicinales a base de hierbas fueron los únicos

medios de curación que se conocía y con el cual disponían los pobladores antiguos. Las culturas atávicas han tenido como base medicinal a las plantas. ⁽²²⁾.

Las plantas medicinales poseen metabolitos primarios (lípidos, glúcidos, derivados de aminoácidos, etc) considerados esenciales y encargados mediante procesos químicos de su subsistencia, desarrollo y evolución; además, contienen metabolitos secundarios o no esenciales, que para los humanos son considerados muy valiosos por presentar principios activos, que no sólo actúan como medio de protección ante microorganismos sino principalmente como sustancias químicas capaces de ejercer acción farmacológica beneficiosa o perjudicial sobre un organismo vivo ⁽²³⁾⁽²⁴⁾.

2.2.2. Familia Asteraceae

La familia *Asteraceae* es una de las familias de plantas más numerosas que existe en el mundo, presenta 1535 géneros y entre 23000-32000 especies. Las Asteráceas se encuentran distribuidas geográficamente casi por todo el mundo, desde las zonas costeras hasta las cordilleras más altas, tolerando y adaptándose tanto a climas como a condiciones ecológicas muy diversas ⁽²⁵⁾.

Asteraceae proviene del griego *ἀστήρ* que significa “estrella” y le dieron el nombre por la característica forma de su inflorescencia. Antiguamente se le conocía como “compuestas” alusivo al tipo singular de su inflorescencia compuesta, característica de esta familia ⁽²⁶⁾.

Las *Asteráceas* abarcan géneros con numerosas especies como: *Senecio* (1250 especies), *Hieracium* (1000 especies) y *Helichrysum* (600 especies). Las especies que conforman las asteráceas son plantas que se conocen por contener las moléculas lactonas sesquiterpénicas en su composición, las mismas que son objeto de atención y amplio interés de científicos e investigadores, en razón de la amplitud de alternativas de un conjunto de actividades biológicas que poseen tales como la actividad antiinflamatoria, antitumoral, citotóxica, antibacteriana, antimalaria y actividad neurotóxica y alérgica ⁽²⁷⁾.

2.2.3. Familia Asteraceae en el Perú

La familia *Asteraceae* está bien representada en todo el Perú, se encuentra distribuida en las regiones ecológicas de todos los departamentos, principalmente los valles mesoandinos; pueden ubicarse desde una altitud costera hasta los 4000 msnm. Las *Asteráceas* se encuentran en segundo lugar entre las familias más diversas y de mayor cantidad de especies en la flora peruana. En su mayoría son hierbas anuales o perennes, arbustos y subarbustos. Esta familia presenta aproximadamente 250 géneros y 1590 especies, reconociéndose 724 endemismos (695 especies reconocidas y 29 diversidades). Siendo *Senecio*, *Verbesina* y *Gynoxys*, los géneros que presentan gran cantidad de especies ⁽²⁷⁾.

2.2.4. Género Senecio

Este género fue establecido por Linneo, cuando solo se conocían 25 especies, en la actualidad este número se ha incrementado a aproximadamente 3000, las cuales se encuentran distribuidas a nivel mundial. Con una distribución mayormente cosmopolita, se encuentra en grandes cantidades en los Andes, la riqueza de estas especies distribuidas en Sudamérica radica en la diversidad de su morfología, presentando diversos tipos de hojas y con una gran diferencia en el crecimiento de unas a otras ⁽²⁸⁾. En el Perú se encuentran reconocidos 176 especies de *Senecio* distribuidos en las diferentes ecoregiones (desde la costa hasta alturas que dan límite a la flora y vasta vegetación), han sido registrados 97 especies endémicas (distribuidas en una ubicación geográfica muy concreta y restringida) ⁽²⁹⁾. Actualmente muchos autores registran la existencia de un porcentaje considerable (60%) de especies del género *Senecio* distribuidas en todo nuestro país, se reportan aproximadamente 106 especies ⁽³⁰⁾.

Los géneros más conocidos de plantas con fuentes importantes de alcaloides pirrolizidínicos son *Crotalaria*, *Heliotropium* y *Senecio*, los cuales presentan toxinas naturales, produciendo daños en el hígado como el síndrome de veno-oclusión, daños en las ramas pequeñas de las venas hepáticas y en casos más graves puede producir cirrosis hepáticas ⁽³¹⁾.

2.2.5. Estudio botánico de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha)

2.2.5.1 Taxonomía

Se realizó siguiendo el sistema de Clasificación de Cronquist (1981). (Anexo N° 2)

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Asteráceae

Género: *Senecio*

Especie: ***Senecio hyoseridifolius* Wedd**

Nombre común: Llancahuasha, cóndor-ripa, llangahuasa.

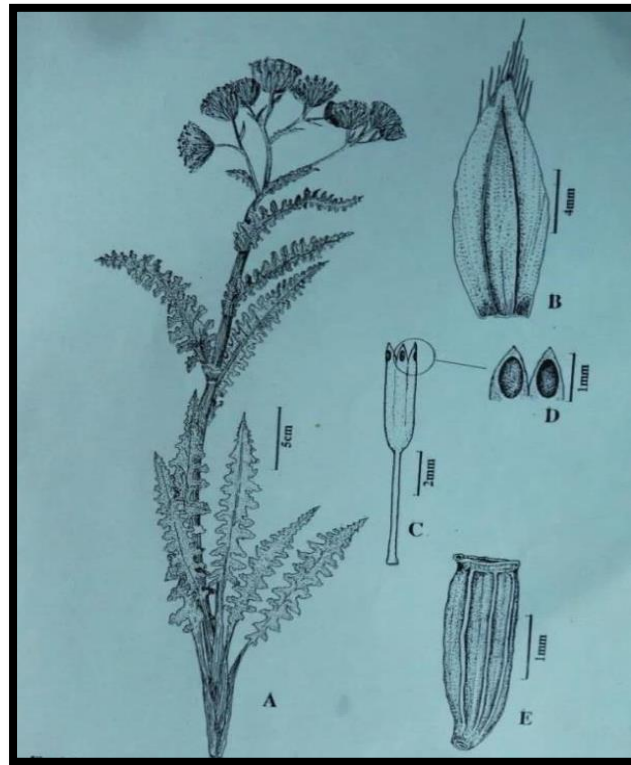


FIGURA 1: *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha)

Fuente: Herbario Hamilton Beltrán ⁽²⁸⁾

2.2.5.2 Descripción botánica

Sufrutice hasta 90 cm de alto; tallo glanduloso-pubescente, estriado. Hojas basales, peciolo rectos 7-8 cm de longitud anchamente amplexicaules; lámina runcinada 10-18 cm de longitud, 2-3.5 cm de ancho: lóbulos subopuestos 15-18 pares con borde dentado, ápice agudo, base atenuada ambas superficies glándulos pubescente. Capítulo discoideo, pedunculado, caliculado; cálculo formado por varias brácteas lineales glandulosos pubescentes algunas más grandes que las filarias 25 mm de longitud 2-3 mm de ancho; pedicelos ca. 2 cm de longitud.; receptáculo alveolado; involucro hemiesférico 13-15 mm de alto, 30 mm de diámetro, formado por 17-20 filarias foliáceas más largas que las flores 15 mm de longitud y 3 mm de ancho ovados, ápice largamente atenuado penicilado superficie dorsal glandulosa; flores ca. 200, hermafroditas, amarilla y corola campanulada de 4 mm de longitud. Pentadentado en cuyo áoice se localiza bolsas oleíferas ⁽²⁸⁾.

2.2.5.3 Distribución botánica

Esta especie ha sido reportada principalmente en Perú y Bolivia. En nuestro país distribuida a 2700-5000 metros de altura en los departamentos de Ancash, Cusco, Huancavelica, Junín, Lima y La Libertad. En Lima podemos ubicar esta especie en la provincia de Yauyos (específicamente en el distrito de Laraos) donde podemos encontrar su vegetación muy variada y diversa desde arbustos, hierbas y matorrales; “Llancahuasha” (nombre asignado por los pobladores) es rigurosamente periódica o estacional; es decir, en épocas de lluvias (diciembre-abril) los campos y montañas se encuentran cubiertas por esta especie de planta características por sus hojas verdes, largas y brillantes; en épocas secas o falta de agua (abril-noviembre) la cantidad de vegetación disminuye considerablemente y las hojas pierden su vitalidad encontrándose en su mayoría marchitas ⁽³²⁾.

2.2.5.4 Uso tradicional

El uso principal y popular que le dan a esta especie es de “medicina tradicional”. Los miembros de las comunidades de regiones altoandinas utilizan las hojas como emplasto medicinal para aliviar el dolor y la inflamación en caso de heridas; así mismo, las hojas se usan en infusión como antitusígeno en caso de bronquios, neumonía y

otras enfermedades respiratorias, en maceración para el acné. De acuerdo al uso que se le da en diferentes regiones del país, se sugiere una actividad antimicrobiana para esta planta. Además, el poblador es conocedor de sus efectos tóxicos en el hígado, pulmones y riñones en caso de uso excesivo ⁽³⁰⁾.

Los resultados que obtienen los pobladores altoandinos al usar esta planta en el tratamiento de varias afecciones que padecen son exitosos. Por lo antes expuesto los pobladores conocen a esta especie vegetal como “planta con poder maravilloso”⁽³²⁾.

2.2.6 Componentes químicos presentes en el género *Senecio*

El género *Senecio* presenta un gran número de especies en nuestro país, sus usos ancestrales han sido atribuidos al contenido que presentan al ser analizados; siendo sus metabolitos principales: compuestos fenólicos tipo flavonoides, además de alcaloides, taninos, terpenos, sesquiterpenos, lactonas, etc, quienes los responsables de las aplicaciones terapéuticas relacionadas a estas plantas ⁽³³⁾.

2.2.6.1 Flavonoides:

Flavonoide proviene del latín flavus el cual representa el tono amarillo y rojo análogo a la tonalidad de la miel ⁽³⁴⁾. Los flavonoides pertenecen a un grupo aromático que están generosamente repartidos entre el reino vegetal, y componen la mayor cantidad de las tonalidades entre amarillo, rojo y azul de las plantas y frutos. Las especies vegetales que contienen flavonoides presentan pigmentos originarios y característicos que son capaces de cuidar al organismo del perjuicio provocado por el medio ambiental, rayos de sol y agentes oxidativos. El hombre es incapaz de producirlos; por eso, se debe consumir en la alimentación o en forma de suplemento ⁽³⁵⁾. En 1930, el nobel Szent-György fue quien descubrió los flavonoides, a partir de la cáscara de limón, obtuvo la citrina con capacidad de regular la permeabilidad de los capilares sanguíneos. Los flavonoides fueron conocidos como vitaminas por su cualidad de permitir la regularización de la permeabilidad capilar y además de tener similitud con la vitamina C; sin embargo, no se pudo confirmar con exactitud su mecanismo de acción y se abandonó esta denominación en los años 1950 ⁽³⁶⁾.

A) Estructura química

Los flavonoides se forman biogénicamente mediante la ruta del ácido shikímico y del acetato-malonato, el primer flavonoide formado es la chalcona, a partir de ésta se derivan los demás flavonoides con modificaciones que ocurren en diferentes etapas. Los flavonoides se sintetizan partiendo de 4 moléculas (3 de malonil-CoA y 1 de fenil alanina), mediante reacciones bioquímicas controladas principalmente por dos enzimas: chalcona flavona isomerasa y chalcona sintasa. Los compuestos fenólicos del tipo flavonoides están formados por 15 carbonos y son de bajo peso molecular, su estructura está formado por dos anillos aromáticos fenólicos (A y B) unidos a un anillo heterocíclico de pirano (de acuerdo a los grupos funcionales que presenta se produce las variedades de flavonoides). La numeración de los átomos de Carbono es de 2-8 en los anillos A y C y de 2'-6' en el anillo B, como se muestra en la figura N°2 ⁽³⁴⁾.

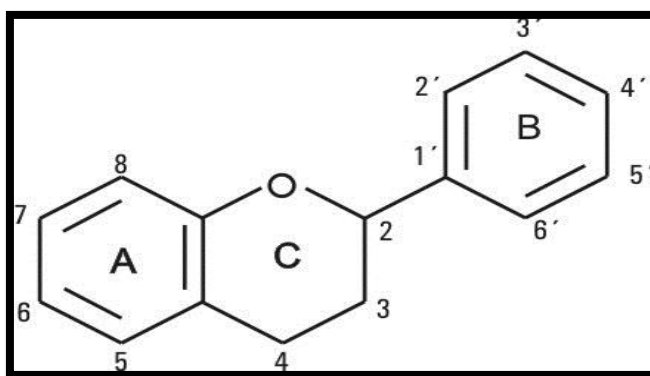


FIGURA 2: Estructura base del flavonoide

Fuente: Pérez Trueba (2003) ⁽³⁵⁾

B) Características generales

Presentan buena solubilidad en agua y etanol, debido a su esencia fenólica y al presentar anillos aromáticos y conjugados van a tener una intensa absorción en la luz ultravioleta y visible en el espectro. Una clasificación preliminar de los tipos de flavonoides en un extracto de alguna planta, puede realizarse en base inicialmente a un estudio de solubilidad y la aplicación de pruebas de coloración (marcha fitoquímica); seguido por pruebas de cromatografía realizadas del extracto y/o del extracto

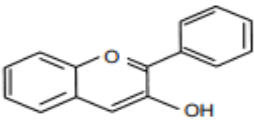
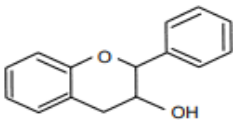
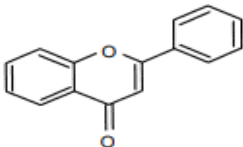
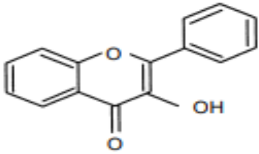
hidrolizado. La separación, identificación y elucidación estructural puede realizarse por procedimientos cromatográficos y espectroscópicos ⁽³⁶⁾.

Los flavonoides por sus diferentes tonalidades fueron empleados durante muchos años como colorantes de lana, actualmente se usa como conservadores de grasas o jugos de frutas debido a la capacidad antioxidante que poseen algunas polihidroxi flavonas. Cabe resaltar que se usan como edulcorantes a los glucósidos de dihidrochalconas y como veneno para insectos a la rotenona ⁽³⁶⁾.

C) Clasificación

Según sus características estructurales y por el lugar de sus sustituyentes en los carbonos 3 5 C4 C3, se pueden encasillar según la tabla N° 1.

Tabla N°1: Clasificación de flavonoides según su estructura

Nombre	Estructura química	Ejemplo
Antocianidinas	 <p style="text-align: center;">Antocianidina</p>	Antocianidina
Flavanol	 <p style="text-align: center;">Flavanol</p>	Catequina
Flavonas	 <p style="text-align: center;">Flavona</p>	Diosmetina
Flavonoles	 <p style="text-align: center;">Flavonol</p>	Quercetina

Fuente: Christopher Isaac *et al.* (2009) ⁽³⁶⁾.

D) Fuentes de flavonoides

Por lo general, se hallan en frutas, verduras, semillas y flores los que pueden ser parte de la dieta; también se puede unir a vitaminas y algunos minerales para tomarse de forma suplementaria. Además, los podemos encontrar en la síntesis de plantas como el arándano, *Ginkgo Biloba*, *Cardo Mariano* o *Crataegus*. La ubicación principal de estos flavonoides se encuentra en las hojas; Sin embargo, la cebolla presenta gran cantidad de quercetina 4'-D-glucósidos 17, simbolizando una inusual excepción ⁽³⁶⁾.

E) Propiedades biológicas

Los flavonoides son moléculas capaces de suprimir la formación de radicales libres al formar complejos con iones de metales pesados como Fe^{+3} , Cu^{+2} , Zn^{+2} : los cuales son capaces de catalizar muchos procesos y sobre todo transportar electrones para eliminar radicales libres. Los flavonoides tienen una gran capacidad antioxidante ya que son capaces de depurar Oxígeno reactivo que se encuentra en formas de radicales hidroxilos, peróxidos lipídicos (hidroperóxidos) y aniones superóxidos; esto gracias a tener grupos hidroxilos conformando su estructura ⁽³⁴⁾.

Se reportan efectos farmacológicos diversos para los flavonoides, tales efectos van a depender de los radicales o grupos funcionales que presenta su molécula base. Investigaciones realizadas destacan su actividad sobre el sistema cardiovascular en la disminución significativa de la fragilidad en los capilares y previniendo la formación de varicosidades (bioflavonoides del género *Citrus*: rutina y derivados); así mismo, pueden actuar como dilatadores de las coronarias (proantociandinas de *Crataegus*, *Arnica* y *Gingko*), espasmolíticos (glicósidos de apigenina) y como antihepatotóxicos (silimarina de *Silybum*) ⁽³⁷⁾.

F) Propiedad antimicrobiana

La capacidad antimicrobiana de los flavonoides ha sido reconocida en diversos estudios. En la actualidad se ha logrado aislar e identificar la estructura de flavonoides que tienen efecto antimicrobiano; por ejemplo: apigenina, galangina, pinocembrina, naringina, naringenina, galato de epigallocatequina y sus derivados, 7-O-glucósido de luteolina, quercetina, 3-O-metilquercetina y varios glicósidos de quercetina ⁽³⁸⁾. Algunos flavonoides aumentan considerablemente su acción antimicrobiana junto

otros agentes antimicrobianos; por ejemplo, se ha acomplejado 5-hidroxi-7,4-dimetoxiflavona con un número de metales de transición y se ha evidenciado que este proceso aumenta la actividad antimicrobiana ⁽³⁹⁾. Diferentes estudios han informado de un mayor efecto antimicrobiano de la 3-metilenflavanonas cuando el anillo B contenía bromo o cloro como sustituyentes ⁽⁴⁰⁾. Una investigación reportó que 2, 4- o 2, 6-dihidroxiación del anillo B y 5,7-dihidroxiación del anillo A en la estructura flavanona era importante para actividad inhibitoria contra *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina ⁽⁴¹⁾. En diversas investigaciones se reportaron la actividad de diferentes flavonoides incluyendo flavonas, flavanonas, isoflavonas e isoflavanones basado en el método de difusión en agar disco de papel ⁽⁴²⁾. Un estudio de investigación examinó dos isoflavonas con grupos hidroxilo en las posiciones 5, 2 y 4 usando un ensayo de dilución en agar, donde se detectó y reportó actividad frente a una amplia gama de estreptococos, y se dedujo que la hidroxilación en la posición 2 es fundamental para la actividad antimicrobiana ⁽⁴³⁾.

2.2.7. Descripción de cepas bacterianas

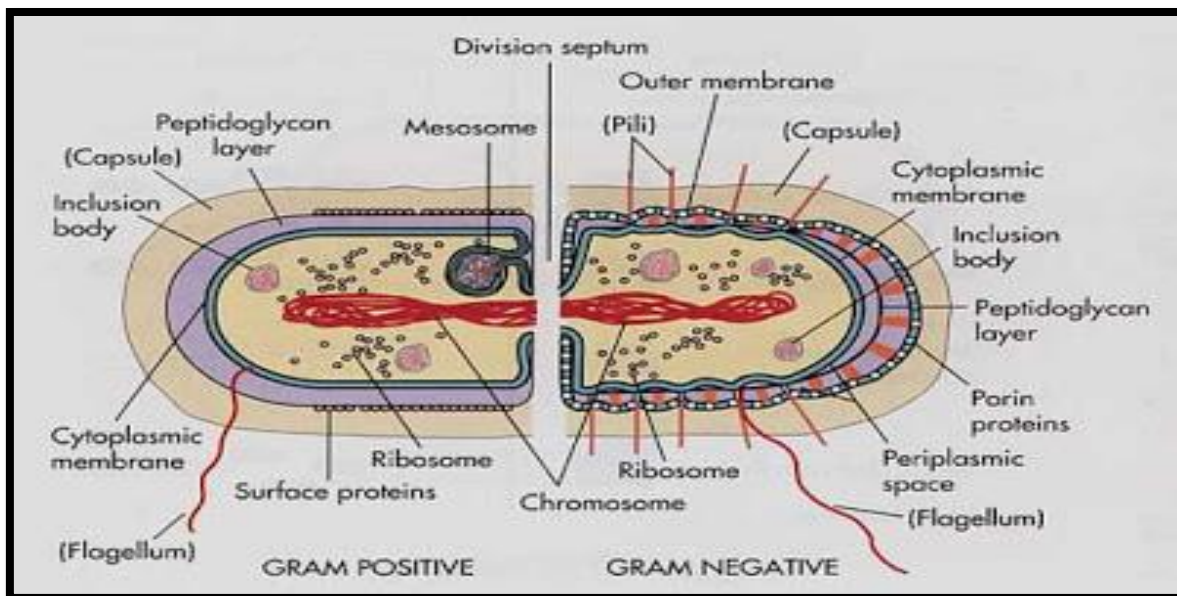


Figura N° 3: Estructuras de Gram positivas y Gram negativas

Fuente: Patrick R, et al. Microbiología médica (2009) ⁽⁴⁴⁾.

Tabla N°2: Diferencias entre una bacteria Gram positiva y otra Gram negativa

BACTERIAS GRAM POSITIVAS	BACTERIAS GRAM NEGATIVAS
Presenta una pared celular interna y una pared de peptidoglucano.	Presenta una pared celular más compleja: pared celular interna, pared de peptidoglucano, bicapa lipídica externa.
No presenta membrana externa	Membrana externa: saco rígido alrededor de la bacteria, mantiene estructura y es barrera impermeable a macromoléculas, brinda protección en situación de peligro.
No tiene espacio periplasmático	Espacio periplasmático: espacio entre la superficie externa de la membrana citoplasmática y la interna de la membrana externa.
La red de mureína está muy desarrollada y llega a tener hasta 40 capas.	La red de mureína presenta una sola capa
La penicilina mata a las gram positivas, ya que bloquea la formación de enlaces peptídicos entre las diferentes cadenas del peptidoglucano	La penicilina no mata a las Gram negativas, a causa de la capa de lipopolisacáridos situada en la parte externa de la pared celular.
No contiene LPS	Contiene LPS: estimulador de respuestas inmunes: activa células B, liberación de IL, FNT, IL 6 por macrófagos.
En la tinción de Gram, retienen la tinción azul	Quedan decoloradas.
Conservan el complejo yodocolorante	Pierden el complejo yodocolorante
Son esporulantes y no esporulantes, como <i>Streptococcus</i> , <i>Cisteria</i> , <i>Frankia</i> .	Pueden ser anaerobios o aerobios
Poseen otros componentes: ácidos teicoicos y lipoteicoicos, y polisacáridos complejos.	Poseen proteínas con concentraciones elevadas.

Fuente: Patrick R, et al. Microbiología médica ⁽⁴⁴⁾

2.2.7.1. Bacterias Gram Positivas:

A) *Staphylococcus aureus*:

Pertenece a la familia *Staphylococcaceae*. Son cocos Gram positivos, cuyas células miden aproximadamente 0.5-1.5 μm de diámetro, se encuentran microscópicamente agrupados en parejas, cadenas o racimos. La mayoría de los estafilococos producen catalasa, siendo esta capacidad la que lo diferencia de los géneros estreptococos y enterococcus, los cuales no producen catalasa. Las especies forman sus colonias en una zona específica del huésped. Actualmente se han reportado 35 especies y 17 subespecies en el género *Staphylococcus*. Los estafilococos son organismos oportunistas con una gran capacidad de adaptación, razón por la cual son muy patógenos, poseen la facultad de infectar, invadir y replicarse, por su fácil propagación se puede transmitir de una especie a otra, por ejemplo, humano-animales y viceversa. En caso de patogenicidad en humanos por estafilococos puede afectar piel, huesos, órganos internos. En las últimas décadas, la incidencia de infecciones por *Staphylococcus* ha aumentado de una manera significativa y alarmante, sobre todo las infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*, que es una especie bacteriana muy común y debido a su fácil diseminación ha evolucionado mucho desde su aparición. Así pues, las enfermedades provocadas por este microorganismo ya sea directamente o por acción de sus toxinas pueden ser muy variables, produciendo desde procesos poco importantes hasta infecciones causantes de mortalidad. Los mecanismos de propagación se presentan por el consumo de alimentos contaminados con la bacteria o sus toxinas; además es transmisible por contacto con personas, animales y/o elementos contaminados, presentándose principalmente por contaminación de heridas y mucosas. Esta bacteria es responsable del aumento de incidencias de bacteriemias nosocomiales.

S. aureus es capaz de invadir cualquier órgano o tejido y causar infecciones por colonizar piel y mucosas (foliculitis, forunculosis, impétigo, conjuntivitis, etc) habitualmente en fosas nasales, laringe, periné y región inguinal, de forma permanente o intermitente. También produce infecciones internas de gravedad en huésped con disminución de defensas, llegando a provocar meningitis, artritis séptica, endocarditis, osteomielitis y neumonía, llegando a poner en riesgo la vida del paciente. Es el

responsable del 13-19 por ciento de las neumonías intrahospitalarias junto con *P. aeruginosa*. El tratamiento de estas infecciones es algo muy complejo debido a la aparición de cepas que han desarrollado múltiple resistencia a los antimicrobianos o antibióticos. En el año 1961 se realizó en Inglaterra el primer aislamiento de *S. aureus* resistente a la meticilina (MRSA) y en el año 2002 se reportó en Estados Unidos la primera cepa de *S. aureus* con resistencia a la vancomicina (VRSA). Actualmente se necesita una implementación en la vigilancia de la resistencia de antibióticos y en las políticas de uso de antibióticos en servicios de consulta externa y emergencia ⁽⁴⁵⁾.

B) *Staphylococcus epidermidis*:

Es una bacteria oportunista, coagulasa negativa, no es pigmentado, no fermenta manitol, sensible a la novobiocina, suele ser saprófita y formar parte de flora normal de la piel. Por mucho tiempo fue considerado un agente bacteriano inocuo; sin embargo, su patogenicidad se presenta al producir infecciones en personas que se encuentren inmunodeprimidos y en pacientes que han sido sometidos a operaciones quirúrgicas donde se ha implantado algún tipo de dispositivo médico (catéteres endovasculares o venosos centrales, válvulas cardíacas y prótesis articulares). Actualmente su importancia de estudio radica en que el 30-47% de las infecciones antes mencionadas son causadas por esta bacteria. *Staphylococcus epidermidis* es una bacteria que tiene polisacáridos en su capa externa, el cual se une fuertemente al material que están elaborados los dispositivos médicos, causando biopelículas que se desarrollan provocando infecciones muy graves como endocarditis en pacientes con válvulas cardíacas ⁽⁴⁶⁾.

2.2.7.2. Bacterias Gram Negativas:

A) *Escherichia coli*:

Pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, bacilo Gran-negativo no esporulado, anaerobio facultativo, catalasa positiva, oxidasa negativa, móvil con flagelo o inmóvil. Considerado una bacteria que coloniza con gran facilidad y rapidez el aparato digestivo produciendo varias patologías infecciosas de índole gastrointestinal, representa más del 80 por ciento de todos los bacilos Gran-negativo aislados en los laboratorios. Existen cepas especiales de *E. coli* que ocasionan infecciones de vías urinarias y otras

que causan diarrea, estas cepas se clasifican como: enterotoxigena (ETEC), enteropatógena (EPEC), enteropenetrante (EIEC) y enterohemorrágica (EHEC). La ETEC es la causa frecuente de diarrea acuosa en lactantes y la principal causa de diarrea del viajero. Esta infección se produce al consumir alimentos o agua contaminada con heces, los microorganismos ETEC colonizan el intestino delgado donde se adhieren a la mucosa, las infecciones gastrointestinales causadas por *Escherichia coli* pueden tener complicaciones y llegar a ser muy graves ⁽⁴⁷⁾.

B) *Pseudomonas aeruginosa*

Pertenece a la familia *Pseudomonaceae*, bacteria Gran-negativa, aeróbica, generalmente de apariencia *in vitro* blanquecina perlada fluorescente, puede crecer a 42°C. *P. aeruginosa* actúa como agente oportunista y capaz de soportar situaciones climáticas extremas; además, está asociada con la contaminación de fuentes comunes como agua, antisépticos y equipos médicos; es una especie bacteriana que responsable de patologías extra e intrahospitalarias, resistente a muchos tratamientos antimicrobianos ⁽⁴⁸⁾. Los pacientes que se encuentran con inmunosupresión, enfermedades pulmonares, así como aquellos que han sufrido quemaduras severas, neutropenia inducida por quimioterapia son los más vulnerables. Sin embargo, se han aislado colonias de esta bacteria en las heces de personas sanas desde un 2 a 8 por ciento, lo que demuestra que tenemos contacto con esta bacteria y va depender cómo se encuentre el sistema de defensa del individuo para que se pueda desarrollar la infección ⁽⁴⁹⁾.

2.2.8. Actividad Antimicrobiana

Capacidad que tiene un medicamento sintético o un fitofármaco de inhibir el crecimiento microbiano. Las moléculas químicas que poseen este efecto antimicrobiano son ampliamente estudiadas e investigadas con la finalidad de controlar y suprimir las enfermedades provocadas por microorganismos patógenos. Las plantas son muy importantes fuentes de nuevos metabolitos secundarios potencialmente útiles y aplicables aún en estos tiempos. Algunos de los metabolitos responsables de los efectos terapéuticos de las plantas son: alcaloides, flavonoides, terpenoides y quinonas, que presentan propiedades antimicrobianas *in vitro* (Tabla N°3).

Actualmente, cientos de todos los fármacos dispensados en diferentes países tienen orígenes de plantas medicinales; sin embargo, pocos principios activos obtenidos de estas plantas están destinados a usarse como antimicrobianos ⁽⁵⁰⁾. El uso de productos naturales como terapia en las enfermedades data de mucho tiempo atrás y según reportes la población mundial sólo se usa el 1-10 por ciento de la totalidad de especies de plantas que hay en la tierra, la mayor parte de las plantas se usan para consumo y una pequeña porción son estudiadas y usadas con fines terapéuticos ⁽⁵¹⁾. La detección y aislamiento de los constituyentes químicos relativamente complejos de las plantas permite conocer los metabolitos secundarios que éstas poseen y le sirven de mecanismo de defensa frente a la depredación por microorganismos, insectos y herbívoros. Los compuestos fenólicos son los compuestos fitoquímicos más simples y cuya estructura está formada por un solo anillo fenólico sustituido. El Catecol, el pirogalol y los ácidos cinámicos y cafeico son los compuestos que representan a los fenoles y heterósidos fenólicos. Las plantas que producen estos compuestos son la gayuba (*Arctostaphylos uva ursi*), el tornillo (*Thymus vulgaris*) y la manzanilla (*Matriarca chamomilla*) y contienen como principio activo a la arbutina, que por muchos años ha sido usado como tratamiento eficaz contra bacterias y hongos, especialmente en casos de las infecciones urinarias. El mecanismo de acción de los compuestos fenólicos supone una toxicidad frente a los microorganismos al producir probablemente inhibición enzimática, mediante reacciones sulfhidrilo o por interacciones no específicas con proteínas; esta toxicidad se relaciona con la presencia de los grupos hidroxilos, por ejemplo, Catecol es un compuesto dihidroxilado, mientras que pirogalol es un compuesto trihidroxilado, la toxicidad será mayor de acuerdo al número de grupos -OH ⁽⁵²⁾. Los flavonoides son compuestos fenólicos que pueden contener en su estructura grupos funcionales como los hidroxilos y están unidos a un anillo aromático, son producidas por las plantas como respuesta a alguna infección bacteriana. Su actividad frente a microorganismos se debe probablemente a que forman complejos con proteínas solubles y extracelulares, además forman complejos con las paredes celulares microbianas y los flavonoides lipófilos son capaces de producir ruptura en las membranas de los microorganismos ⁽⁵³⁾.

Tabla N°3: Principales compuestos antimicrobianos de las plantas

Clase	Subclase	Ejemplo(s)	Mecanismo
Fenólicos	Fenoles Simples	Catecol	Privación del substrato
		Epicatequina	Destrucción de la membrana
	Ácidos Fenólicos	Ácido cinámico	
	Quinonas	Hipericina	Enlazar adhesinas formando complejos con la pared, inactiva enzimas
	Flavonoides	Crisina	Enlazar adhesinas
	Flavonas	Abyssinone	Formar complejos con la pared celular
			Inactiva enzimas
			Inhibir la transcriptasa inversa del VIH
	Flavonoles	Totarol	
	Taninos	Elagitanino	Une a las proteínas
			Enlazar adhesinas
			Inhibición de enzimas
			Privación del substrato
Formar complejos con la pared celular			
Destrucción de la membrana			
Cumarinas	Warfarina	Formar complejos con el ión metálico	
		Interacción con el ADN eucariota (actividad antiviral)	
Terpenos, aceites esenciales		Capsaicina	Destrucción de la membrana
Alcaloides		Berberina	Intercalarse en la pared celular y/o ADN
		Piperina	
Lectinas y polipéptidos		Manosa específica-Aglutina	Bloquea la fusión viral o adsorción
		Fabatin	Forma puentes disulfuros
Poliacetilenos		8S-Heptadeca-2(z), 9(z)-diene-4,6-diino-1,8-diol	

Fuente: Murphy. Plant products as Antimicrobial Agents (1999) ⁽⁵³⁾.

2.2.9. Metodologías para evaluar la actividad antimicrobiana.

Existen diversos métodos in vitro para evaluar la actividad antibacteriana de un extracto; sin embargo, esta puede depender de factores como la sensibilidad del microorganismo y la solubilidad del agente antibacteriano. Tenemos los siguientes métodos para evaluar la actividad antimicrobiana:

2.2.9.1. Método de difusión:

La técnica está basada en el método descrito por Bauer *et al.*, (método de Kirby-Bauer). Según Kirby-Bauer “este método *busca establecer, en forma cualitativa y cuantitativa la susceptibilidad de las cepas bacterianas ante el agente antibacteriano*”. Fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, (National Committee for Clinical Laboratory Standards) de Estados Unidos ⁽⁵⁴⁾.

El método de difusión en agar es conocido también como la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión y establece en forma cuantitativa, la actividad antimicrobiana de las sustancias en estudio frente a cepas bacterianas comunes o aislados de alguna patología infecciosa. El método está basado en la relación que existe entre la concentración de la sustancia (necesaria para inhibir una cepa bacteriana) y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado, sembrado homogéneamente con la cepa bacteriana y sobre la cual se forma un pozo donde se agrega una cantidad conocida de la sustancia en estudio. En el caso de evaluar varias sustancias los pozos deben formarse en forma equidistante. La incubación se realiza a una temperatura adecuada por 24 horas luego se mide el halo de inhibición y se comparan los efectos antimicrobianos de las distintas sustancias sobre el microorganismo estudiado, con el antibiótico control. La lectura de los resultados representa la actividad *in vitro* de la sustancia. Las lecturas de los halos de inhibición están clasificadas en categorías de interpretación de las pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos establecidas por el NCCLS, la clasificación es la siguiente: sensible (S), intermedia (I) o resistente (R). Es necesario tomar en cuenta que el tamaño del halo de inhibición es influenciado por múltiples factores como el medio de cultivo en que se realiza la prueba, la capacidad de difusión del compuesto, cantidad de inóculo, tiempo de generación del microorganismo, sensibilidad al antibiótico, y período de incubación. Cualquier alteración de alguno de los factores puede alterar el resultado de la prueba; sin embargo, al usar un procedimiento estandarizado es posible obtener resultados veraces y confiables ⁽⁵⁴⁾.

2.2.9.2. Método de dilución:

Es el método que sirve para determinar la sensibilidad antimicrobiana por dilución, usado para establecer la cantidad mínima de agente antimicrobiano, que después de 24 horas de incubación, es capaz de inhibir el crecimiento de los microorganismos (concentración mínima inhibitoria CMI y la concentración mínima bactericida CMB) ⁽⁵⁴⁾.

En la técnica de dilución en caldo, se usan microplacas (microdilución) que contienen concentraciones crecientes de la sustancia antimicrobiana en estudio (ejemplo: extracto vegetal). La bacteria es inoculada en los pocillos de las microplacas y la MIC es determinada después 24 horas de incubación. En la lectura de resultados se examina la bacteria crece o no en cada una de los pocillos. El método de microdilución en caldo es una técnica muy útil para establecer MIC, en un gran número de muestras. La ventaja sobre los métodos de difusión radica en el aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con extractos de plantas, además permite diferenciar entre una actividad bactericida o bacteriostática ⁽⁵⁵⁾.

2.3 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS

2.3.1 Hipótesis general

El extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) presenta actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

2.3.2 Hipótesis Específicas

- 1- El extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) presenta metabolitos secundarios posibles responsables de la actividad antimicrobiana.
- 2- El extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a diferentes concentraciones presenta actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Escherichia coli*.

- 3- El extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a diferentes concentraciones presenta actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.
- 4- El extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a diferentes concentraciones presenta actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus epidermidis*.
- 5- El extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a diferentes concentraciones presenta actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

2.4 VARIABLES

2.4.1 Tabla de Operalización de Variables

Tabla N° 4: Operalización de variables

VARIABLE	DIMENSIÓN	INDICADOR	ESCALA
Variable Independiente Extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha).	Fitoquímica	-Presencia de metabolitos secundarios: flavonoides, alcaloides -Concentraciones del extracto etanólico.	- 25% - 50% - 100 %
Variable Dependiente Actividad antimicrobiana	Microbiológica	-Diámetro del halo de inhibición -Concentración mínima inhibitoria (CMI)	- Milímetros de diámetro - µg/mL

Fuente: Elaboración propia

2.4.2 Marco Conceptual

1. **Bactericida:** Tienen la característica de matar la bacteria, su actividad terapéutica es inalterable ⁽⁵⁶⁾.
2. **Bacteriostático:** Es aquello que impide la multiplicación bacteriana, la cual se reinicia de una vez que se detiene la medicación ⁽⁵⁷⁾.
3. **Cepa:** Conjunto de bacterias que son producto de una misma especie ⁽⁵⁸⁾.
4. **Colonia:** Multiplicación bacteriana en medios de desarrollo adecuado, a partir de una célula bacteriana madre ⁽⁵⁸⁾.
5. **Concentración:** Cantidad de un soluto contenida en una cantidad determinada de solvente o en una cantidad determinada de solución ⁽⁵⁹⁾.
6. **Disco de sensibilidad:** Placas en forma de disco que contienen algún agente antimicrobiano, usado para pruebas de sensibilidad microbiana ⁽⁵⁸⁾.
7. **Droga vegetal:** Totalidad o porción vegetal crudo (raíz, tallos, hojas, frutos, etc) usado como medio terapéutico ⁽⁶⁰⁾.
8. **Escala McFarland:** Es una técnica de medición de turbidez, su utilidad es destacada para crecimiento de microorganismos como medida de la concentración celular ⁽⁶¹⁾.
9. **Extracto vegetal:** Producto que se obtiene al someter alguna parte de la planta a diversos procesos físicos, químicos o microbiológicos que permiten extraer principios activos útiles ⁽⁶⁰⁾.
10. **Incubación:** Conservación de cultivos bacterianos brindándoles un ambiente propicio para para su crecimiento y multiplicación ⁽⁵⁸⁾.
11. **Inóculo:** Muestra de un cultivo bacteriano que es trasladado a un medio de cultivo ⁽⁵⁸⁾.

12. Maceración: Técnica de extracción sólida (parte o totalidad de una especie vegetal)-líquida (agua, alcohol, aceite, etc) que se utiliza para separar principios activos ⁽⁶²⁾.

13. Medicina tradicional: Conjunto de conocimientos y tradiciones ancestrales sobre tratamientos terapéuticos basado en especies vegetales ⁽⁶²⁾.

CAPÍTULO III: MÉTODO

3.1 Tipo de estudio

Descriptiva, básica y transversal.

3.2 Diseño a utilizar

El diseño es experimental-*in vitro*, donde se determinó los principales metabolitos secundarios presentes en la muestra vegetal y la sensibilidad antimicrobiana de la muestra. Es decir, se realiza una medición de la variable independiente y dependiente.

3.3 Población vegetal

100 plantas por m² de *Senecio hyoseridifolius* Wedd. (Llancahuasha) en el distrito de Laraos, provincia de Yauyos, departamento de Lima.

3.4 Muestra vegetal

La muestra es 3500 gramos de hojas frescas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha).

3.5 Población de cepas bacterianas

Cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

3.6 Muestra de cepas bacterianas

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 33591
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442

3.7 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Para la presente investigación se usó la técnica de observación y posteriormente se registraron los datos en fichas de observación ad-hoc:

- Fichas de observación ad-hoc: prueba de solubilidad (Anexo N°3).
- Fichas de observación ad-hoc: marcha fitoquímica (Anexo N°4).
- Fichas de observación ad-hoc: actividad antimicrobiana: método de difusión en agar (Anexo N°5) y método de microdilución colorimétrica en microplaca (Anexo N°6).

3.7.1 Equipos, materiales, reactivos e insumos

3.7.1.1 Equipos

- Autoclave (ALP MC-30 LDP)
- Baño María
- Balanza analítica (sartorius cpa2245)
- Balanza digital (OHAUS PIONEER)
- Cabina de flujo laminar TELSTAR
- Espectrofotómetro UV-visible (SHIMADZU 1900)
- Estufa (L-C OVEN 0-200 °C)
- Incubadora (INCUCCELL LSIS-B2V/IC 55)
- Mechero Bunsen

3.7.1.2 Materiales

- Asa de Drigalsky
- Beakers de vidrio 50, 100 mL
- Baguetas
- Capilares para cromatografía
- Celdas de cuarzo.
- Cromatofolios con silicagel GF 254
- Cuba cromatográfica
- Discos vacíos para difusión en placa
- Embudos
- Frascos ámbar (capacidad 3L)

- Fiolas de 10mL
- Matraces de vidrio 50, 250, 500 mL
- Micropipetas de vidrio 20-200 μ L y 0.5-5 mL
- Mortero
- Papel filtro whatman N° 40
- Pinza punta plana
- Pipetas de 1,2, 5, 10 mL
- Placas de poliestireno de 96 pozos (BRAND)
- Placas Petri estériles
- Probetas de vidrio de 50, 100, 250 mL,
- Puntas para micropipeta de 20-200 μ L y 0.5-5 mL.
- Rayadores de acero inoxidable.
- Recipiente de plástico.
- Tips
- Vaso precipitado de vidrio
- Vernier
- Viales de vidrio estériles

3.7.1.3 Reactivos y solventes

Reactivos (QP):

- Ácido clorhídrico (HCl) 50 %
- Ácido sulfúrico (H₂SO₄) 10%
- Agua destilada
- Amoníaco (NH₃)
- Cloruro férrico
- Dimetilsufóxido DMSO (Merck)
- Metóxido de sodio (CH₃ONa)
- R. Gelatina 1%
- R. Hidróxido de sodio
- R. Ninhidrina 1%

- R. Shinoda
- R. Mayer
- R. Dragendorff.
- R. Wagner
- Resazurina (Sigma-Aldrich, USA)
- Tricloruro de aluminio (AlCl₃) 5%
- Tricloruro férrico (FeCl₃) 1%

Solventes:

- Acetato de etilo
- Benceno
- Cloroformo
- Diclorometano
- Metanol
- Etanol 96°

3.7.2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

La presente investigación se realizó siguiendo el diagrama de flujo de la Figura N°4.

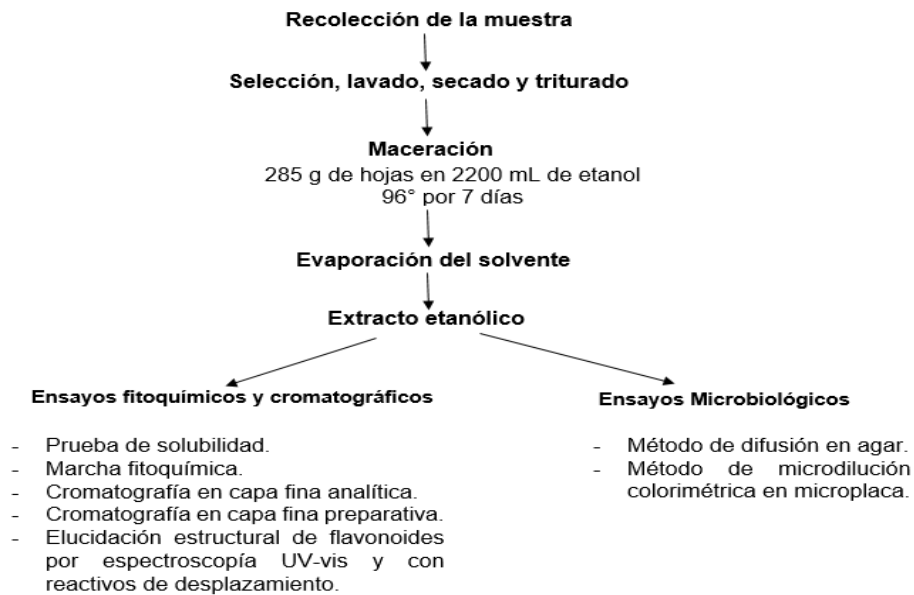


Figura N°4: Diagrama de flujo del procedimiento experimental

Fuente: Elaboración propia

3.7.2.1 Recolección del material botánico:

Se recolectó 3500 gramos de hojas frescas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) del distrito de Laraos en la provincia de Yauyos, departamento de Lima. La recolección de la especie se realizó en el mes de febrero de 2019. (Anexo N°7). Un ejemplar completo de la planta fue identificado y clasificado taxonómicamente según Sistema de Clasificación de Cronquist 1981 por el biólogo Hamilton Beltrán (Anexo N°2).

3.7.2.2 Tratamiento del material botánico

- **Selección y lavado:** Se realizó una cuidadosa selección de hojas, luego se limpiaron mecánicamente y se lavaron con abundante agua potable, para posteriormente enjuagar con agua destilada.
- **Secado:** Durante 3 días se realizó secado natural al aire libre bajo sombra y luego se llevó a secar a una estufa a 40 °C por 7 días.
- **Triturado y pesado:** Se procedió a triturar las hojas secas por medio mecánico (triturado con la mano) y el peso de hojas trituradas fue de 285 gramos.

3.7.2.3 Preparación del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha).

La preparación del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) se realizó por el método de maceración, en un recipiente de vidrio ámbar de boca ancha de 3 Litros de capacidad, se colocaron 285 gramos de hojas de Llancahuasha trituradas. Luego se agregó alcohol etílico de 96° hasta cubrir la muestra (2 cm por encima de la muestra), usando un total de 2200 mL de alcohol etílico. Se dejó en reposo por un periodo de 7 días con agitación periódica de 10 minutos, dos veces al día. Culminada el tiempo de maceración, se filtró el total de la solución utilizando algodón y gasa por un tiempo aproximado de 90 minutos. Al líquido filtrado se le llamó extracto etanólico. Finalmente, el extracto se colocó en un recipiente de vidrio y se llevó a la estufa a 40 °C hasta obtener un extracto seco de peso de 76.9 gramos. (Anexo N° 9)

3.7.2.4 Ensayos fitoquímicos

A) Prueba de solubilidad:

1. A 7 tubos de ensayo se colocó una muestra de 5 mg del extracto seco.
2. Luego se adicionó a cada tubo 1 mL de solventes diferentes a analizar y se agitó hasta observar. (Anexo N° 10)

Tabla N° 5: Tabla de solventes ordenados de acuerdo a su polaridad

SOLVENTES						
Benceno	Diclorometano	Cloroformo	Acetato de etilo	Metanol	Etanol	Agua
No Polar	Poco Polar	Medianamente Polar	Medianamente Polar	Polar	Polar	Polar

Fuente: Investigación fitoquímica, Olga Lock ⁽⁶³⁾

b) Marcha Fitoquímica:

Para la detección de los compuestos químicos, se realizan las reacciones de precipitación y coloración.

Muestra problema: extracto etanólico seco.

Reactivos: Gelatina 1%, Ninhidrina, Dragendorff, Mayer, tricloruro férrico, hidróxido de sodio, Shinoda.

Procedimiento:

En un tubo de ensayo se colocó 5 mg del extracto seco, se adicionó 7 mL de etanol y se agitó por 2 minutos. Luego se distribuyó en 7 tubos de ensayo y se añadieron reactivos según lo descrito por Lock ⁽⁷⁹⁾.

Taninos: 1 mL de muestra + 2 gotas de reactivo gelatina al 1%.

Aminoácidos libres: 1 mL de muestra + 2 gotas de reactivo Ninhidrina.

Alcaloides: 1 mL de muestra + 2 gotas del reactivo Dragendorff.

1 mL de muestra + 2 gotas del reactivo Mayer

Compuestos fenólicos: 1 mL de muestra + 2 gotas de FeCl₃

Quinonas: 1 mL de muestra + 2 gotas del reactivo Hidróxido de sodio

Flavonoides: 1 mL de muestra + cintas de Mg + gotas de HCl concentrado

Agitar y observar (Anexo N° 11)

3.7.2.5 Ensayos cromatográficos

A) Cromatografía en capa fina analítica

Muestra Problema: extracto etanólico seco.

Fase Móvil: acetato de etilo: metanol (3:1)

Fase Estacionaria: placas cromatográficas de Sílica gel G₆₀ Merck (7x2.5 cm).

Solución de reactivos reveladores: FeCl₃ al 1% (presencia de compuestos fenólicos), NH₃ (presencia de flavonoides) y Dragendorff (presencia de alcaloides).

Procedimiento:

- Se colocó una muestra del extracto seco en un tubo de ensayo donde se le añadió metanol para disolverlo, seguidamente con un cromatofolio se procedió a sembrar, agregando muestra problema en dos puntos equidistantes en cada cromatoplaca (se sembraron 3 cromatoplacas).
- Las cromatoplacas fueron dejadas en una cámara cromatográfica, en donde la fase móvil recorrió hasta tres cuartas partes de la fase estacionaria, el tiempo de recorrido de las muestras fue de 50 minutos. Terminado el recorrido sacamos la placa de la cubeta y esperamos a que seque.
- Luego se revelaron las placas mediante una lámpara de luz UV a longitudes de onda de 254 nm y 365 nm para observar.
- Finalmente se revelaron las placas con los reactivos reveladores: FeCl₃ 1%, NH₃ y Dragendorff para identificar metabolitos secundarios. (Anexo N°12)

B) Cromatografía en capa fina preparativa

Muestra Problema: extracto etanólico seco.

Fase Móvil: acetato de etilo: metanol (60:20)

Fase Estacionaria: placas cromatográficas de Sílica gel G₆₀ Merck (20x5 cm).

Procedimiento:

- Se colocó una muestra del extracto seco en un tubo de ensayo donde se le añadió metanol para disolverlo, seguidamente con un cromatofolio se procedió a sembrar, agregando muestra problema en dos puntos equidistantes en la cromatoplaca (5 veces en cada punto).
- La cromatoplaca fue dejada en una cámara cromatográfica, en donde la fase móvil recorrió hasta tres cuartas partes de la fase estacionaria, el tiempo de recorrido de las muestras fue de 75 minutos. Terminado el recorrido sacamos la placa de la cubeta y esperamos a que seque.
- Finalmente se revelaron las placas mediante una lámpara de luz UV a longitudes de onda de 254 nm y 365 nm para observar. (Anexo N° 13)

C) Elucidación estructural de Flavonoides mediante espectroscopía UV-vis y con reactivos de desplazamiento.

- Separamos las manchas de la placa cromatográfica usada en la cromatografía preparativa, a través, de raspado y se obtuvo 10 fracciones de sílica gel.
- Cada fracción de sílica gel obtenida, se disolvió en un beacker con 5ml de etanol y se obtuvo 10 soluciones disueltas en etanol.
- Filtramos cada solución y luego fueron almacenadas en viales para su posterior lectura (cada solución filtrada fue denominada como Muestra: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10)
- Se llevó cada muestra al espectrofotómetro UV-vis a una longitud de onda de 200- 400 nm y se evidenció presencia de compuestos químicos (flavonoides) en las muestras: 3, 5, 7, 8, 9, 10.

- Posteriormente se realizó elucidación estructural de flavonoides mediante espectroscopia UV-vis con reactivos de desplazamiento:
 1. A cada muestra se agregó 3 gotas de Metóxido de sodio (CH_3ONa), luego se llevó al espectrofotómetro UV-vis a una longitud de onda de 200-400 nm para su lectura correspondiente.
 2. Luego a otra alícuota de cada muestra se agregó 3 gotas de AlCl_3 5% y 3 gotas de HCl 50%, se llevó al espectrofotómetro UV-vis a longitud de onda de 200-400 nm para su lectura correspondiente.

3.7.2.6 Metodología para determinar la actividad antimicrobiana

Los ensayos microbiológicos se realizaron bajo la supervisión y asesoramiento académico de la docente Dra. Q.F María Elena Salazar Salvatierra, en los laboratorios de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

A) Método de difusión en agar:

La determinación de la sensibilidad antimicrobiana se realiza mediante el método de Kirby-Bauer o conocido como método de difusión en agar. Este método valora la capacidad inhibitoria de un antimicrobiano frente a bacterias patógenas. El diámetro en milímetro del halo de inhibición que forma el antimicrobiano (por ejemplo, el extracto vegetal) después de 18-24 horas de incubación revela su facultad para impedir el crecimiento de determinadas cepas bacterianas ⁽⁶⁴⁾.

a.1) Microorganismos

Se realizaron los ensayos experimentales con 4 cepas de microorganismos.

- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus* ATCC 33591
- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15448

a.2) Preparación del inóculo

Las 4 cepas de microorganismos en estudio se encontraban en reserva criogénica a -80°C , fueron incubadas a 37°C por 24 horas en placas de agar tripticasa soya (TSA).

Luego se tomó una cantidad de colonias de microorganismos y en tubos de ensayos se diluyó con solución de suero fisiológico estéril 0.9%, hasta obtener una solución con un patrón de turbidez similar a 0.5 de los estándares de Mac Farland (1.5×10^8 UFC/mL).

a.3) Preparación de las placas

El agar Mueller-Hinton fue previamente reconstituido con agua destilada según indicaciones del fabricante. Luego se realizó la esterilización del agar mediante el autoclavado a 121°C y 15lb/pg^2 durante 15 minutos. Posteriormente se dejó enfriar y se mantuvo en baño maría a $45^\circ\text{-}50^\circ\text{C}$. Cada 100 mL de agar fue inoculado con 1 mL del inóculo bacteriano preparado (1.5×10^8 UFC/mL). Se usó placas Petri esterilizadas de 90 mm de diámetro y el agar homogenizado e inoculado fue distribuido en estas placas a razón de 20 mL por placa, luego se dejó enfriar y secar para rotular cada placa con los nombres de los microorganismos en estudio. Finalmente, en condiciones estériles y usando un sacabocado de acero (11 mm de diámetro) se procede a realizar en el interior de cada placa 3 pozos equidistantes.

a.4) Preparación de las diluciones del extracto

Se realizaron diluciones a partir del extracto seco, se diluyó con dimetilsulfóxido (DMSO) hasta obtener concentraciones de 200 mg/mL (100%), 100 mg/mL (50%) y 50 mg/mL (25%).

- Se pesó 600 mg del extracto seco en un vial estéril y se agregó 3 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), luego agitar hasta obtener una disolución, obteniendo una concentración de 200mg/mL. A este se denominó solución patrón (solución al 100%).
- Se cogió dos viales de vidrio estéril, en la cual se añadió 1.5 mL de DMSO en cada vial, luego de la solución patrón se extrae 1.5 mL, añadiendo al vial N° 2 y del vial N° 2 se extrae 1.5 mL y se añadió al vial N° 3.

a.5) Inoculación, incubación de las placas

Se agregó 100 μL de las diferentes diluciones preparadas de los extractos etanólicos en los pozos hechos anticipadamente en las placas Petri. Luego de 1 hora de reposo a temperatura ambiental, las placas fueron incubadas a una temperatura de 37°C por

24 horas. Los ensayos fueron realizados por triplicado. La lectura de resultados se realizó después de las 24 horas de incubación donde se observó las zonas de clara inhibición del crecimiento bacteriano y se registró en diámetros (mm) los halos de inhibición. (Figuras N° 8, 9, 10, 11).

De la misma forma se realizó con la muestra en blanco con DMSO.

B) Método de microdilución colorimétrico en microplaca:

Este método está basado en la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del agente antimicrobiano en diluciones de agar o caldo a la cual es susceptible el crecimiento *in vitro* de un aislado de bacteria aeróbica en condiciones estandarizadas de preparación de inóculos, tiempo y temperatura de incubación. En una microplaca con pocillos, se agregan cantidades iguales de las concentraciones geométricamente ascendentes de la sustancia antimicrobiana, además de un número fijo de la bacteria aerobia inmersa en un medio de crecimiento líquido, como el caldo Mueller-Hinton. Por último, el indicador del crecimiento bacteriano redox resazurina, que luego de un tiempo (16-20 horas) se evalúa si hubo o no crecimiento bacteriano por cambio de la coloración o sedimento en los pocillos de incubación en comparación con los controles respectivos y estableciendo el valor de la CMI ⁽⁶⁵⁾.

b.1) Preparación de las muestras

Se procedió a pesar 200 mg del extracto etanólico seco, luego se disolvió con 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), obteniéndose una concentración de 200mg/mL. Posteriormente se prepararon diluciones seriadas, obteniéndose un total de 10 diluciones concentradas, el extracto en estudio tuvo concentraciones finales de 4000-7.82 µg/mL.

b.2) Inóculos y condiciones de cultivo

Se utilizó cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Los inóculos bacterianos fueron sembrados en placas de agar tripticasa soya (ATS) e incubados a 37°C por 24 horas. Las cepas preparadas después de las 24 horas, se retiró una cantidad mínima de cada inóculo con el asa de siembra estéril y se suspendió en solución salina estéril al 0.9% hasta obtener una turbidez equivalente

al tubo 0.5 de la escala de Mc Farland (1.5×10^8 UFC/ml). Luego por cada 10 mL del inóculo preparado se agregó 50 μ L del indicador (resazurina).

b.3) Preparación del control de esterilidad

Se preparó usando 2 mL de caldo Mueller-Hinton y se agregó 10 μ L de resazurina.

b.4) Procedimiento de la prueba de microdilución colorimétrica

Esta prueba se realizó en base a la metodología modificada de Sarker S. *et al* ⁽⁶⁶⁾.

La prueba se desarrolló usando microplaca de poliestireno estéril de 96 pocillos con fondo de forma en U, en una cabina de flujo laminar. Las muestras fueron preparadas a concentraciones de 4000-7.82 μ g/mL, usando técnicas de dilución serial. En esta prueba se incorporaron pocillos de control de esterilidad (caldo Mueller-Hinton), pocillos de ensayo (bacterias más caldo Mueller-Hinton más extracto 100%) y pocillos de control de crecimiento (bacterias más caldo Mueller-Hinton). Las pruebas se realizaron con dos cepas bacterianas y por triplicado.

La incorporación de las muestras e inóculos se realizó en orientación horizontal de la microplaca como se detalla en la tabla N°5, se utilizó 6 filas y 12 columnas por cada muestra, espaciadas por 2 filas sin utilidad. La disposición para la incorporación de muestras e inóculos fue la siguiente:

- A la 4° y 5° (D-E) fila no se les dio utilidad (vacías).
- En la columna 1 se agregó 200 μ L del control de esterilidad.
- En las columnas 2 y 3 se agregaron 100 μ L de la muestra preparada.
- De la columna 3 hasta la columna 12, se agregó 100 μ L de caldo Mueller Hinton.
- De la columna 3 hasta la columna 11, se realizaron diluciones sucesivas transfiriendo 100 μ L.
- De la columna 2 hasta la columna 12, se le agregó 100 μ L del inóculo.

Al finalizar la incorporación de las muestras e inóculos en la microplaca, se procedió a la incubación en la estufa a condiciones de 37 °C por un tiempo de 18-24 horas.

Tabla N°6: Disposición para la incorporación de muestras e inóculos en la microplaca.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	CE	4000 µg/mL	2000 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62.5 µg/mL	31.25 µg/mL	15.62 µg/mL	7.82 µg/mL	CC	S.a.
B	CE	4000 µg/mL	2000 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62.5 µg/mL	31.25 µg/mL	15.62 µg/mL	7.82 µg/mL	CC	S.a.
C	CE	4000 µg/mL	2000 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62.5 µg/mL	31.25 µg/mL	15.62 µg/mL	7.82 µg/mL	CC	S.a.
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
F	CE	4000 µg/mL	2000 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62.5 µg/mL	31.25 µg/mL	15.62 µg/mL	7.82 µg/mL	CC	E.c.
G	CE	4000 µg/mL	2000 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62.5 µg/mL	31.25 µg/mL	15.62 µg/mL	7.82 µg/mL	CC	E.c.
H	CE	4000 µg/mL	2000 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	125 µg/mL	62.5 µg/mL	31.25 µg/mL	15.62 µg/mL	7.82 µg/mL	CC	E.c.

Leyenda:

CE: Control de esterilidad CC: Control de crecimiento

S.a: *Staphylococcus aureus* E.c: *Escherichia coli* (-): Pocillo vacío

b.5) Lectura e interpretación de los resultados de la concentración mínima inhibitoria (MIC);

Se inspeccionó de forma visual notificando cualquier variación de color azul púrpura hacia rosado rojizo como crecimiento bacteriano positivo, así mismo, se consideró como CMI a la concentración más baja a la cual se mantuvo la coloración azul-púrpura, sin variación del color inicial, así mismo se calculó el valor promedio de las tres diluciones a la cual no hubo variación de color y se reportó como CMI.

3.8 Procesamiento de datos

Los datos recolectados se organizaron, enumeraron y fueron ingresados al programa Microsoft Excel con sus respectivas codificaciones.

Estos datos, posteriormente fueron transferidos al programa IBM SPSS Statistic versión 25 para su análisis estadístico. La contrastación de las hipótesis se llevó a

cabo mediante la prueba paramétrica ANOVA de un factor, previa realización de pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas.

Los resultados de análisis estadísticos fueron plasmados en tablas. Se consideró un margen de error estadístico de 5%.

CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

4.1.1 Prueba de solubilidad

Tabla N°7: Prueba de solubilidad del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha).

NÚMERO DE TUBO	SOLVENTE	RESULTADO
Tubo n° 1	Benceno	+
Tubo n° 2	Diclorometano	+
Tubo n° 3	Cloroformo	+
Tubo n° 4	Acetato de etilo	+
Tubo n° 5	Metanol	++
Tubo n° 6	Etanol	+
Tubo n° 7	Agua	-

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

(-) No soluble

(+) Poco Soluble

(++) Soluble

La prueba de solubilidad y la marcha fitoquímica puede determinar la clasificación o el tipo de compuesto orgánico que contiene la muestra ⁽⁶³⁾.

4.1.2 Marcha fitoquímica

Tabla N°8: Marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha).

REACTIVO	IDENTIFICACIÓN	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
Reactivo de Gelatina 1%	Taninos	-	No presenta precipitado.
Reactivo de Ninhidrina	Aminoácidos libres	-	No cambia a coloración azul violeta.
Reactivo de Dragendorff	Alcaloides y compuestos aminados	++	Presenta tono rojo
Reactivo de Mayer		++	Presenta precipitado lechoso
Reactivo de Tricloruro férrico	Compuestos fenólicos	+++	Presenta color intenso negro
Reactivo de Hidróxido de sodio	Quinonas	+	Presenta tono rojizo
Reactivo de Shinoda	Compuestos fenólicos tipo flavonoides	+++	Presenta tono rojo

Fuente: Elaboración propia

Leyenda:

(+++): Muy abundante

(++) : Abundante

(+) : Moderado

(-) : Ausente

4.1.3 Ensayos cromatográficos

A) Cromatografía en capa fina analítica

Tabla N°9: Identificación de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha).

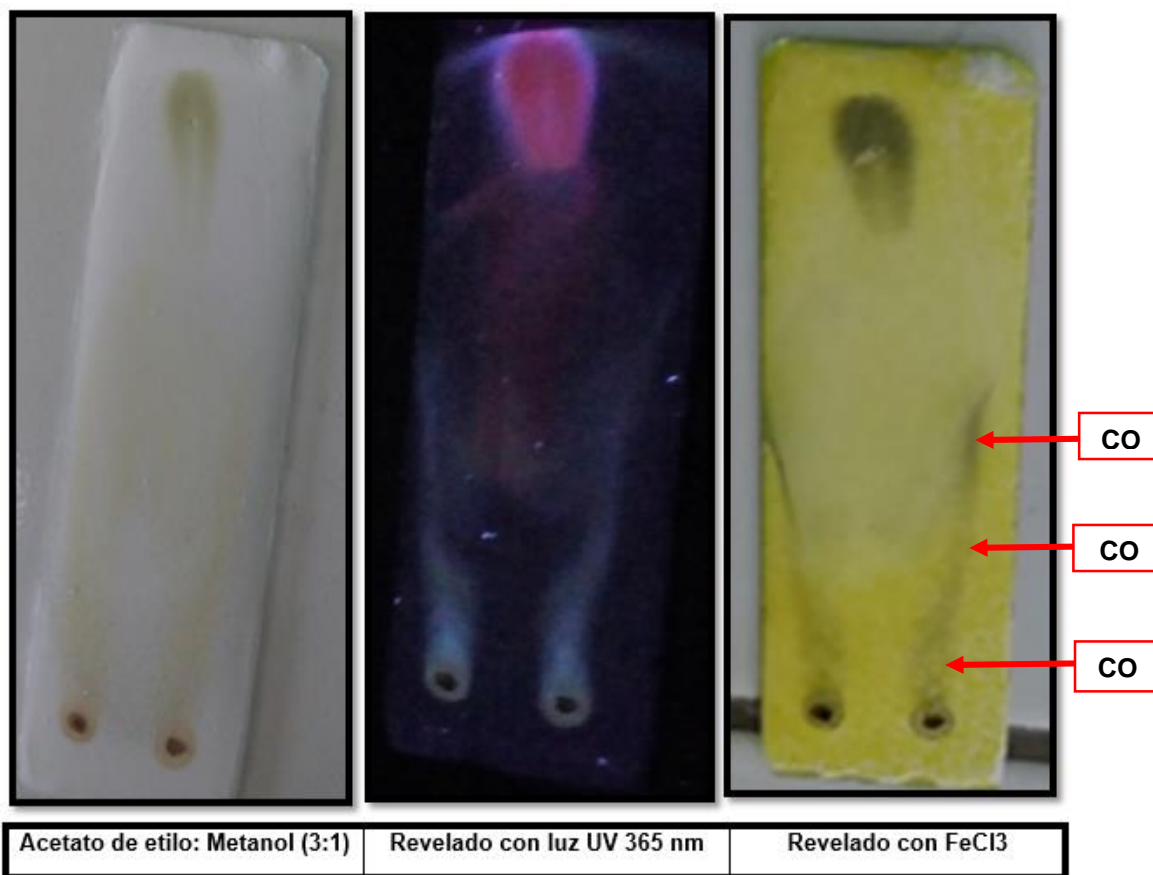
Reactivos reveladores	Color de mancha en la microplaca a luz UV	Tipos de metabolito secundario
FeCl ₃ 1%	Coloración oscura (manchas oscuras)	COMPUESTOS FENÓLICOS
NH ₃	Coloración verde claro (manchas amarilla verdosa o verde claro)	FLAVONOIDES
Dragendorff	Coloración anaranjado (manchas anaranjadas)	ALCALOIDES

La identificación de metabolitos secundarios mediante cromatografía en capa fina, puede hacerse por el color que desarrollan en luz UV, apareciendo con manchas de colores, las cuales cambian después de su exposición a los reactivos reveladores. Geissman y Markhanm reportan la relación que existe entre los colores y la posible identificación de los metabolitos secundarios⁽⁶³⁾.

- Cromatografía en capa fina analítica del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) revelado con luz UV 365 nm y con reactivo revelador FeCl₃ al 1%.

Sistema de solventes: Acetato de etilo: Metanol (3:1).

Las manchas color oscuro que se visualizan al utilizar FeCl₃ al 1% indican la presencia de compuestos fenólicos ⁽⁶³⁾.



CO= Coloración oscuro

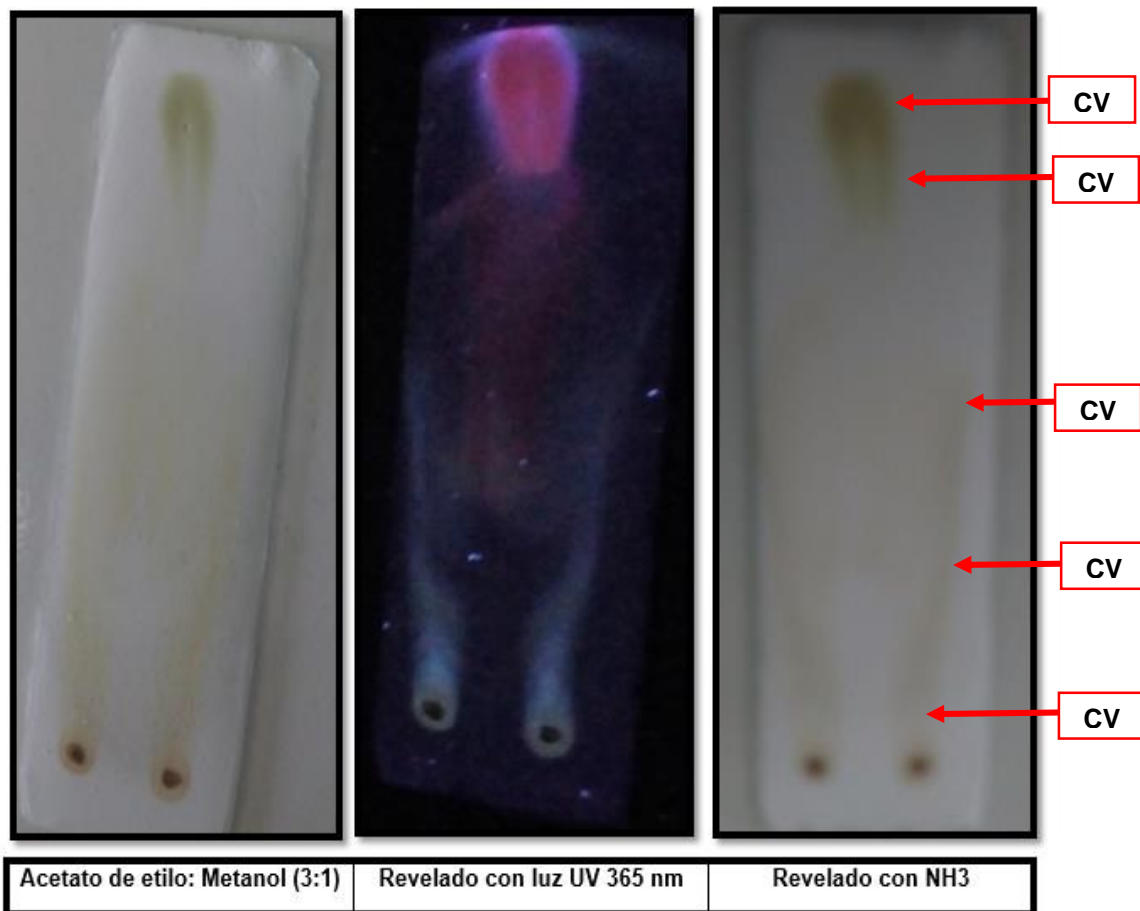
Figura N°5: Cromatografía en capa fina para la identificación de compuestos fenólicos

Fuente: Elaboración propia

- Cromatografía en capa fina analítica del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) revelado con luz UV 365 nm y con reactivo revelador NH₃.

Sistema de solventes: Acetato de etilo: Metanol (3:1).

Las manchas verdes claras que se visualizan al utilizar NH₃ indican la presencia de flavonoides ⁽⁶³⁾.



CV= Coloración verde claro

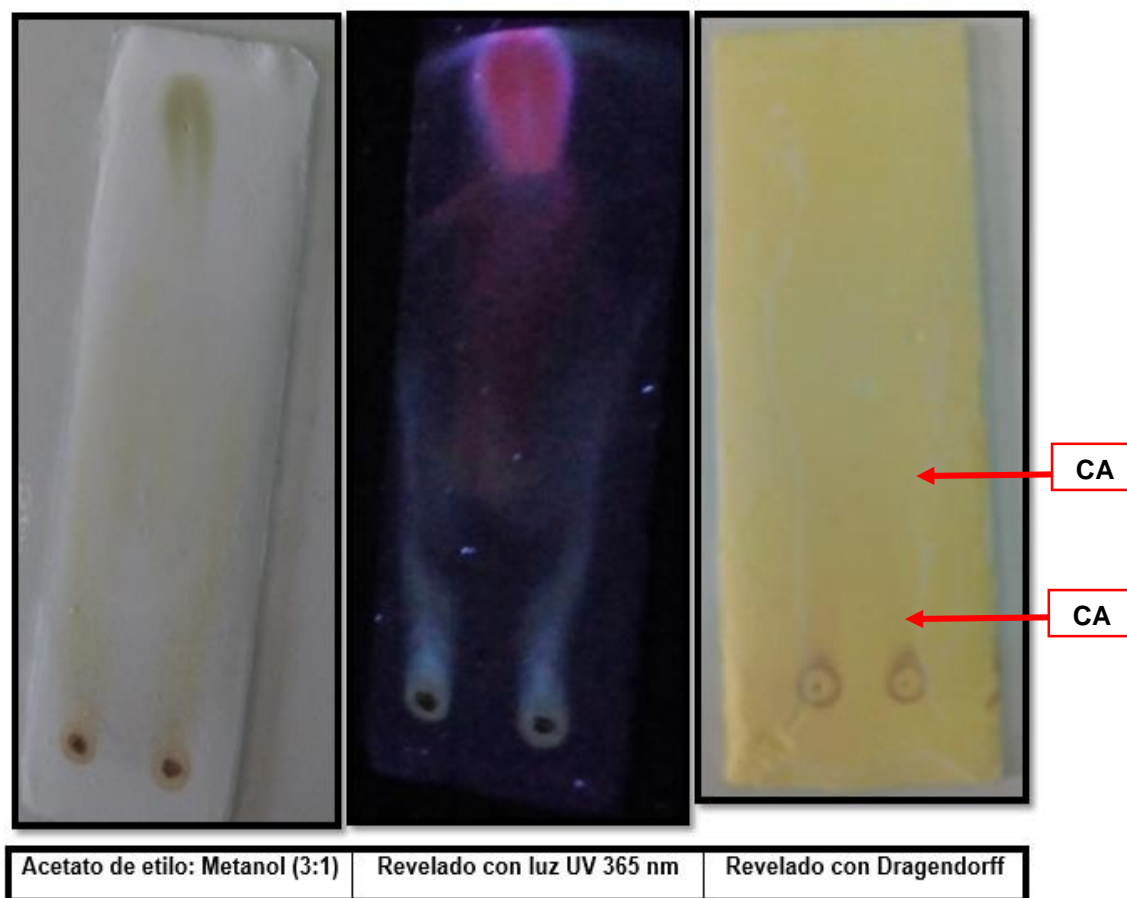
Figura N°6: Cromatografía en capa fina para la identificación de flavonoides.

Fuente: Elaboración propia

- Cromatografía en capa fina analítica del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) revelado con luz UV 365 nm y con reactivo revelador Dragendorff.

Sistema de solventes: Acetato de etilo: Metanol (3:1).

Las manchas rojo anaranjado que se visualizan al utilizar Dragendorff indican la presencia de alcaloides ⁽⁶³⁾.



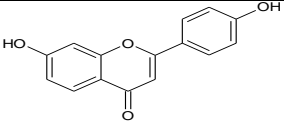
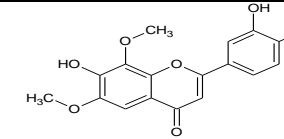
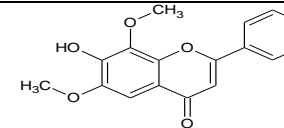
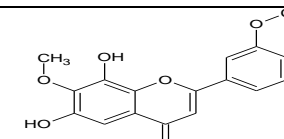
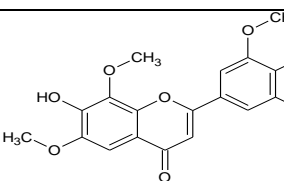
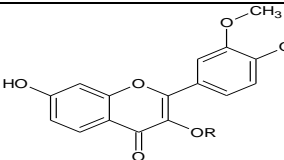
CA= Coloración anaranjado

Figura N°7: Cromatografía en capa fina para la identificación de alcaloides.

Fuente: Elaboración propia

B) Elucidación estructural de Flavonoides mediante espectrofotometría UV-vis y con reactivos de desplazamientos. (Anexo N°14)

Tabla N° 10: Tipos de flavonoides elucidados mediante espectrofotometría UV-vis y con reactivos de desplazamientos.

Tipos de flavonoides	Nombre IUPAC	Estructura química
FLAVONAS	4',7-dihidroxi flavona	 <p>4',7-dihidroxi flavona</p>
	3',4',7-trihidroxi-6,8-dimetoxi flavona	 <p>3',4',7-trihidroxi-6,8-dimetoxi flavona</p>
	4',7-dihidroxi-6,8-dimetoxi flavona	 <p>4',7-dihidroxi-6,8-dimetoxi flavona</p>
	6,8-dihidroxi-3',4',7-trimetoxi flavona	 <p>6,8-dihidroxi-3',4',7-trimetoxi flavona</p>
	4',7-dihidroxi-3',5',6,8-tetrametoxi flavona	 <p>4',7-dihidroxi-3',5',6,8-tetrametoxi flavona</p>
FLAVONOL	4',7-dihidroxi-3'-metoxi-3-O-R flavonol	 <p>4',7-dihidroxi-3'-metoxi-3-O-R flavonol</p>

4.1.4 Determinación de la actividad antimicrobiana

A) Método de difusión en agar:

Los resultados del método de difusión en agar para determinar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha), se presentan en la tabla N° 11 y en las figuras del 8 hasta al 11. Para realizar la evaluación de resultados tipo cualitativa, se tomó como referencia las pautas de Duraffourd (usada para precisar la actividad antimicrobiana-*in vitro*- según el tamaño del diámetro del halo de inhibición) ⁽⁷²⁾:

- Nula (-): diámetro \leq 8 mm
- Sensible (+): diámetro entre 8-10 mm
- Muy sensible (++) : diámetro entre 14-20 mm
- Sumamente sensible (+++) : diámetro $>$ 20 mm

En la tabla N° 11 y en la figura N° 8, se observa que el extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a concentraciones de 200 mg/mL (100%), 100 mg/mL (50%) y 50 mg/mL (25%) presentan halos de inhibición promedio de 19 mm, 18 mm y 17.3 mm respectivamente frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591; por lo tanto, según escala de Duraffourd, se considera a *Staphylococcus aureus* **muy sensible** a las 3 concentraciones del extracto. También, en la tabla N° 11 y en la figura N° 9, se observa que el extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a concentraciones de 200 mg/mL (100%), 100 mg/mL (50%) y 50 mg/mL (25%) presentan halos de inhibición promedio de 18 mm, 17 mm y 16.6 mm respectivamente frente a cepas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984; por lo tanto, según escala de Duraffourd, se considera a *Staphylococcus epidermidis* **muy sensible** a las 3 concentraciones del extracto. Finalmente, en la tabla 11 y en las figuras N° 10 y 11, se observa que el extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) no tiene actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15448 ya que no presentan halos de inhibición.

Tabla N°11: Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) por el método de difusión en agar.

CONCENTRACIÓN (%) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha).	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICION (mm)			
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15448
100% (200mg/mL)				
PLACA 1	00	19.0	18.0	00
PLACA 2	00	19.0	18.0	00
PLACA 3	00	19.0	18.0	00
50 % (100mg/mL)				
PLACA 1	00	18.0	17.0	00
PLACA 2	00	18.0	17.0	00
PLACA 3	00	18.0	17.0	00
25 % (50mg/mL)				
PLACA 1	00	17.5	16.5	00
PLACA 2	00	17.0	17.0	00
PLACA 3	00	17.5	16.5	00
Control				
Dimetilsufóxido (DMSO)	00	00	00	00

Fuente: Elaboración propia.

Cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 33591

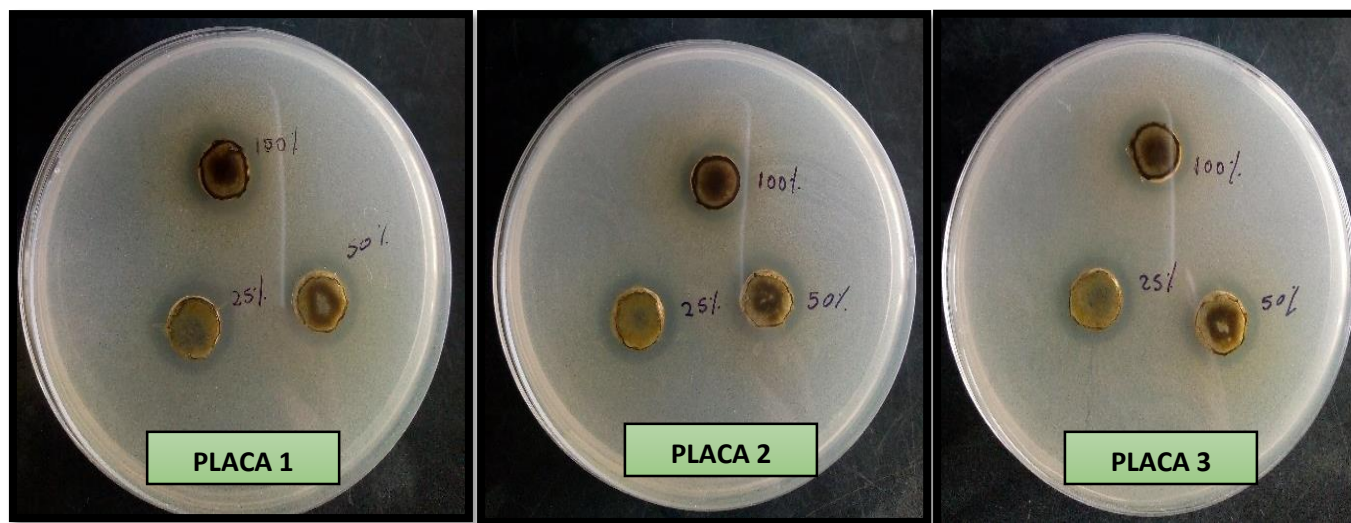


Figura N°8: Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a 200 mg/mL (100%), 100 mg/mL (50%) y 50 mg/mL (25%) por el método de difusión en agar frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

Cepa *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984

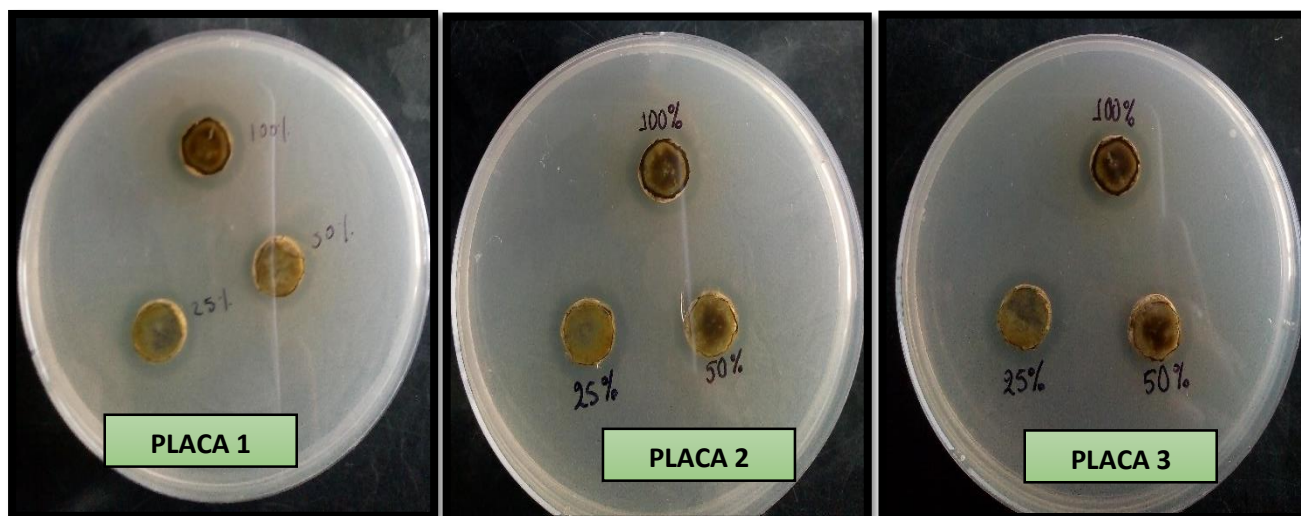


Figura N°9: Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a 200 mg/mL (100%), 100 mg/mL (50%) y 50 mg/mL (25%) por el método de difusión en agar frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984.

Cepa *Escherichia coli* ATCC 25922

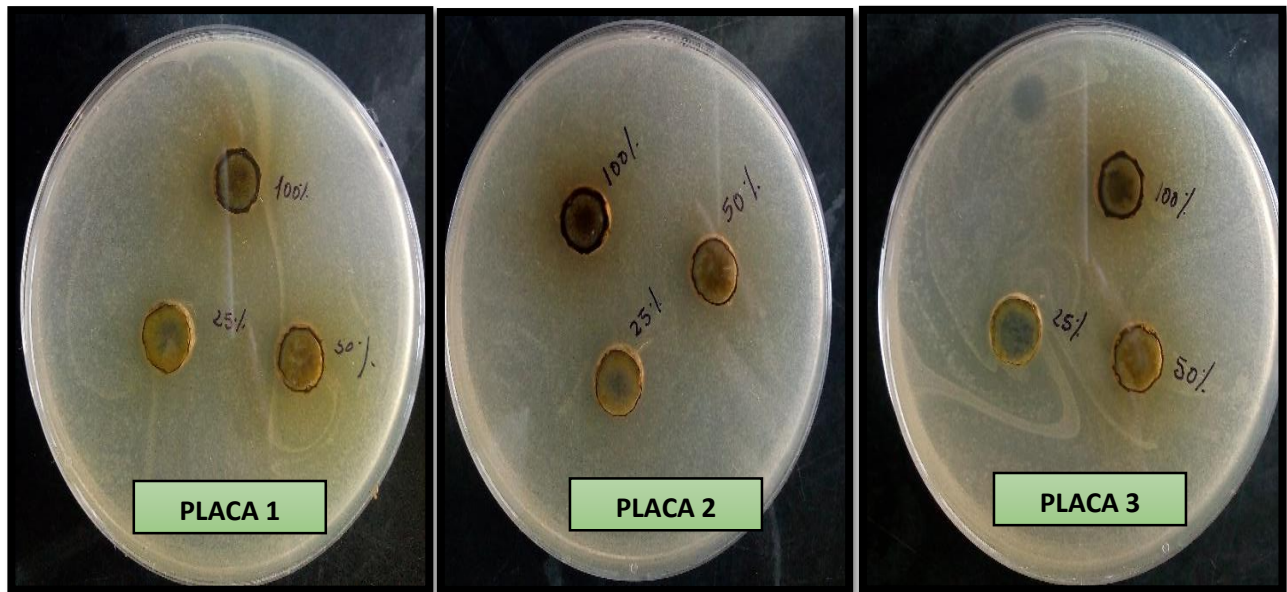


Figura N°10: Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a 200 mg/mL (100%), 100 mg/mL (50%) y 50 mg/mL (25%) por el método de difusión en agar frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

Cepa *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15448

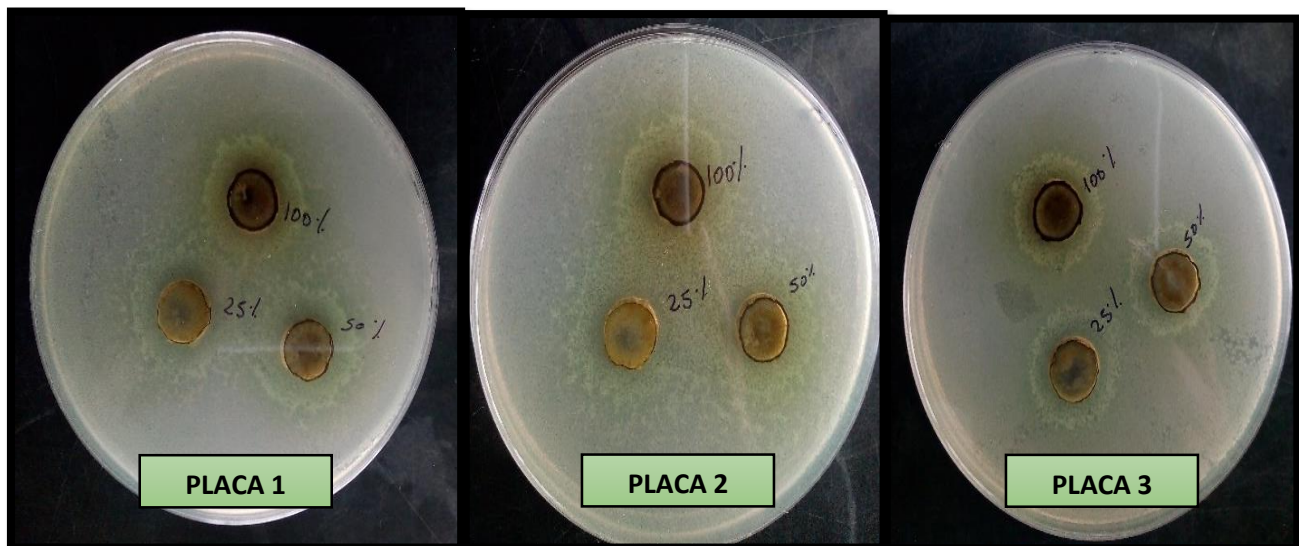


Figura N°11: Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a 200 mg/mL (100%), 100 mg/mL (50%) y 50 mg/mL (25%) por el método de difusión en agar frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15448.

Tabla N° 12: Análisis microbiológico del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A <i>Staphylococcus aureus</i> POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR CON DISCOS				
N° DE PLACA	CONCENTRACIÓN (%) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha)			CONTROL
				DMSO
	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)			
	25%	50%	100%	100 µl
1	17.50			
	17.00			
	17.50			
2		18.00		
		18.00		
		18.00		
3			19.00	
			19.00	
			19.00	
4				0.00
				0.00
				0.00

DMSO: Dimetilsufóxido

Fuente: Elaboración propia

Tabla N° 13: Estadística descriptiva para los halos de inhibición obtenidos de cada extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	19,0000	,00000	,00000	19,0000	19,0000	19,00	19,00
2	3	18,0000	,00000	,00000	18,0000	18,0000	18,00	18,00
3	3	17,3333	,28868	,16667	16,6162	18,0504	17,00	17,50
4	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
Total	12	13,5833	8,21538	2,37158	8,3635	18,8031	,00	19,00

Leyenda:

- (1): Extracto etanólico 100%
- (2): Extracto etanólico 50%
- (3): Extracto etanólico 25%
- (4) Control negativo dimetilsulfóxido (DMSO)

En la tabla N°13 observamos la media de cada tratamiento, todos los valores están en el rango del límite inferior y superior; es decir, dentro de los parámetros establecidos.

Tabla N° 14: Prueba de homogeneidad de varianzas (extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 33591).

Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
16,000	3	8	,001

Donde:

H₀: (Hipótesis nula): Las varianzas son homogéneas ($p < 0.05$)

H₁: (Hipótesis alternativa): Las varianzas no son homogéneas ($p > 0.05$)

Observamos en la tabla N° 14 la prueba de homogeneidad de varianza, donde $p=$ valores es menor a 0.05; por lo tanto, se acepta la hipótesis nula, donde las varianzas de cada tratamiento son homogéneas.

Tabla N° 15: ANOVA de un factor (extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 33591).

	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	742,250	3	247,417	11876,000	,000
Dentro de grupos	,167	8	,021		
Total	742,417	11			

Donde:

H₀: (Hipótesis nula): No existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ($p > 0.05$)

H₁: (Hipótesis alternativa): Existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ($p < 0.05$)

En la tabla N° 15 podemos observar que el resultado de $p=$ valor es de .000, cuyo valor es menor a 0.05, con lo cual se rechaza la hipótesis nula, confirmando y aceptando la hipótesis alternativa; es decir, sí existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados.

Tabla N° 16: Comparaciones múltiples HSD Tukey (Variable dependiente: HALOS) para el extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 33591.

(I) CONCENTRACIÓN	(J) CONCENTRACIÓN	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1	2	1,00000*	,11785	,000	,6226	1,3774
	3	1,66667*	,11785	,000	1,2893	2,0441
	4	19,00000*	,11785	,000	18,6226	19,3774
2	1	-1,00000*	,11785	,000	-1,3774	-,6226
	3	,66667*	,11785	,002	,2893	1,0441
	4	18,00000*	,11785	,000	17,6226	18,3774
3	1	-1,66667*	,11785	,000	-2,0441	-1,2893
	2	-,66667*	,11785	,002	-1,0441	-,2893
	4	17,33333*	,11785	,000	16,9559	17,7107
4	1	-19,00000*	,11785	,000	-19,3774	-18,6226
	2	-18,00000*	,11785	,000	-18,3774	-17,6226
	3	-17,33333*	,11785	,000	-17,7107	-16,9559

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

Leyenda:

(1): Extracto etanólico 100%

(2): Extracto etanólico 50%

(3): Extracto etanólico 25%

(4): Control negativo dimetilsulfóxido (DMSO)

La prueba estadística de Tukey permite efectuar un número elevado de comparaciones y determinar si las medias son significativamente diferentes u homogéneas. Podemos observar (Tabla N° 16) la diferencia de medias entre los extractos etanólicos a diferentes concentraciones, donde $p=valor$ es menor que el nivel de significancia del 0.05. Se aplica la prueba de subconjunto de Tukey con la finalidad de identificar las diferencias.

Tabla N° 17: Prueba de Subconjunto de Tukey (extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 33591).

CONCENTRACIÓN	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
		1	2	3	4
4	3	,0000			
3	3		17,3333		
2	3			18,0000	
1	3				19,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.					

Leyenda:

- (1): Extracto etanólico 100%
- (2): Extracto etanólico 50%
- (3): Extracto etanólico 25%
- (4): Control negativo dimetilsulfóxido (DMSO)

En la tabla N° 17, en los grupos subconjuntos podemos visualizar que la media de cada concentración del extracto etanólicos de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) forman subconjuntos diferentes; es decir, la variable dependiente presenta diferencias significativas a diferentes concentraciones (100%, 50% y 25%).

Tabla N° 18: Análisis microbiológico del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984.

“ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A <i>Staphylococcus epidermidis</i> POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR CON DISCOS”				
N° DE PLACA	CONCENTRACIÓN (%) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha)			CONTROL
				DMSO
	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)			
	25%	50%	100%	100 µl
1	16.50			
	17.00			
	16.50			
2		17.00		
		17.00		
		17.00		
3			18.00	
			18.00	
			18.00	
4				0.00
				0.00
				0.00

DMSO: Dimetilsufóxido

Fuente: Elaboración propia

Tabla N° 19: Estadística descriptiva para los halos de inhibición obtenidos de cada extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984.

	N	Media	Desviación estándar	Error estándar	95% del intervalo de confianza para la media		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
1	3	18,0000	,00000	,00000	18,0000	18,0000	18,00	18,00
2	3	17,0000	,00000	,00000	17,0000	17,0000	17,00	17,00
3	3	16,6667	,28868	,16667	15,9496	17,3838	16,50	17,00
4	3	,0000	,00000	,00000	,0000	,0000	,00	,00
Total	12	12,9167	7,80685	2,25364	7,9564	17,8769	,00	18,00

Leyenda:

(1): Extracto etanólico 100%

(2): Extracto etanólico 50%

(3): Extracto etanólico 25%

(4): Control negativo dimetilsulfóxido (DMSO)

En la tabla N° 19 observamos la media de cada tratamiento, todos los valores están en el rango del límite inferior y superior; es decir, dentro de los parámetros establecidos.

Tabla N°20: Prueba de homogeneidad de varianzas (extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984).

	gl1	gl2	Sig.
Estadístico de Levene			
16,000	3	8	,001

Donde:

H₀: (Hipótesis nula): Las varianzas son homogéneas ($p < 0.05$)

H₁: (Hipótesis alternativa): Las varianzas no son homogéneas ($p > 0.05$)

Observamos en la tabla N° 20 la prueba de homogeneidad de varianza, donde $p=valor$ es menor a 0.05; por lo tanto, se acepta la hipótesis nula, donde las varianzas de cada tratamiento son homogéneas.

Tabla N° 21: ANOVA de un factor (extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984).

	Suma de cuadrados	GI	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	670,250	3	223,417	10724,000	,000
Dentro de grupos	,167	8	,021		
Total	670,417	11			

Donde:

H₀: (Hipótesis nula): No existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ($p > 0.05$)

H₁: (Hipótesis alternativa): Existe diferencias significativas entre los tratamientos aplicados ($p < 0.05$)

En la tabla N° 21 podemos observar que el resultado de $p=valor$ es de 0.00, cuyo valor es menor a 0.05 con lo cual se rechaza la hipótesis nula, confirmando y aceptando la hipótesis alterna; es decir, sí existen diferencias significativas entre los tratamientos aplicados.

Tabla N° 22: Comparaciones múltiples HSD Tukey (Variable dependiente: HALOS) para el extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984.

(I) CONCENTRACIÓN	(J) CONCENTRACIÓN	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite inferior
1	2	1,00000*	,11785	,000	,6226	1,3774
	3	1,33333*	,11785	,000	,9559	1,7107
	4	18,00000*	,11785	,000	17,6226	18,3774
2	1	-1,00000*	,11785	,000	-1,3774	-,6226
	3	,33333	,11785	,085	-,0441	,7107
	4	17,00000*	,11785	,000	16,6226	17,3774
3	1	-1,33333*	,11785	,000	-1,7107	-,9559
	2	-,33333	,11785	,085	-,7107	,0441
	4	16,66667*	,11785	,000	16,2893	17,0441
4	1	-18,00000*	,11785	,000	-18,3774	-17,6226
	2	-17,00000*	,11785	,000	-17,3774	-16,6226
	3	-16,66667*	,11785	,000	-17,0441	-16,2893

"La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05"

Leyenda:

(1): Extracto etanólico 100%

(2): Extracto etanólico 50%

(3): Extracto etanólico 25%

(4): Control negativo dimetilsulfóxido (DMSO)

La prueba estadística de Tukey permite efectuar un número elevado de comparaciones y determinar si las medias son significativamente diferentes u homogéneas. Podemos observar (Tabla N° 22) la diferencia de medias entre los extractos etanólicos a diferentes concentraciones, donde $p=valor$ es menor que el nivel de significancia del 0.05. Se aplica la prueba de subconjunto de Tukey con la finalidad de identificar diferencias.

Tabla N° 23: Prueba de Subconjunto de Tukey (extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984).

CONCENTRACIÓN	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
4	3	,0000		
3	3		16,6667	
2	3		17,0000	
1	3			18,0000
Sig.		1,000	,085	1,000
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.				

Leyenda:

- (1): Extracto etanólico 100%
- (2): Extracto etanólico 50%
- (3): Extracto etanólico 25%
- (4): Control negativo dimetilsulfóxido (DMSO)

En la tabla N° 23, en los grupos subconjuntos podemos visualizar la media de cada concentración del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha), donde la concentración “2” (50%) y “3” (25%) pertenecen al mismo subconjunto; es decir, no existen diferencias significativas entre ambos, por ende presentan la misma actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus epidermidis* y por otro lado la concentración “1” (100%) forman otro subconjunto, presentando diferencia significativa y diferente actividad antimicrobiana.

B) CMI por el método de microdilución colorimétrico en microplaca:

Los resultados de concentración mínima inhibitoria CMI que se halló por el método de microdilución colorimétrica se presentan en la tabla N°24 y en la figura N° 12, el reporte de los resultados se dio de manera visual, reportándose el cambio de color púrpura a rosado, se observa que el extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) tiene una CMI =1000 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 y no presenta actividad a la concentración de ≤ 4000 µg/mL frente a *Escherichia coli* ATCC 25922.

Tabla N°24: Valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 y *Escherichia coli* ATCC 25922

EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha)	Concentración Mínima Inhibitoria (µg/mL) CMI	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
MUESTRA 1	1000	>4000
MUESTRA 2	1000	>4000
MUESTRA 3	1000	>4000

Fuente: Elaboración propia

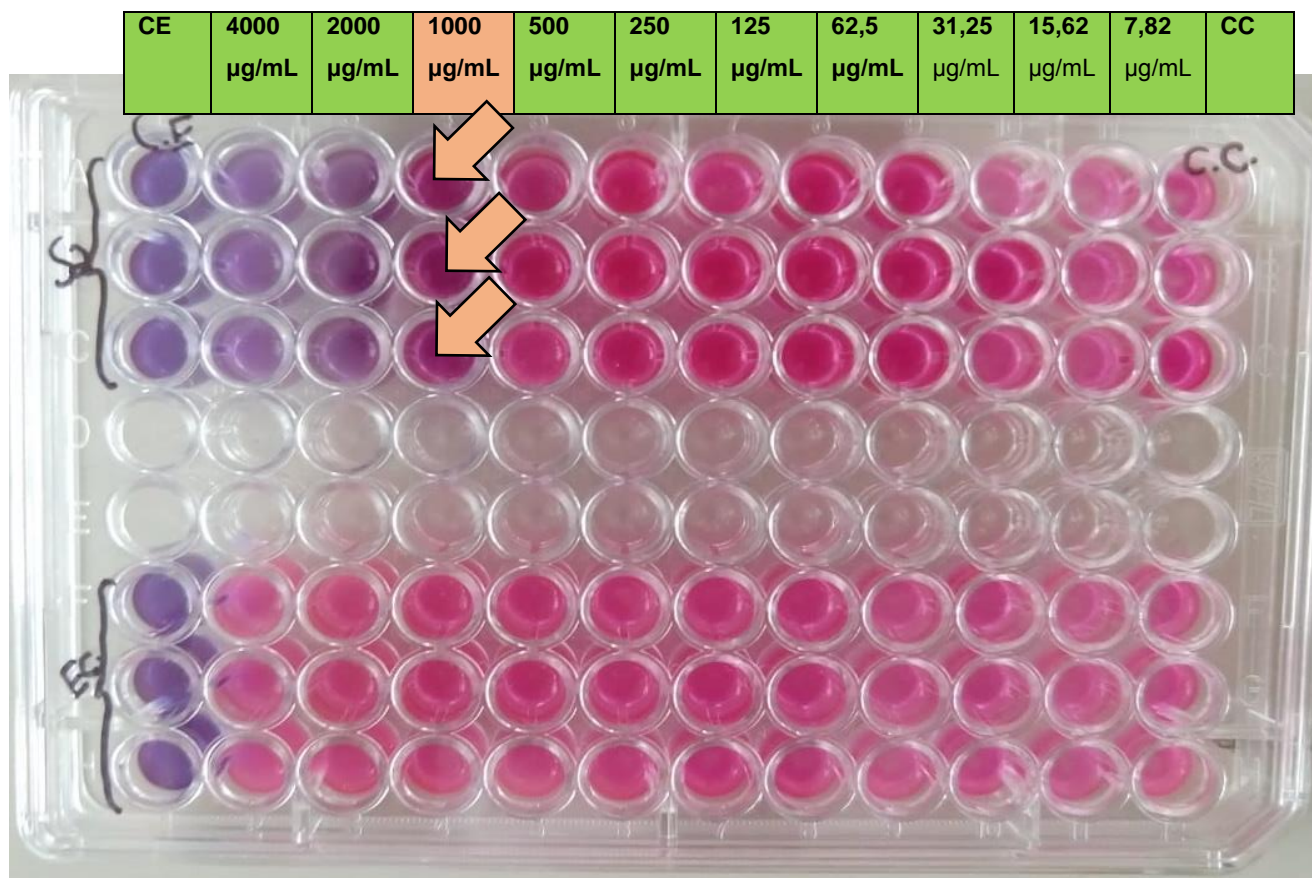


Figura N° 12: Determinación de la concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) por el método de microdilución colorimétrica en microplaca contra *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 y *Escherichia coli* ATCC 25922. Donde: CE=Control de esterilidad y CC=Control positivo.

4.2 CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS

Con la finalidad de realizar la contrastación de la hipótesis general, en primer lugar, se estableció una hipótesis nula y una hipótesis alterna:

Hipótesis nula (H0): El extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) no presenta actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

Hipótesis alterna(H1): El extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) presenta actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

En segundo lugar, los análisis de varianza (ANOVA) que se han realizado para los microorganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 que presentaron efecto antimicrobiano permitirán determinar si existen diferencias significativas entre las medias de los grupos, teniendo como nivel de significancia de 0,05. Como se observa en la tabla N°15 y tabla N°21, en ambas tablas se obtuvo un nivel de significancia menor a 0,05; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna para los microorganismos *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 y *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984.

Contrastación de las hipótesis específicas:

Hipótesis específica nula (3): El extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a diferentes concentraciones no presenta actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

Hipótesis específica alterna (3): El extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a diferentes concentraciones presenta actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

El análisis de varianza (ANOVA) que se ha realizado de los extractos etanólicos de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a concentraciones de 25%, 50% y 100 % (halos de inhibición promedio de 18 mm, 17 mm y 16.3 mm respectivamente) frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 permitirá determinar si existen diferencias significativas entre las medias de los grupos, como se observa en la tabla N°15, se obtuvo un nivel de significancia menor a 0,05; por lo tanto, sí existen diferencias significativas entre las diferentes concentraciones del extracto. En la tabla N° 17 usando la prueba de subconjuntos de Tukey podemos determinar qué medias difieren entre sí, en los grupos subconjuntos podemos observar que la media de cada concentración (25%, 50% y 100%) del extracto etanólico presentan diferentes subconjuntos; es decir, difieren entre sí, presentando cada concentración diferente actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*.

Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

Hipótesis específica nula (4): El extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a diferentes concentraciones no presenta actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus epidermidis*.

Hipótesis específica alterna (4): El extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a diferentes concentraciones presenta actividad antimicrobiana *in vitro* frente a cepas de *Staphylococcus epidermidis*.

El análisis de varianza (ANOVA) que se ha realizado de los extractos etanólicos de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a concentraciones de 25%, 50% y 100 % (halos de inhibición promedio de 19mm, 18mm y 17.3 mm respectivamente) frente a *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 permitirá determinar si existen diferencias significativas entre las medias de los grupos, como se observa en la tabla N°21, se obtuvo un nivel de significancia menor a 0,05; por lo tanto, sí existen diferencias significativas entre las diferentes concentraciones del extracto. En la tabla N° 23 usando la prueba de subconjuntos de Tukey podemos observar qué medias difieren entre sí, en los grupos subconjuntos podemos observar que las concentraciones 25% y 50% del extracto etanólico pertenecen al mismo subconjunto, ya que no existe diferencias significativas entre ambos; por lo tanto, presentan la misma actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus epidermidis* y por otro lado la concentración al 100% forma otro subconjunto, presentando diferencia significativa y diferente actividad antimicrobiana.

Por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alterna.

4.3 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con respecto a la solubilidad (Tabla N°7) del extracto etanólico las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha), muestra ser poco soluble en solventes de baja y mediana polaridad como benceno, diclorometano, cloroformo y acetato de etilo; además en solventes polares es soluble en metanol, poco soluble en etanol, e insoluble en agua.

La identificación de metabolitos secundarios sirve como anticipo para predecir los tipos de posibles compuestos activos de las plantas. La marcha fitoquímica (Tabla N°8) del

extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha), evidenció que contiene mayores cantidades de compuestos fenólicos tipo flavonoides, además presenta alcaloides, poca cantidad de quinonas y no se reportó presencia de taninos. No existen trabajos previos de marcha fitoquímica a extractos de *Senecio hyoseridifolius* Wedd; sin embargo, existen otros trabajos de investigaciones de especies de plantas del mismo género en estudio, la investigación de Soto M. ⁽²⁰⁾, demostró que en las hojas de *Senecio rhizomatus* Rusby existe gran cantidad de saponinas, alcaloides y flavonoides; en el estudio realizado por Marcos *et al.* ⁽²¹⁾, en hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera reportaron la presencia de compuestos fenólicos, taninos y alcaloides en gran cantidad, además de lactonas, saponinas y antocianidina en menor proporción y muy baja cantidad de flavonoides. Baldoce A. ⁽⁶⁸⁾, realizó la marcha fitoquímica según Olga Lock, de tres muestras de *Senecio rhizomatus* colectados en diferentes partes del país donde reporta la presencia de alcaloides y flavonoides, además reportó la ausencia de quinonas; resultados que son muy similares a la presente investigación.

Mediante técnicas de cromatografía se separaron los compuestos presentes en el extracto, observándose en la placa cromatográfica con luz UV 365 nm manchas de color verdes y rojos de distintas tonalidades. Se separaron de la silicagel con etanol, 10 fracciones. La elucidación estructural se realizó por lecturas a ultravioleta UV-vis en etanol y luego con reactivos de desplazamiento. Los flavonoides típicamente presentan bandas de absorción: una banda de absorción común que corresponde al anillo A 250-290 nm: y una banda correspondiente al anillo B, que en el caso de los flavonoides tipo flavona va de 310-350 nm y en el caso de flavonoides tipo flavonol va de 330-360 nm ⁽⁶⁹⁾. De acuerdo con esto y la información brindada en la investigación de Mabry T. *et al.* ⁽⁷⁰⁾ se propusieron las siguientes estructuras: Muestra 3 (Figura N° 46) 4',7-dihidroxi flavona; presenta cambio batocrómico en la banda de absorción (50 nm) en presencia de Metóxido de sodio (CH₃ONa) que ioniza los grupos hidroxilos en el núcleo del flavonoide, se utiliza el efecto del CH₃ONa en los espectros UV de flavona y flavonol para la detección de grupos hidroxilos libres en el anillo A en C7 y en el anillo B en C4' ; además, en presencia de AlCl₃ no presenta cambios en las bandas por lo cual la molécula no presenta grupos hidroxilos adyacentes. ⁽⁶⁹⁾ (Figura N°47). Muestra

5 (Figura N°48) 4',7-dihidroxi-3'-metoxi-3-O-R flavonol, tiene una banda máxima de 365 que corresponde a los flavonoides tipo flavonol; además, presenta cambio batocrómico (55 nm) en presencia de CH₃ONa y no presenta cambios en las bandas de absorción en presencia de AlCl₃ (Figura N°49). Muestra 7 (Figura N°50) 3',4',7-trihidroxi-6,8-dimetoxiflavona; presenta cambio batocrómico en las bandas de absorción (15 nm-30 nm) en presencia de CH₃ONa; además, en presencia de AlCl₃ presenta cambio batocrómico en la banda de absorción (30 nm) por lo cual presenta grupos hidroxilo adyacente en anillo B en C3' y dos metoxilos en el anillo A en C6 y C8 (Figura N°51). Muestra 8 (Figura N°52) 4',7-dihidroxi-6,8-dimetoxiflavona; presenta cambio batocrómico (35 nm) en presencia de CH₃ONa y no presenta cambios en las bandas de absorción en presencia de AlCl₃ por lo que no presenta OH adyacentes (Figura N°53). Muestra 9 (Figura N°54) 6,8-dihidroxi-3',4',7-trimetoxiflavona; no presenta cambios en las bandas de absorción en presencia de CH₃ONa y con AlCl₃ tampoco presenta cambio batocrómico en las bandas de absorción (Figura N°55). Muestra 10 (Figura N°56) .4',7,-dihidroxi-3',5',6,8-tetrametoxiflavona; presenta cambio batocrómico (20 nm) en presencia de CH₃ONa y presenta pequeños cambios en las bandas de absorción en presencia de AlCl₃ (Figura N°57).

La evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) mediante el método de difusión en agar (Tabla N°11) (Figuras N° 8, 9, 10, 11) se realizó usando tres concentraciones al 100% (200mg/mL), 50% (100mg/mL) y 25% (50mg/mL), se observó halos de inhibición promedio de 19 mm, 18 mm y 17.3 mm respectivamente contra cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591; también, halos de inhibición promedio de 18 mm, 17 mm y 16.6 mm respectivamente frente a cepas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 y se evidenció que el extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd no presenta actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15448. No existen trabajos previos de índole antimicrobiano con respecto a *Senecio hyoseridifolius* Wedd; sin embargo, existen otros trabajos de investigaciones de especies de plantas del mismo género *Senecio*, tales como Marcos R. *et al.* ⁽²¹⁾ que reportan efecto antibacteriano *in vitro* del extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera, trabajaron extracto

a concentraciones crecientes de 5% (50 mg/mL), 15% (150 mg/mL), y 30% (300 mg/mL), frente a dos bacterias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) y *Escherichia coli* (ATCC 25992). El extracto con mayor concentración (30%) presentó mayores promedios de halos de inhibición de 23 mm y 18 mm frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* respectivamente. Soto M. ⁽²⁰⁾, reporta efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto etanólico de un gel elaborado con las hojas de *Senecio rhizomatus* Rusby a concentraciones de 12,5 y 25 mg/mL, evaluó su efecto antimicrobiano mediante el método de difusión en agar y el gel a concentración de 25 mg/mL presentó un halo de inhibición de 20 mm frente a cepa de la comunidad de *Staphylococcus aureus* y un halo de inhibición de 18 mm con la cepa hospitalaria de *Staphylococcus aureus*. Estas investigaciones coinciden con los resultados obtenidos en la presente investigación donde se evidenció mayor actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*.

La evaluación de la actividad antimicrobiana por el método de microdilución colorimétrica en microplaca CMI (Tabla N°24) (Figuras N°12) se realizó usando diferentes concentraciones seriadas y se observó que el extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) tiene una CMI = 1000 µg/mL frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 y no presenta actividad a la concentración de ≤ 4000 µg/mL frente a *Escherichia coli* ATCC 25922. Tamariz C. *et al.* ⁽³⁾ reportan que *Senecio rhizomatus* Rusby presenta actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) a una CMI de 6387 mg/mL, *Senecio calvus* presenta actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) a una CMI de 4000 mg/mL, *Senecio comosus* presenta actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) a una CMI de 4000 mg/mL. Vega P. *et al.* ⁽¹⁶⁾ reportan actividad antimicrobiana de las hojas y tallos de *Senecio sublutescens*, los tallos sólo tuvieron efecto sobre *Staphylococcus aureus* a una CMI de 20 mg/mL mientras que las hojas presentaron efecto sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* a CMI de 5 y 10 mg/mL respectivamente; las hojas y tallos no tuvieron efecto antimicrobiano sobre *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. Informes de investigaciones señalan que la causa del efecto inhibitorio se produce porque las hojas almacenan grandes concentraciones de metabolitos secundarios que le permiten tener efecto inhibitorio de determinados microorganismos.

La actividad antimicrobiana reportada para el género *Senecio* puede relacionarse a la acción sinérgica de los distintos tipos de flavonoides que contiene dentro de su estructura este género. Como se sabe los flavonoides tienen en su esqueleto estructural muchos grupos hidroxilos que son capaces de llegar al citoplasma al penetrar con facilidad la membrana celular de las bacterias y actúan como toxina al producir precipitación y desnaturalización de las proteínas al interior de estas células (71).

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 CONCLUSIONES

1. En el estudio fitoquímico del extracto etanólico de *Senecio hyoseridifolius* Wedd se encontraron abundantes compuestos fenólicos tipo flavonoides y menor cantidad de alcaloides, posibles responsables de la actividad antimicrobiana.
2. El extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a concentraciones de 100% (200 mg/mL), 50% (100 mg/mL) y 25% (50 mg/mL) frente a cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 no presenta halos de inhibición; por lo tanto, según la escala de Duraffourd se considera una actividad antimicrobiana nula a las 3 concentraciones del extracto.
3. El extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a concentraciones de 100% (200 mg/mL), 50% (100 mg/mL) y 25% (50 mg/mL) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 presentan halos de inhibición promedio de 19 mm, 18 mm y 17.3 mm respectivamente; por lo tanto, según la escala de Duraffourd se considera a *Staphylococcus aureus* muy sensible a las 3 concentraciones del extracto.
4. El extracto etanólico de hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a concentraciones de 100% (200 mg/mL), 50% (100 mg/mL) y 25% (50 mg/mL) frente a cepas de *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, presentan halos de inhibición promedio de 18 mm, 17 mm y 16.6 mm respectivamente; por lo tanto, según la escala de Duraffourd se considera a *Staphylococcus epidermidis* muy sensible a las 3 concentraciones del extracto.

5. El extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) a concentraciones de 100% (200 mg/mL), 50% (100 mg/mL) y 25% (50 mg/mL) frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15448 no presenta halos de inhibición; por lo tanto, según la escala de Duraffourd se considera una actividad antimicrobiana nula a las 3 concentraciones del extracto.

5.2 RECOMENDACIONES

1. Aislar los metabolitos secundarios identificados y demostrar si son los responsables de la actividad antimicrobiana de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha).
2. Realizar estudios complementarios de la actividad antimicrobiana con diferentes especies del género *Senecio*.
3. Continuar con las investigaciones para confirmar las posibles estructuras químicas elucidadas por espectrofotometría UV-vis y con reactivos de desplazamiento, usando métodos analíticos como: espectroscopia de infrarrojo, resonancia magnética nuclear, espectrofotometría de masas.

REFERENCIAS

1. Bussmann R, Sharon D, Vandebroek I. Health for sale: the medicinal plant markets in Trujillo and Chiclayo, Northern Perú. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. [Internet]. 2007 [citado 24 de enero 2019]; p. 3. Disponible en: <http://www.ethnobiomed.com/content/pdf/1746-4269-3-37.pdf>
2. Tamariz C, Infantas D, Moreno P. Pruebas fitoquímicas y biológicas de algunas especies de *Senecio* del Parque Nacional Huascarán (Ancash-Perú). Tesis para optar el título de Biología: Universidad Nacional agraria la Molina 2001; XLVII:39-49
3. Assem S, Gamal D, Wink M. Chemical composition and biological activity of the essential oils of *Senecio aegyptus* var. *discoideus* Boiss. Department of pharmacognozy, Faculty of Pharmact, Zagazig University, Egypt 2002; p. 438-439
4. Zellagui A, Tijani S, Gherraf N, Rhouati S. Phytochemical screening and evaluation of antibacterial activity of alkaloids extracto of *Senecio delphinifolius* Vahl Scholars Research Library. *Der Pharma chemica*.2012; p. 2080-2084.
5. Termentzi A, Fokialakis N, Skaltsounis A. Natural resins and bioactive natural products thereof as potential antimicrobial agents. *Curr Pharm Des*. 2011; 17(13):1267-90.
6. Torres C. La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. [Internet]. Colegio oficial de farmacéuticos Zaragoza; 2012 [citado 20 de febrero 2019]; p. 15 Disponible en: <http://www.academiadefarmaciadearagon.es/Documentos/Documento48.pdf>
7. World Health Organization. Estrategia mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos [Internet]. 2017. [citado 10 de enero 2019]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
8. Ochoa T. Resistance of *Streptococcus pneumoniae* to penicilin in nasopharyngeal children carriers, younger than two years old. *Rev Med Hered*. 1998; 9(2):56-62.

9. Verón M, Ojeda M, Avino F, Spelzini A, Barboza A, Petrozzino Y. Incidencia y distribución estacional de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina en pacientes adultos ambulatorios en una clínica de la provincia de Buenos Aires: período 2006 - 2011. Rev. Argent. Microbiol. 2012; 44(4): 306-311.
10. MINSA. Documento Técnico: Lineamientos para la Vigilancia, Prevención, y Control de las Infecciones Asociadas a la Atención de Salud; 2016.
11. Yap P, Yiap B, Ping H, Lim S. Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. Open Microbiol J. 2014; 8:6-14.
12. Benavides L. Resistencia a los antimicrobianos (RAM). Organización Mundial de la Salud. [Internet] 2011. [citado 2 de enero 2019]; p. 1-3. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/es/index.html>
13. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. 1a ed. Ed. Universitario U. San Carlos. Guatemala; 1996. p. 402.
14. Fenner R, Betti A, Mentz L, Rates S. Plants with potencial antifungal activity employed in Brazilian folk medicine. Revista Brasileira de Ciencias Farmacéuticas. 2006; 42(3):369-94.
15. Silva D, Endo E, Filho B, Nakamura C, Svidzinski T, De Souza A, et al. Chemical Composition and Antimicrobial Properties of Piper ovatum Vahl. Molecules. 16 de marzo de 2009; 14(3):1171-82.
16. Vega E, López E. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hidroalcohólico de tallos y hojas de *Baccharis genistelloides*, *Perezia multiflora*, *Senecio sublutescens* y *Jungla paniculata* del Parque Nacional Huascarán (Perú) frente a cepas bacterianas de interés clínico. Rev REBIOLEST. 2013;1(2):43-49
17. Soto M. Determinación del efecto antimicrobiano *in vitro* de un gel elaborado con extracto etanólico de hojas de *Senecio rhizomatus* Rusby (Asteraceae)". [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutica] Lima-Perú, Universidad Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2015. [citada 12 de diciembre 2018]. p.78. Disponible en: <http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/4628>
18. Marcos R, et al. "Determinación de fitoconstituyentes del extracto hidroetanólico de las hojas de *Senecio truxillensis* Cabrera y su efecto antibacteriano *in vitro*

- frente a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*". [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico] Trujillo-Perú, Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2015.
19. Alderete E. Actividad antimicrobiana, antioxidante *in vitro* y determinación de la composición química de tres aceites esenciales del género *Senecio* del Perú". [Tesis para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutica] Lima-Perú, Universidad Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2017
 20. Benites J, Bravo F, Rojas M, Fuentes R, Moiteiro C. and Florencia V. Composition and antimicrobial screening of the essential oil from the leaves and stems of *Senecio atacamensis* Phil. from Chile. J. Chilean Chemical Society. 2011;56 (2): 712 – 714.
 21. Kahrman N, Tosun G, Terzioglu S, Alpays S. and Yayh N. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from the flower. leaf. and stem of *Senecio pandurifolius*. Rec. Nat. Prod. 2011;5 (2): 82 – 91
 22. Núñez M. Plantas medicinales de Costa Rica y su folclore. Ed. Universidad de Costa Rica. Texto universitario; 1982 p. 318.
 23. Muñoz F. Plantas medicinales y aromáticas: Estudio, cultivo y procesado. 1a ed. Madrid: Ediciones Mundi Prensa; 2002. p.15
 24. Biazzi E. El Maravilloso poder de las Plantas. 1era. ed., Buenos Aires Argentina, Casa Editora Sudamérica; 2008. p. 23-44.
 25. José T. "La familia asteraceae" Herbario CICY, Unidad de Recursos Naturales Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. [Internet] 2010 [citado 11 Enero de 2019] Disponible en: https://www.cicy.mx/Documentos/CICY/Desde_Herbario/2010/2010-12-16-Tapia-Asteraceae.pdf
 26. Jorge G. "Asteraceae", La naturaleza Fauna y Flora. Diarium Universidad de Salamanca. [Internet] 2010. [citado el 11 enero 2019]. Disponible en: <http://diarium.usal.es/jorgegd56/2010/10/30/asteraceae/>.
 27. Brito B, Arana C. Corotipos preliminares del Perú basados en la distribución de la familia Asteraceae. Darwiniana. 2014;2(1):39-56.

28. Beltrán R, Arnaldo A. El género *Senecio* L. en el departamento de Lima]; Perú [Internet] 2005. [citado el 8 de febrero 2019]. Disponible en: journal.upao.edu.pe/Arnaldoa/article/download/208/193
29. León B, Roque C, Pitman N. Introducción a las plantas endémicas del Perú. *Rev Peru Biol.* 2006; 13(2):9-22.
30. Montesinos D. Three new caespitose species of *Senecio* (Asteraceae) *Senecioneae* from South Peru. *Phyto Keys.* 2014; 39:1-17.
31. Huacaja E. Contribución al estudio fitoquímico y determinación de la acción antibacteriana de *Senecio candidissimus*. [Tesis maestría]. Monterrey: Universidad Autónoma de Nueva León. Facultad de Ciencias Biológicas; 1995.
32. Beltrán H, Roque J. El género *Senecio* L. (Asteraceae-Senecioneae) en el departamento de Lima, Perú. *Rev. Perú.* 2015; 22(2):395-412.
33. Michuy C, Vargas M. “EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANALGÉSICA DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Senecio nivalis* (H.B.K) Cuatrec (QUAIRIPA) EN RATONES ALBINOS” [Tesis Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico y Bioquímico] Lima - Perú, Universidad Inca Garcilaso de la Vega. Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas; 2018.
34. Martínez S, González J, Culebras M, Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes *Nutr. Hosp.* 2002; XVII (6): 271-278
35. Pérez Trueba G. Los flavonoides: antioxidantes o prooxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed* 2003,22:48-57.
36. Escamilla J, Christopher Yane C, Elvis Cuevas M, Guevara F. Jorge Rev Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Fac Med UNAM* [Internet] 2009. [citado el 15 enero 2019]. Disponible en: <http://www.ejournal.unam.mx/rfm/no52-2/RFM052000207.pdf>
37. Cartaya O. Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Rev. Cultivos Tropicales Cuba.* 2001; 22(2):5-14.
38. Cushnie T, Lamb A. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents.* 2005; 26(5): 343–356.

39. Wang S, Zhang F, Feng Q, Li Y. Synthesis, characterization, and antibacterial activity of transition metal complexes with 5-hydroxy-7,4-dimethoxyflavone. *J Inorg Biochem.* 1992; 46: 251–7.
40. Ward F, Garling D, Buckler R, Lawler D, Cummings D. Antimicrobial 3-methylene-flavanones. *J Med Chem.* 1981; 24: 1073–7.
41. Tsuchiya H, Sato M, Miyazaki T, Fujiwara S, Tanigaki S, Ohyama M, et al. Comparative study on the antibacterial activity of phytochemical flavanones against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol.* 1996; 50(1): 27–34.
42. Osawa K, Yasuda H, Maruyama T, Morita H, Takeya K, Itokawa H. Isoflavanones from the heartwood of *Swartzia polyphylla* and their antibacterial activity against cariogenic bacteria. *Chem Pharm Bull.* 1992; 40: 2970–4.
43. Sato M, Fujiwara S, Tsuchiya H, Fujii T, Linuma M, Tosa H, et al. Flavones with antibacterial activity against cariogenic bacteria. *J Ethnopharmacol.* 1996; 54(2-3): 171–6.
44. Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A, Pfaller. *Microbiología Médica.* 6a ed. Barcelona: Elsevier España; 2009. p.108
45. Mensa J, Soriano A, Linares P, Barberán J, Montejo M, Salavert M, et al. Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*. *Rev Esp Quimioter.* 2013;26(1):1-84.
46. Elvira B. “Caracterización y seguimiento de la resistencia a linezolid en *Staphylococcus epidermidis* en la unidad de cuidados intensivos del Hospital Clínico San Carlos tras la descripción del primer brote de *staphylococcus aureus* linezolid resistente”. [Tesis doctoral]. Madrid: Facultad de Medicina, Universidad Complutense; 2017.
47. Guerra K, Román A. “Determinación de la actividad antimicrobiana de extractos de las hojas de *Mangifera indica* L”. [Tesis para optar al grado de Químico y Farmacéutico] Guayaquil-Ecuador, Universidad de Guayaquil. Facultad Ciencias Químicas; 2016
48. Lebeque P, Morris Q, Calás V. Infecciones nosocomiales: incidencia de la *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Cubana de medicina.* 2006;45(1)

49. Soberón G. *Pseudomonas aeruginosa*, Universidad Nacional Autónoma de México. [Internet] 2015. [citado el 17 enero 2019]. Disponible en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap3>.
50. Martínez T. Incremento de la disponibilidad intestinal de proteína y almidón mediante la manipulación de su degradabilidad en el rumen [Tesis]. Almería. Universidad de Almería; 2001.
51. Borris R. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J Ethnopharmacol.* 1996; 51(1-3): 29-38.
52. Brantner A, Males Z, Pepeljnjak S, Antolic A. Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christi mill.* *J Ethnopharmacol.* 1996; 52(2): 119–122.
53. Murphy M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Rev Clin Microbiol.* 1999; 12(4): 564–582.
54. Ramírez L, Marín C. Metodologías para Evaluar In Vitro la Actividad Antibacteriana de Compuestos de Origen Vegetal. *Rev. Scientia Et Technica.* Pereira, Colombia. 2009;15(42):263-268.
55. Langfield RD, Scarano FJ, Heitzman ME, Kondo M, Hammond GB, Neto CC, "Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomia galiodes*", *J. Ethnopharmacol.* 2004; 94(2-3):279, 2004.
56. Leonardo J M. "El Agente Infeccioso" *Rev. Med. Hosp. Nal. Niños* 1977; 12 (2); 115-118.
57. Jawetz E. Quimioterapia antimicrobiana. Manual de microbiología médica. 9a ed. México. 1989;p.110-53.
58. Ministerio de salud de Perú. Instituto Nacional de salud. Organismo Público Descentralizado de Sector Salud. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN. [Internet] 2002. [citado el 20 febrero 2019]. Disponible en:<http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/manual%20sensibilidad%202.pdf>
59. Chang R, Goldsby KA. Química. 11a ed. México D.F: Editorial McGraw Hill; 2013.

60. Ribera E, Juárez J, Montoro J, Fitoterapia e infección por el VIH: Interacciones entre fármacos antirretrovirales y plantas medicinales. [Internet] 2007. [citado el 5 de enero 2019]. Disponible en: <http://www.interaccionesvih.com/docs/fitoterapia.pdf>
61. Riveron E, *et al.* Estación de trabajo para el estudio de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* mediante el método de turbidez. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2012; Vol. 43(2).
62. Carrion A, Garcia C. Preparación de extractos vegetales: determinación de eficiencia de metódica. [Tesis de grado]. Cuenca – Ecuador: Universidad de cuenca facultad de ciencias químicas; 2010.
63. Lock O. Investigación Fitoquímica métodos en el estudio de productos naturales. 3a ed. Lima: Editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú; 1998. p.111-283
64. Cavalieri S y col. Manual de Pruebas de Susceptibilidad Antimicrobiana. [Internet]. Seattle, Washington. [Internet] 2005 [Consultado el 14 enero 2019]. p.242. Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=22691&Itemid=270
65. Wiegand I., Hilpert K., Hancock R. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. Nat Protoc. 2008;3(2):163–75.
66. Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. Methods. 2007; 42(4): 321-4.
67. Villar del Fresno, AM. Farmacognosia General. Vallehermoso – Madrid: Editorial Síntesis, S.A; 1999
68. Balboveda F. Estudio fitoquímico en *Senecio rhizomatus* Rusby ancahuasha. [Tesis]. Lima: UNMSM; 1997.
69. Tsimogiannis D, Samiotaki M, Panayotou G, Oreopoulou V. Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. Molecules. 2007; 12(3): 593-606.

70. Mabry TJ, Markham T, Thomas M. The Systematic Identification of Flavonoids. Berlín: Springer-Verlag; 1970.
71. Cushnie T. La actividad antimicrobiana de los flavonoides. [Internet] 2005. [Consultado el 20 mayo 2019]; 26(5):343-356. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857905002554>.
72. Duraffourd C, et al. Cuadernos de Fitoterapia clínica. 1° edición. París: Masson S.A; 1983.
73. Mamani L. Actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos de *Senecio* spp (CHACHACOMA) en el crecimiento de *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus* sp. [Tesis para optar el Título Profesional de Licenciado en Biología] Puno-Perú, Universidad Nacional del Altiplano. Facultad de Ciencias biológicas. Escuela Profesional de Biología; 2017.
74. Deuschle R, Camargo T y Francescato L. Antimicrobial activity of *Senecio desiderabilis* Vellozo (Asteraceae). Brasil. Programa de Pos-grado en ciencias y tecnología farmacéutica. Departamento de Farmacia Industrial. Universidad Federal de Santa María; 2006.

ANEXOS

ANEXO 1

“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*”.

PROBLEMA GENERAL	OBJETIVO GENERAL	HIPÓTESIS GENERAL	OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES			METODOLOGÍA	INSTRUMENTOS
			VARIABLE INDEPENDIENTE	INDICADORES	DIMENSIÓN	ENFOQUE	TÉCNICAS
¿Cuál es la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ?	Determinar la actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> del extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	El extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) presenta actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	Extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha)	Presencia de metabolitos secundarios: flavonoides, alcaloides	Fitoquímica	Cuantitativo	
PROBLEMAS ESPECÍFICOS	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	HIPOTESIS ESPECÍFICAS	VARIABLE DEPENDIENTE	INDICADORES	DIMENSIÓN	NIVEL	
1. ¿Cuáles serán los metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha)?	1. Identificar los tipos de metabolitos secundarios presentes en el extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) posibles responsables de la actividad antimicrobiana.	1. El extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) presenta metabolitos secundarios posibles responsables de la actividad antimicrobiana.	Actividad antimicrobiana	-Diámetro de halo de Inhibición. -Concentración mínima inhibitoria (CMI).	Microbiológica	Explicativo-Descriptivo	
2. ¿El extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) presentará actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> , a diferentes concentraciones?	2. Determinar diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) que presentan actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> .	2. El extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) a diferentes concentraciones presenta actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> .				DISEÑO	
3. ¿El extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) presentará actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> , a diferentes concentraciones?	3. Determinar diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) que presentan actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .	3. El extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) a diferentes concentraciones presenta actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> .				Experimental	
4. ¿El extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) presentará actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus epidermidis</i> , a diferentes concentraciones?	4. Determinar diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) que presentan actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus epidermidis</i> .	4. El extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) a diferentes concentraciones presenta actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Staphylococcus epidermidis</i> .					
5. ¿El extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) presentará actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , a diferentes concentraciones?	5. Determinar diferentes concentraciones del extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) que presentan actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	5. El extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha) a diferentes concentraciones presenta actividad antimicrobiana <i>in vitro</i> frente a cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .					

Anexo N°2: Certificación botánica de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha)

Hamilton W. Beltrán S.
Consultor Botánico
Calle Natalio Sánchez 251- Jesús María
hamiltonbeltran@yahoo.com

CERTIFICACION BOTANICA

El Biólogo colegiado y autorizado por el Inrena según RD. N° 334-2013-MINAGRI-DGFFS/DGEFFS, con Registro N° 37, certifica que la planta conocida como "LLANCAHUASHA" proporcionado por la Señoritas, FLOR MARIBEL GALVEZ CHOQUEZ y LIZ NOEMÍ ANCO VEGA, tesistas de la Universidad Inca Garcilaso de la Vega, ha sido estudiada científicamente y determinada como *Senecio hyoseridifolius* y de acuerdo al Sistema de Clasificación de Cronquist 1981, se ubica en las siguientes categorías:

Reino: Plantae
División: Magnoliophyta
Clase: Magnoliopsida
Subclase: Asteridae
Orden: Asterales
Familia: Asteraceae
Género: *Senecio*
Especie: *Senecio hyoseridifolius* Wedd.

Se expide la presente certificación a solicitud de las interesadas para los fines que estime conveniente.

Lima, 30 marzo 2019


Blgo. Hamilton Beltrán
Hamilton Wilmer Beltrán Santiago
Biólogo - Botánico
CRP 2719



Anexo N°3: Instrumento de recolección de datos

N°

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

FICHA DE OBSERVACIÓN AD – HOC DE ENSAYO FITOQUÍMICO

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.
Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.
En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.
Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.
Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea.

ENSAYO FITOQUÍMICO

ENSAYO DE SOLUBILIDAD

SOLVENTES	Benceno	Diclorometano	Cloroformo	Acetato de etilo	Metanol	Etanol	Agua
EXTRACTO ETANÓLICO DE <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd							

METODOLOGÍA:

- Muestra problema: extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd.
- Procedimiento: a cada uno de los 7 tubos de ensayo se colocó una alícuota del extracto etanólico, luego se adicionó a cada tubo un solvente diferente a analizar y se agitó hasta obtener un resultado.
- Solventes: los solventes seleccionados fueron ordenados según su polaridad: benceno, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, metanol, etanol y agua.

LEYENDA:

(-) No soluble (+) Poco Soluble (++) Soluble

.....
FIRMA DEL QUÍMICO FARMACÉUTICO

Anexo N°4: Instrumento de recolección de datos

N°



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

FICHA DE OBSERVACIÓN AD – HOC DE ENSAYO FITOQUÍMICO

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea.

ENSAYO FITOQUÍMICO

MARCHA FITOQUÍMICA

GRUPO DE COMPUESTO	ENSAYO	RESULTADO
Taninos	Reactivo de Gelatina 1%	
Aminoácidos libres	Reactivo de Nihidrina	
Alcaloides y compuestos aminados	Reactivo de Dragendorff	
	Reactivo de Mayer	
Compuestos fenólicos	Reactivo de Tricloruro férrico	
Quinonas	Reactivo de Hidróxido de sodio	
Compuestos fenólicos tipo flavonoides	Reactivo de Shinoda	

METODOLOGÍA:

- Muestra problema: extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd.
- Procedimiento: en un tubo de ensayo se colocó 5 miligramos del extracto seco y se adicionó 7 mL de etanol, posteriormente se agita por 2 a 3 minutos. Luego se distribuyó

en 7 tubos de ensayos, se agregó 2 gotas de reactivo a cada tubo y se agitó hasta observar.

REACTIVOS:

- **Taninos: (Reactivo gelatina-sal):** Presencia de un precipitado.
- **Aminoácidos libres: (Reactivo de nihidrina):** Aparición de color violeta.
- **Alcaloides y compuestos aminados:**
 - **Reactivo de Dragendorff:** Positivo al presentar coloración de rojo a naranja.
 - **Reactivo de Mayer:** Positivo al presentar una coloración de blanco a crema en una forma de precipitado.
- **Compuestos fenólicos: (Reactivo FeCl₃):** Positivo al presentar coloraciones azules, verde o negro.
- **Quinonas: (Reactivo de Hidróxido de sodio):** Positivo al presentar tonos rojizos.
- **Compuestos fenólicos tipo flavonoides: (Reactivo de Shinoda):** Las coloraciones rojas (flavonas), rojo a crimson (flavonoles), crimson a magneta (flavonas), rojo a veces azul o verdes son considerados positivas.

LEYENDA:

(+++): Muy abundante

(++): Abundante

(+): Moderado

(-): Ausente

.....
FIRMA DEL QUÍMICO FARMACÉUTICO

Anexo N°5: Instrumento de recolección de datos

N°



UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

FICHA DE OBSERVACIÓN AD – HOC DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A <i>Escherichia coli</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Staphylococcus epidermidis</i> y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR.				
CONCENTRACIÓN (%) DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha)	DIÁMETRO DEL HALO DE INHIBICIÓN (mm)			
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 15442
25%				
PLACA 1				
PLACA 2				
PLACA 3				
50 %				
PLACA 1				
PLACA 2				
PLACA 3				
100 %				
PLACA 1				
PLACA 2				
PLACA 3				
Control				
Dimetilsulfóxido DMSO				

.....
FIRMA DEL QUÍMICO FARMACÉUTICO



Anexo N°6: Instrumento de recolección de datos

UNIVERSIDAD INCA GARCILASO DE LA VEGA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICA

N°

FICHA DE OBSERVACIÓN AD – HOC DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE *Senecio hyoseridifolius* Wedd. (Llancahuasha) FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Pseudomonas aeruginosa*

INSTRUCCIONES

Antes de iniciar con la observación, procure encontrarse en un estado de equilibrio emocional y somático.

Si se siente cansado, estresado o enfermo, suspenda la observación.

En el caso de no tener certeza sobre la medición de alguna unidad de análisis, descarte su evaluación.

Registre los datos sin borrones ni enmendaduras.

Los espacios en los que no pueda registrar información, táchelos con una línea.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE A *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. POR EL MÉTODO DE MICRODILUCIÓN COLORIMÉTRICA EN MICROPLACA.

EXTRACTO ETANÓLICO DE LAS HOJAS DE <i>Senecio hyoseridifolius</i> Wedd (Llancahuasha)	Concentración Mínima Inhibitoria ($\mu\text{g/mL}$)	
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 33591	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
Muestra 1		
Muestra 2		
Muestra 3		

.....

FIRMA DEL QUÍMICO FARMACÉUTICO

Anexo N°7: Muestra vegetal



Figura N°13: *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha) en el distrito de Laraos, provincia de Yauyos – Lima

Anexo N° 8: Tratamiento del material botánico (hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha)).



Figura N°14: Selección de las hojas



Figura N°15: Lavado de las hojas



Figura N°16: Secado bajo sombra



Figura N°17: Hojas secas de *S. hyoseridifolius*



Figura N°18: Triturado de las hojas (mecánico)



Figura N°19: Hojas trituradas



Figura N°20: Peso de las hojas molidas

Anexo N° 9: Preparación del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha)

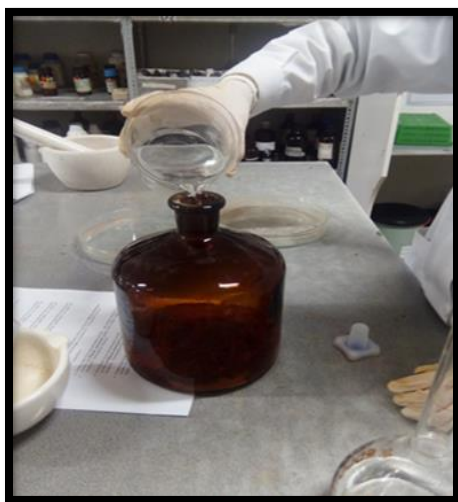


Figura N°21: Preparación del extracto **Figura N°22:** Filtración de las hojas

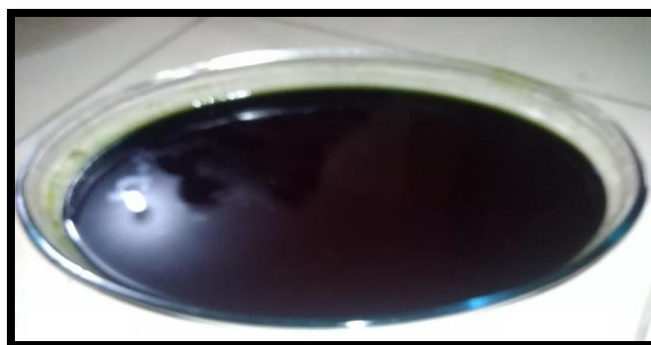


Figura N°23: Extracto etanólico líquido de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha).



Peso de extracto etanólico seco= 76.9g

Figura N°24: Extracto etanólico seco de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha).

Anexo N° 10: ENSAYOS FITOQUÍMICOS: Prueba de solubilidad

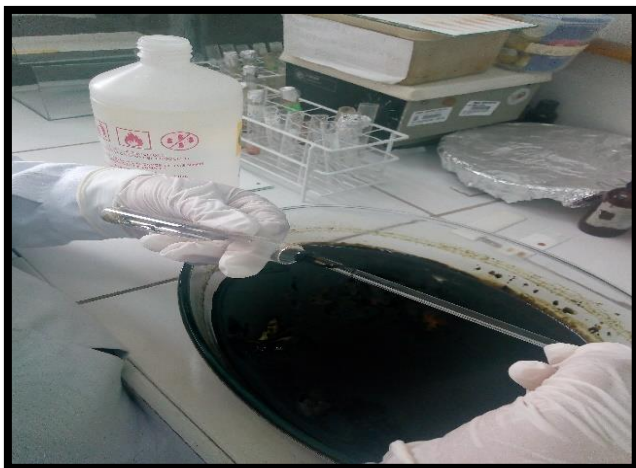


Figura N°25: Disolución de la muestra con etanol



Figura N°26: Solventes para la prueba de solubilidad.

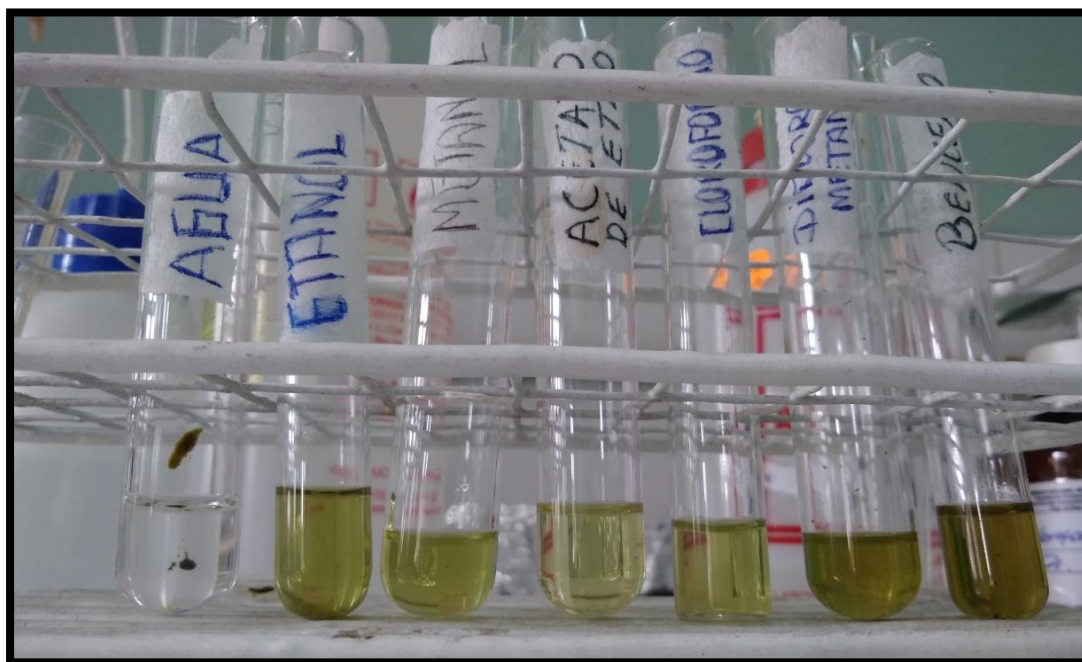


Figura N°27: Prueba de solubilidad del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha)

Anexo N° 11: ENSAYOS FITOQUÍMICOS: Marcha fitoquímica



Figura N°28: Preparación de la muestra para la marcha fitoquímica.



Figura N°29: Reactivos usados en la marcha fitoquímica.

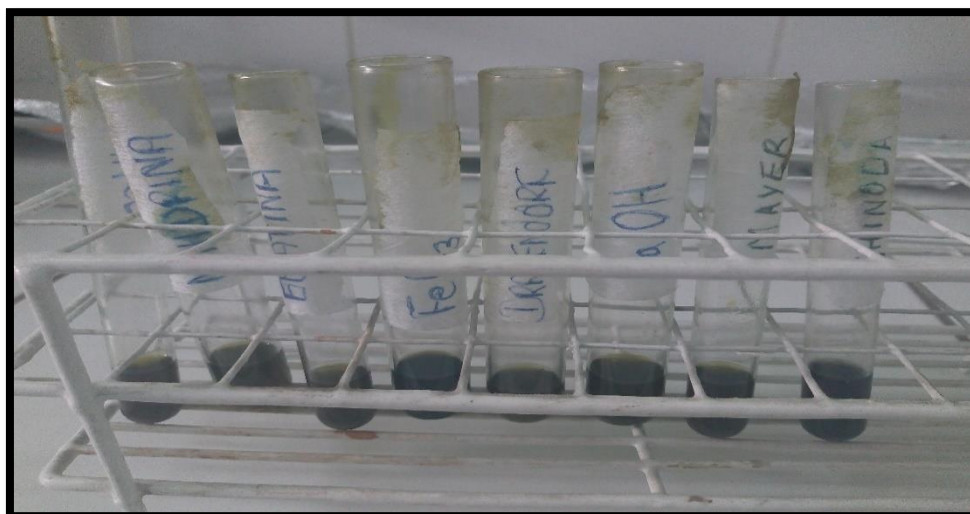


Figura N°30: Marcha fitoquímica del extracto etanólico de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha)

Anexo N° 12: ENSAYOS CROMATOGRÁFICOS: Cromatografía en capa fina analítica



Figura N°31: Preparación de cromatoplasmas **Figura N°32:** Cromatoplasmas secas

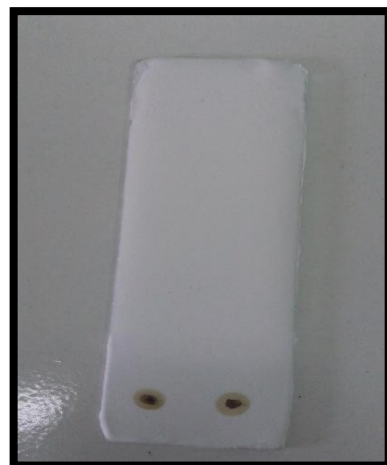


Figura N°33: Sembrado de la muestra

Figura N°34: Cromatoplasma sembrada



Figura N°35: Recorrido de la muestra en la cámara cromatográfica y cromatoplasma seca después del recorrido.

Anexo N° 13: ENSAYOS CROMATOGRÁFICOS: Cromatografía en capa fina preparativa

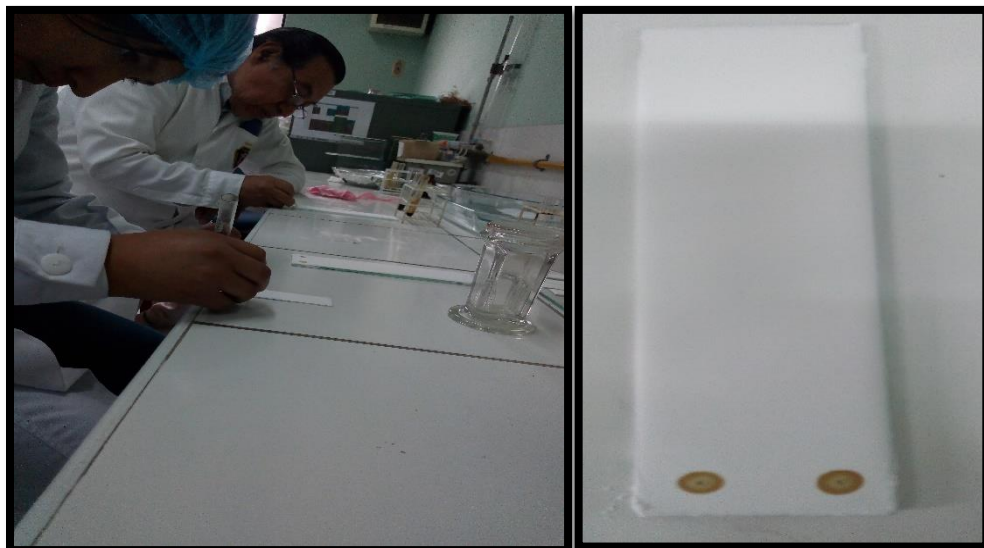


Figura N°36: Sembrado en la cromatoplaca (20x5 cm) y cromatoplaca sembrada

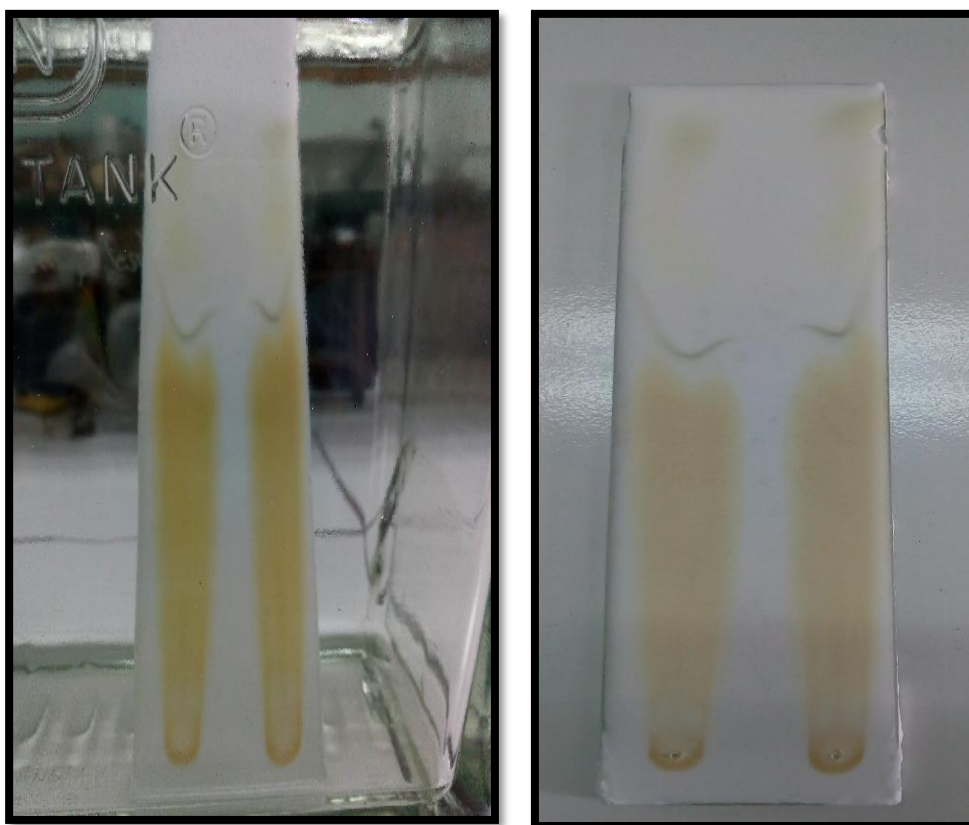


Figura N°37: Recorrido de la muestra en la cámara cromatográfica y cromatoplaca seca.

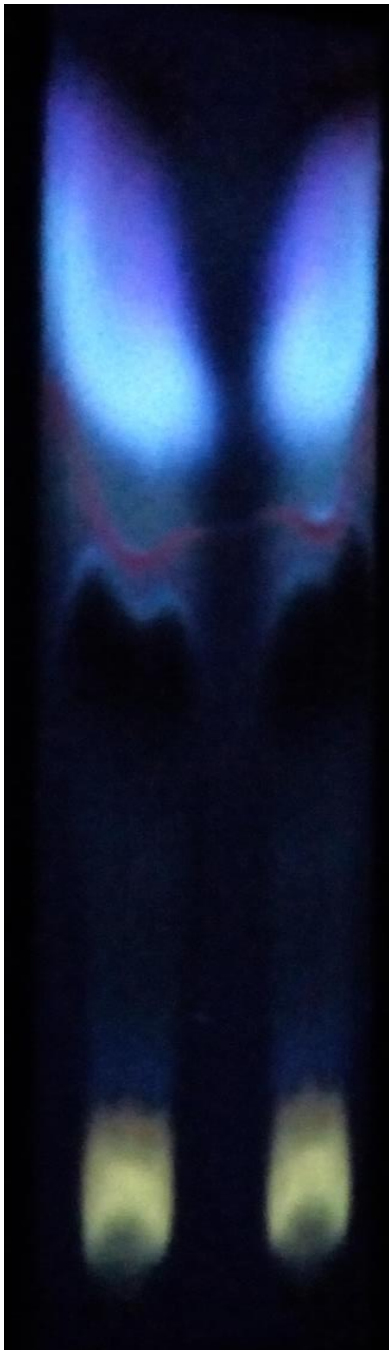


Figura N°38: Lectura de la placa con luz UV a 254 nm.

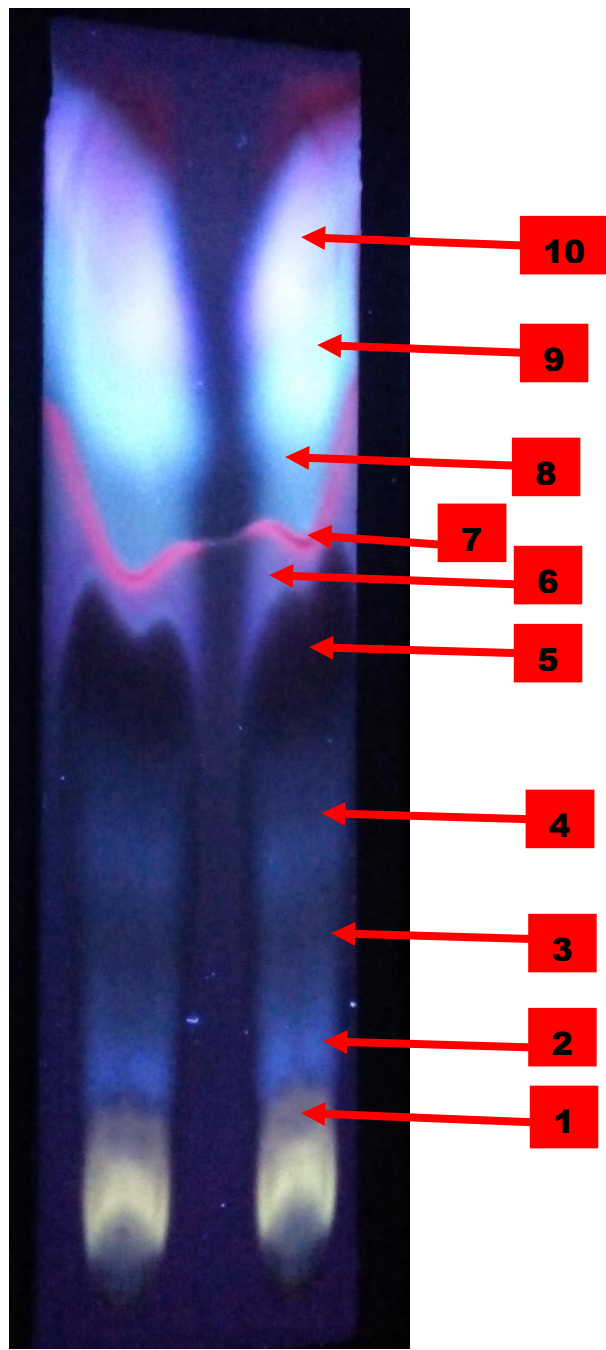


Figura N°39: Lectura de la placa con luz UV a 365 nm.

Anexo N° 14: Elucidación estructural de Flavonoides mediante espectroscopia UV-vis y con reactivos de desplazamiento



Figura N°40: Raspado y separación de fracciones



Figura N°41: Disolución con etanol y filtración de las fracciones obtenidas del raspado



Figura N°42: Soluciones obtenidas de la filtración (10 muestras)



Figura N°43: Reactivos de desplazamiento

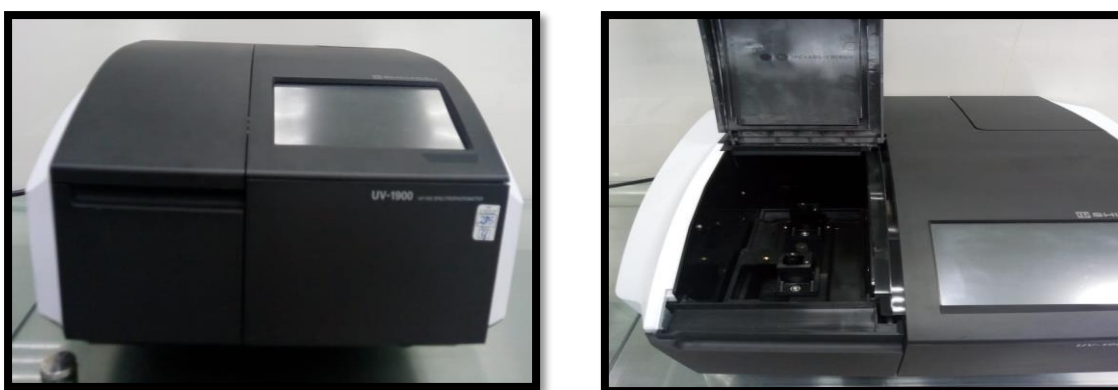


Figura N°44: Espectrofotómetro UV-vis

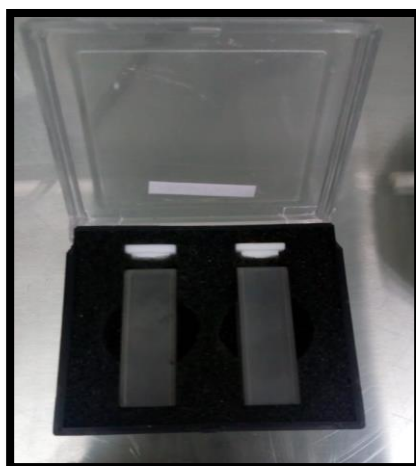
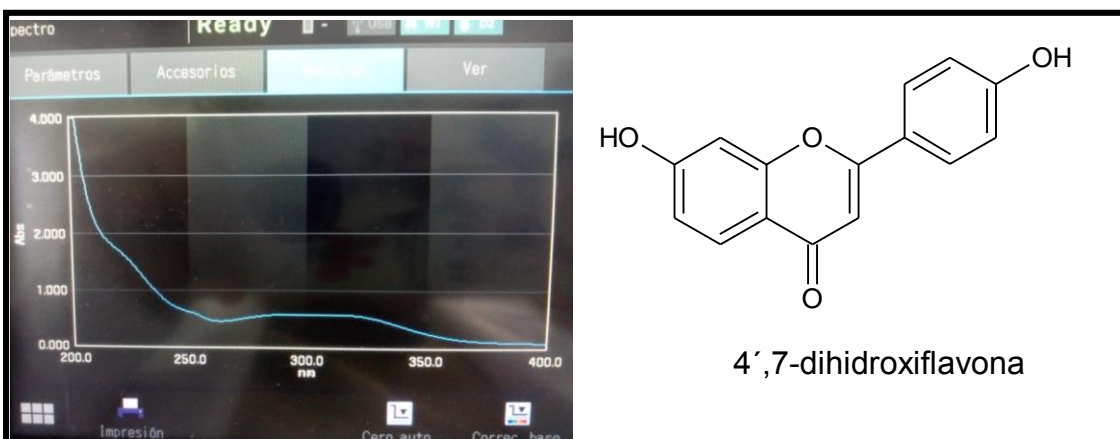


Figura N°45: Celdas de cuarzo

a) MUESTRA 3



$$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} \quad 250, 325 \text{ nm}$$

Figura N°46: Espectro UV-vis y propuesta estructural de la muestra 3 de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha).

Fuente: Propia

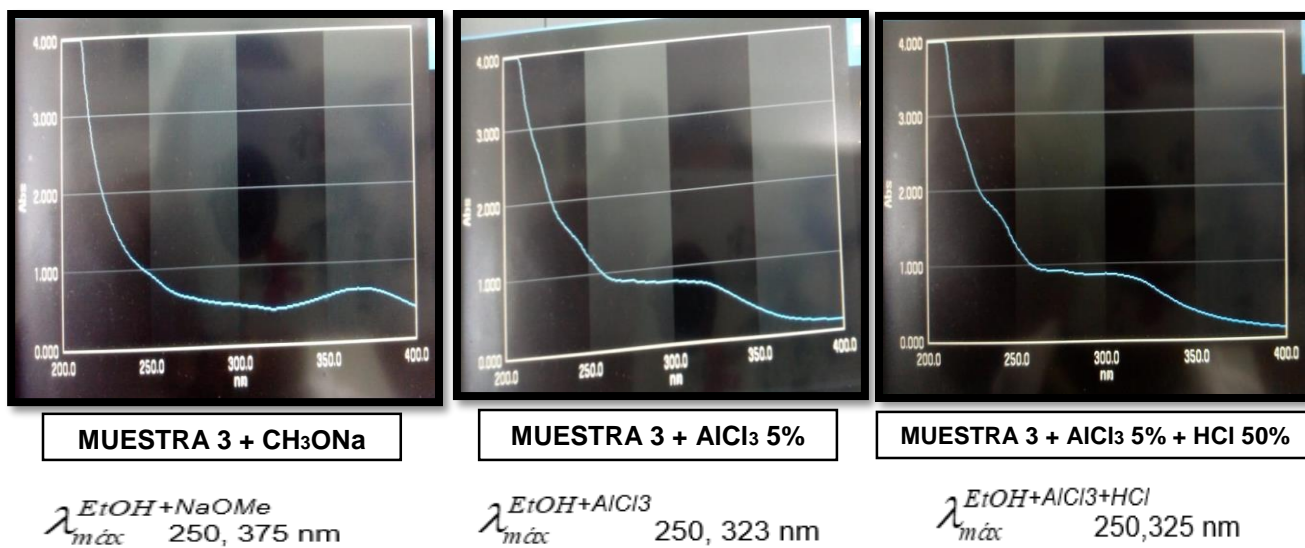
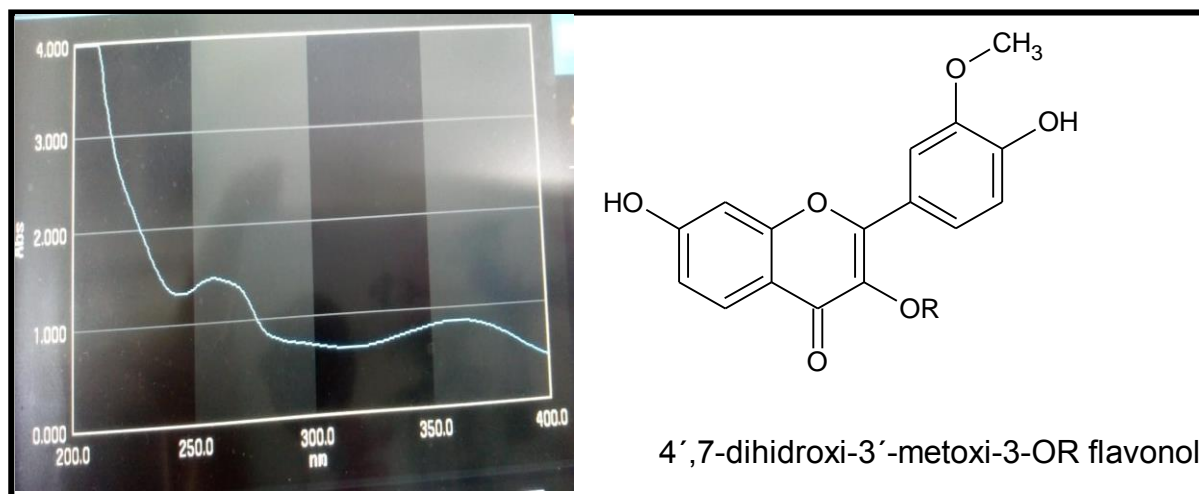


Figura N°47: Espectro UV-vis de muestra 3 con Metóxido de sodio (CH₃ONa), espectro UV-vis de muestra 3 con AlCl₃ 5% y espectro UV-vis de muestra 3 con AlCl₃ 5% + HCl 50%.

b) MUESTRA 5



$$\lambda_{m\acute{a}x}^{EtOH} \quad 262, 365 \text{ nm}$$

Figura N°48: Espectro UV-Vis y propuesta estructural de la muestra 5 de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Liancahuasha).

Fuente: Propia

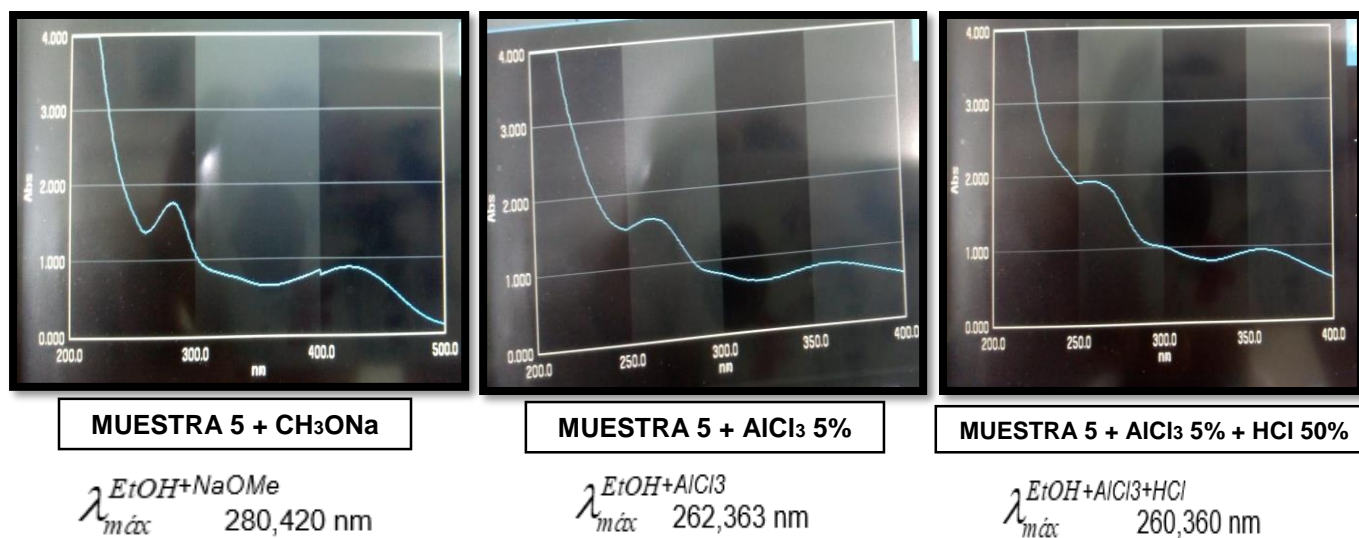
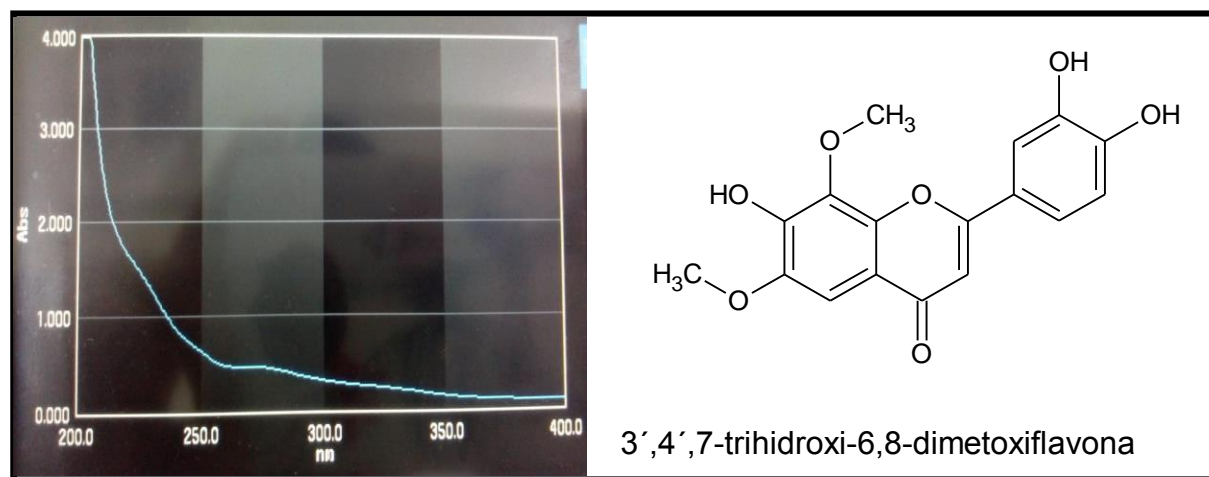


Figura N°49: Espectro UV-vis de muestra 5 con Metóxido de sodio (CH₃ONa), espectro UV-vis de muestra 5 con AlCl₃ 5% y espectro UV-vis de muestra 5 con AlCl₃ 5% + HCl 50%.

c) MUESTRA 7



$$\lambda_{m\acute{a}x}^{EtOH} \quad 275, 325 \text{ nm}$$

Figura N°50: Espectro UV-Vis y propuesta estructural de la muestra 7 de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha)

Fuente: Propia

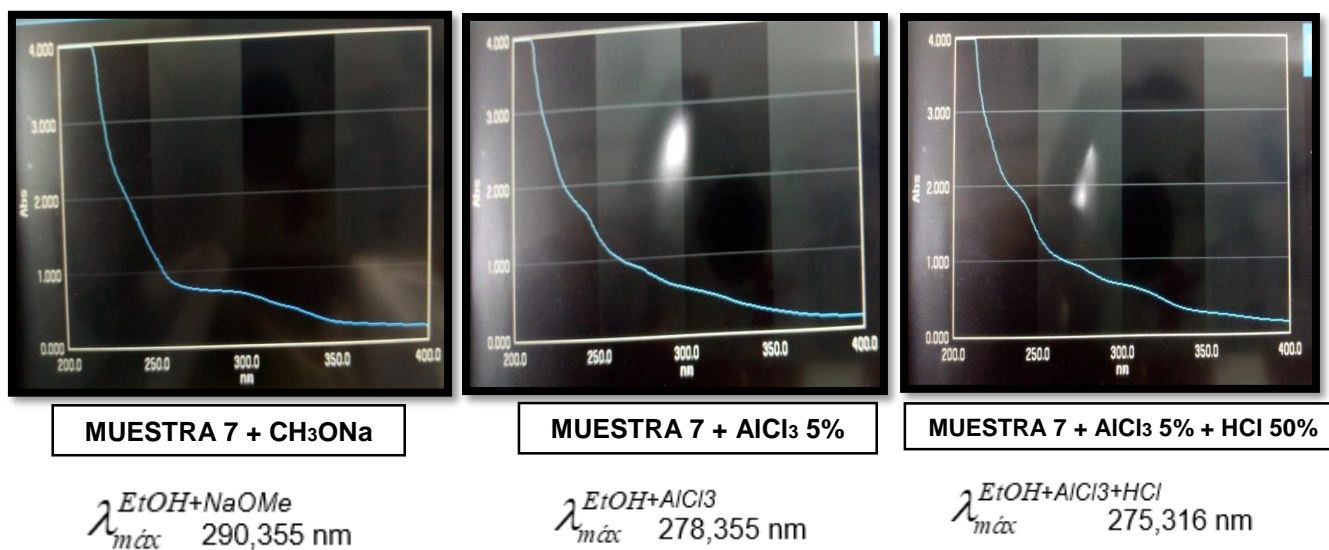
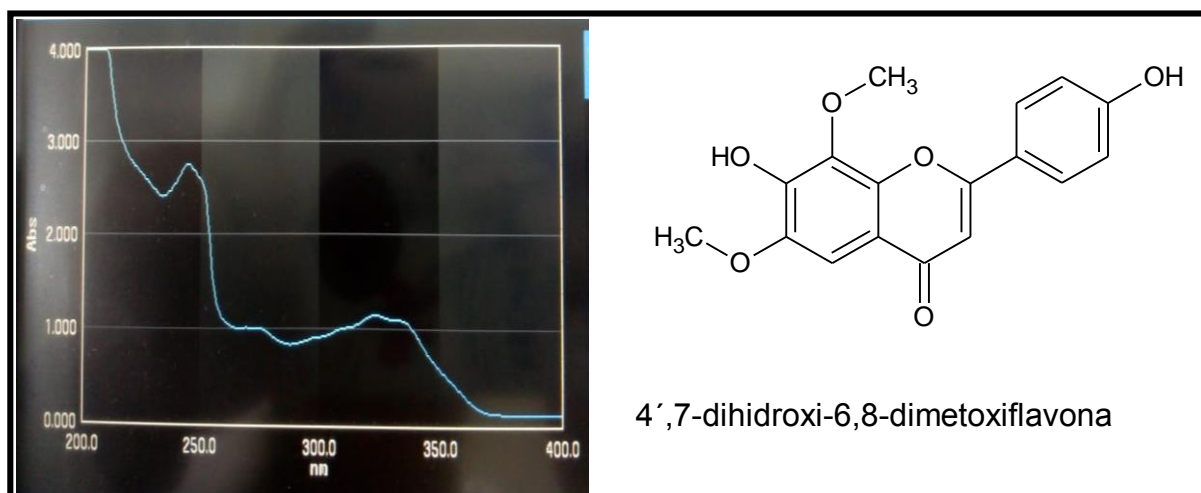


Figura N°51: Espectro UV-vis de muestra 7 con Metóxido de sodio (CH₃ONa), espectro UV-vis de muestra 7 con AlCl₃ 5% y espectro UV-vis de muestra 7 con AlCl₃ 5% + HCl 50%.

d) MUESTRA 8



$$\lambda_{m\acute{a}x}^{EtOH} \quad 275, 320 \text{ nm}$$

Figura N°52: Espectro UV-Vis y propuesta estructural de la muestra 8 de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha).

Fuente: Propia

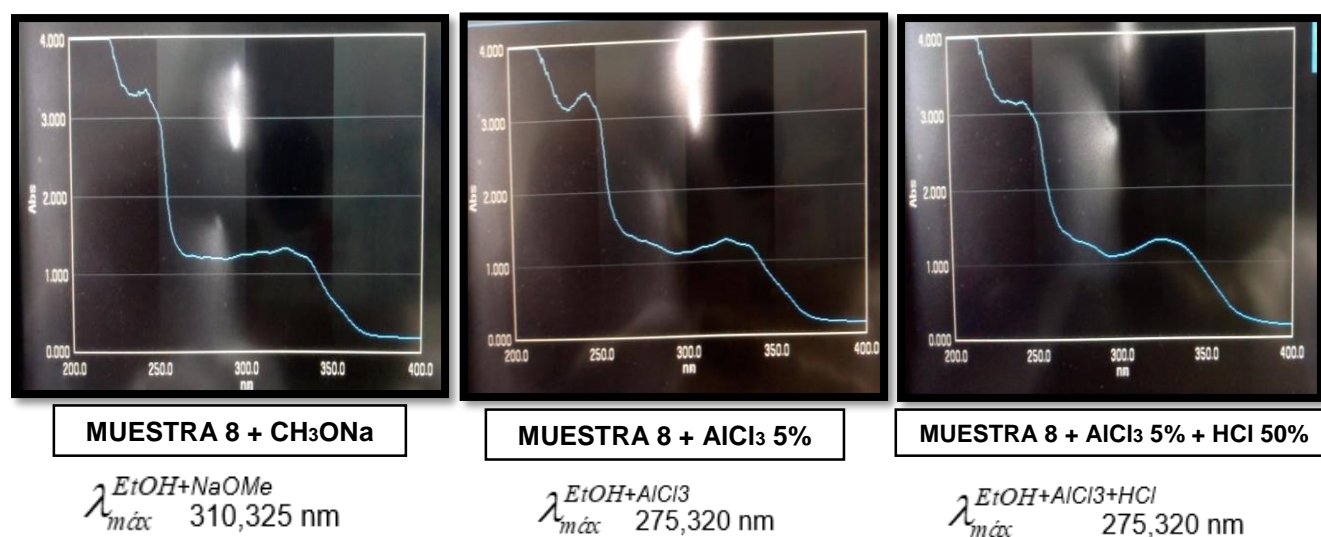
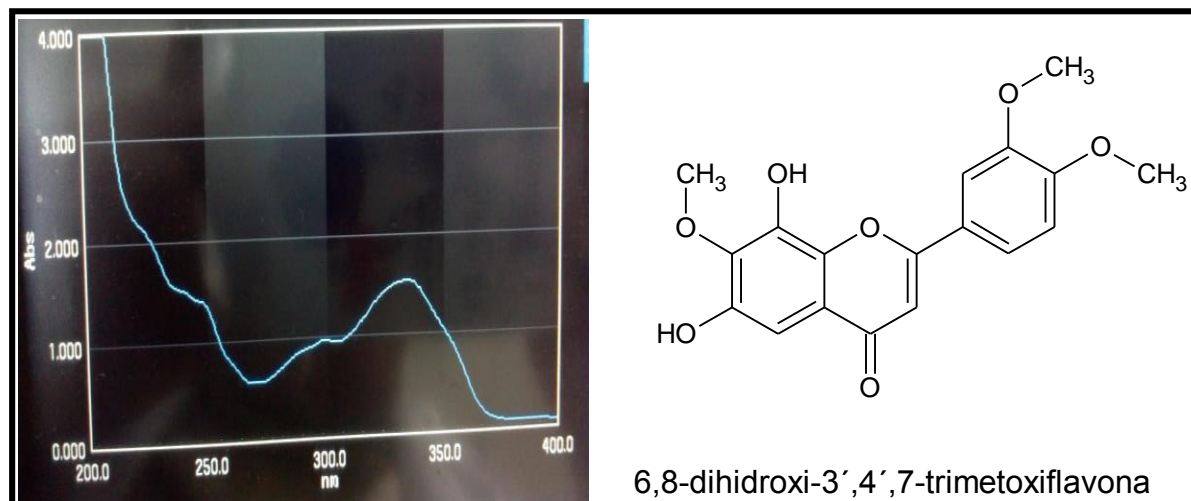


Figura N°53: Espectro UV-vis de muestra 8 con Metóxido de sodio (CH₃ONa), espectro UV-vis de muestra 8 con AlCl₃ 5% y espectro UV-vis de muestra 8 con AlCl₃ 5% + HCl 50%.

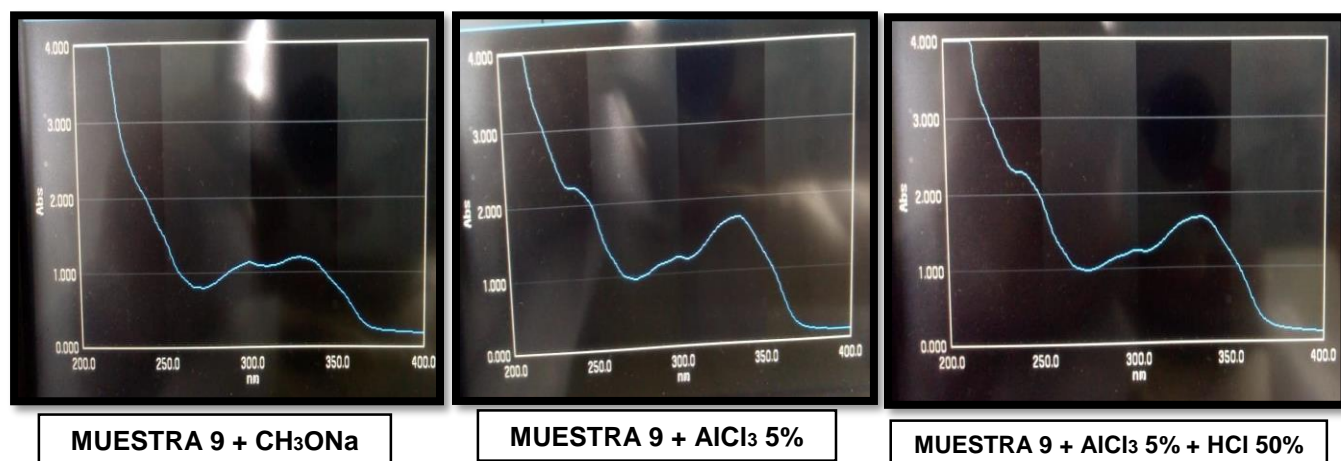
e) MUESTRA 9



$$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} \quad 245, 295, 335 \text{ nm}$$

Figura N°54: Espectro UV-Vis y propuesta estructural de la muestra 9 de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha).

Fuente: Propia



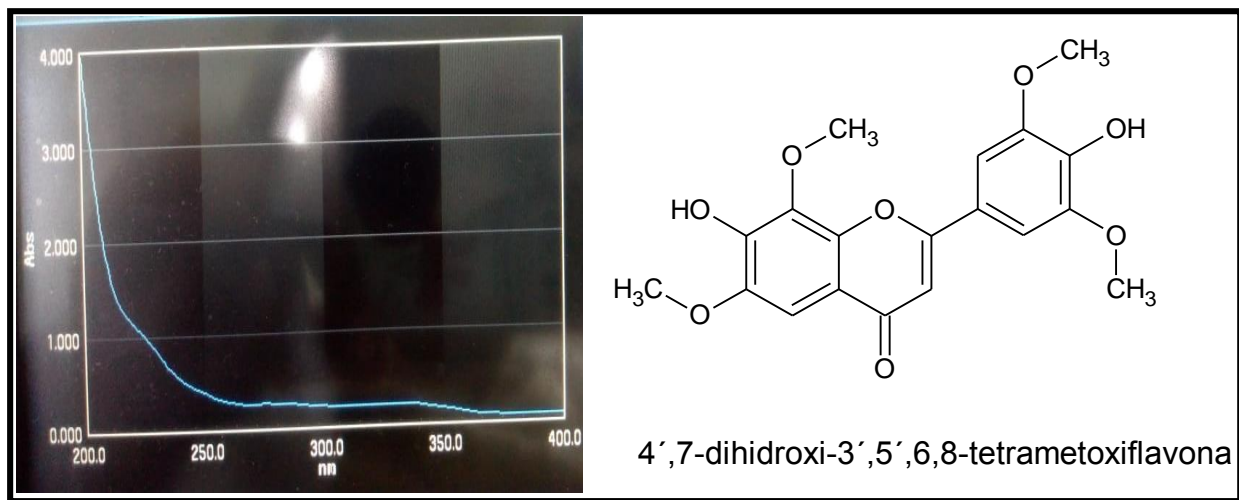
$$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} \quad 245, 295, 335 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH+AlCl}_3} \quad 235, 300, 335 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH+AlCl}_3+\text{HCl}} \quad 255, 298, 335 \text{ nm}$$

Figura N°55: Espectro UV-vis de muestra 9 con Metóxido de sodio (CH₃ONa), espectro UV-vis de muestra 9 con AlCl₃ 5% y espectro UV-vis de muestra 9 con AlCl₃ 5% + HCl 50%.

f) MUESTRA 10



$$\lambda_{\text{máx}}^{\text{EtOH}} \quad 275, 335 \text{ nm}$$

Figura N°56: Espectro UV-Vis y propuesta estructural de la muestra 10 de las hojas de *Senecio hyoseridifolius* Wedd (Llancahuasha).

Fuente: Propia

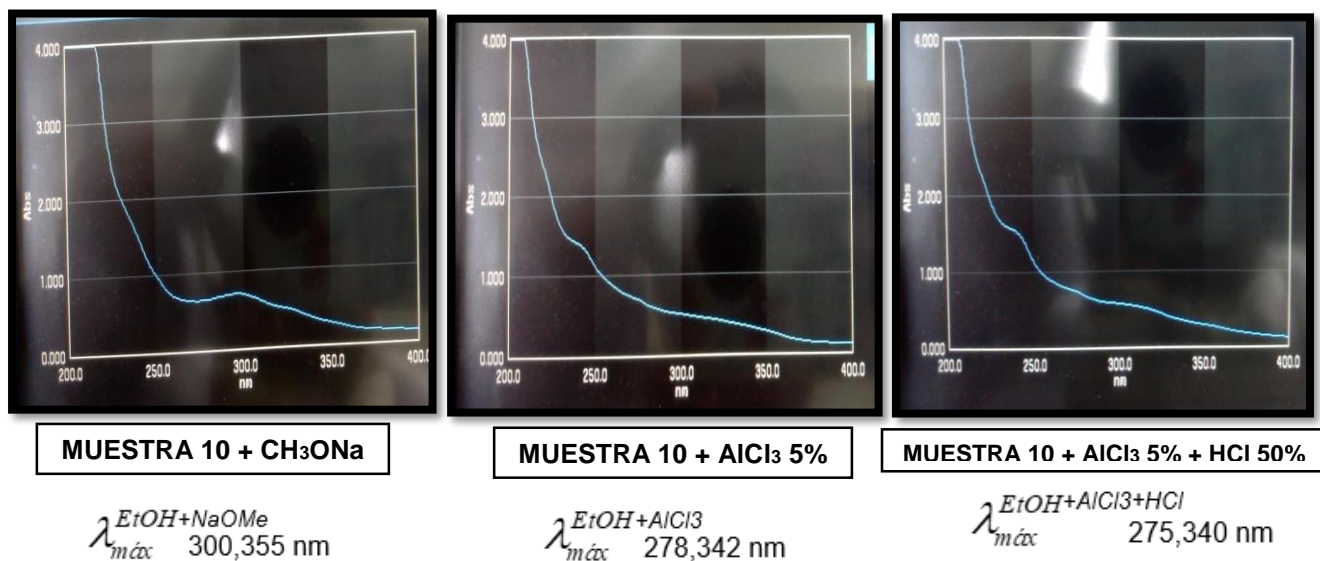


Figura N°57: Espectro UV-vis de muestra 10 con Metóxido de sodio (CH₃ONa), espectro UV-vis de muestra 10 con AlCl₃ 5% y espectro UV-vis de muestra 10 con AlCl₃ 5% + HCl 50%.

Anexo N°15: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA: Método de difusión en agar



Figura N°58: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de UNMSM.

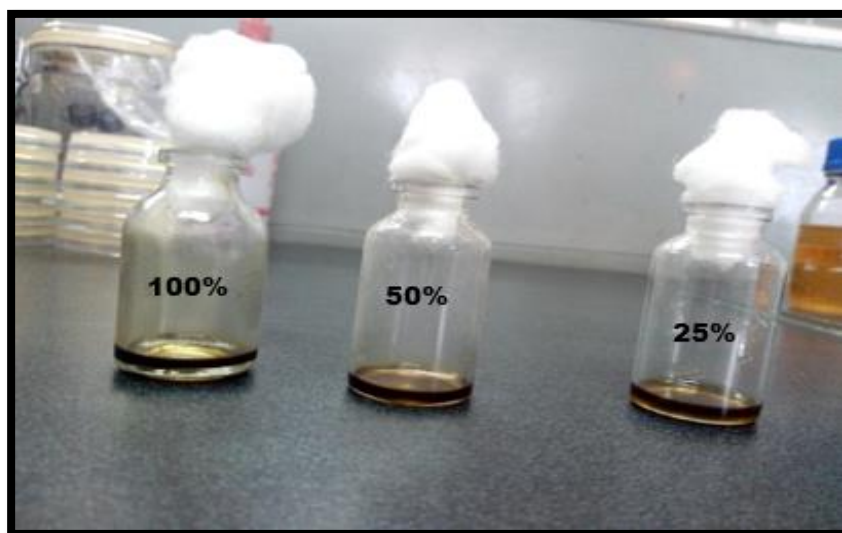


Figura N°59: Diluciones del extracto etanólico en Dimetilsulfóxido (DMSO).

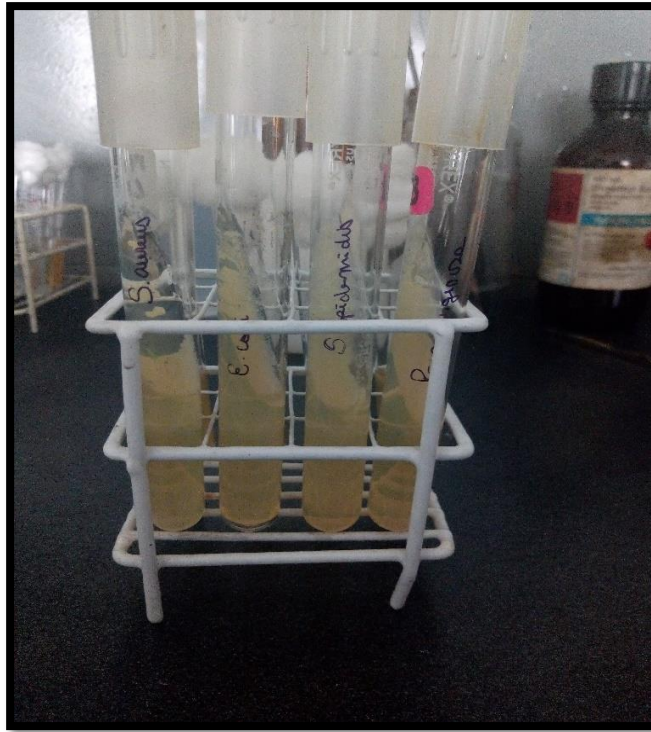


Figura N°60: Cepas de microorganismos usados para los ensayos microbiológicos (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15448).



Figura N°61: Microorganismos con turbidez N° 0.5 ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) según escala de Mc Farland.

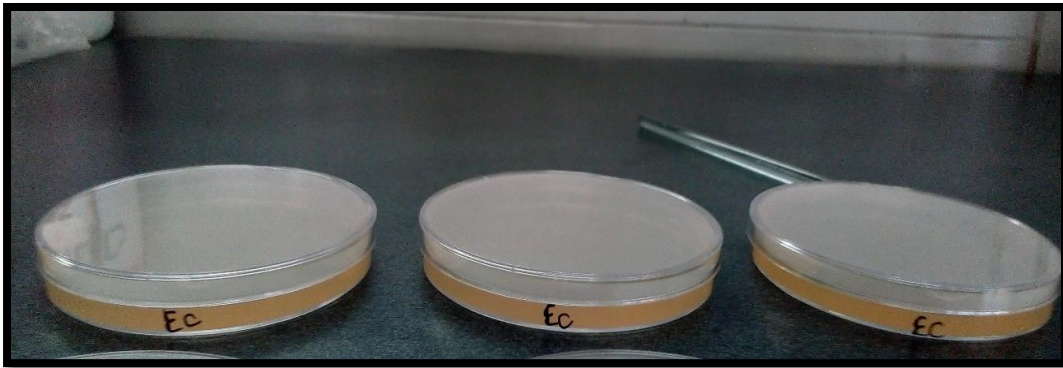


Figura N°62: Placas Petri preparadas con *Escherichia coli* ATCC 25922

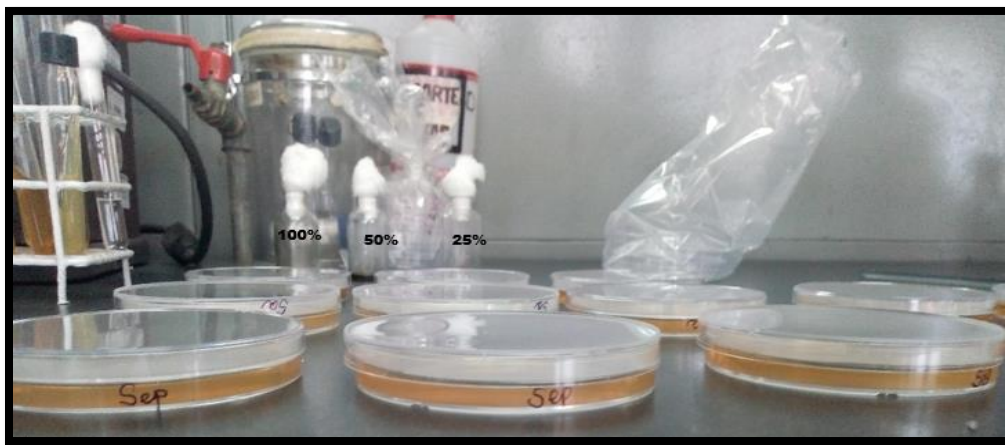


Figura N°63: Placas Petri preparadas con *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984

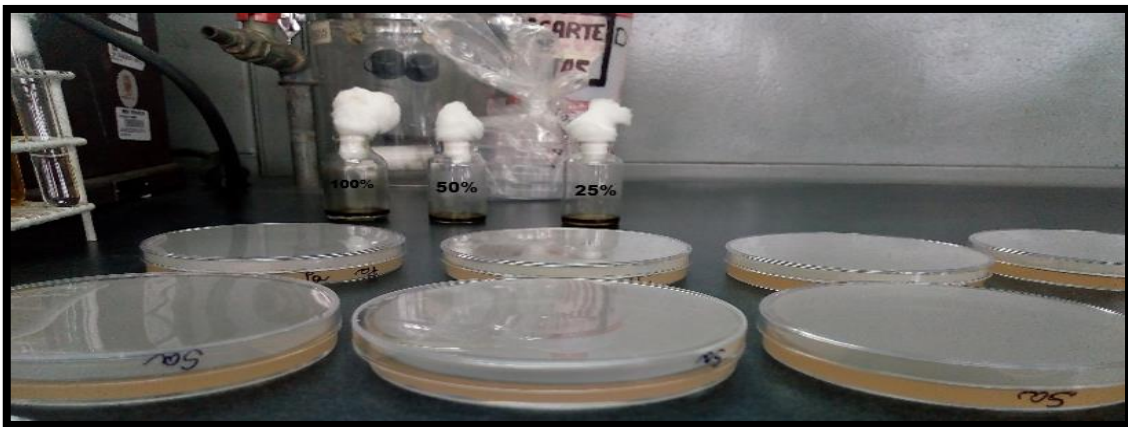


Figura N°64: Placas Petri preparadas con *Staphylococcus aureus* ATCC 33591 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15448.

Anexo N°16: DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA: Método de dilución colorimétrica en microplaca



Figura N°65: Cabina de flujo laminar Telstar del laboratorio de Microbiología de UNMSM.

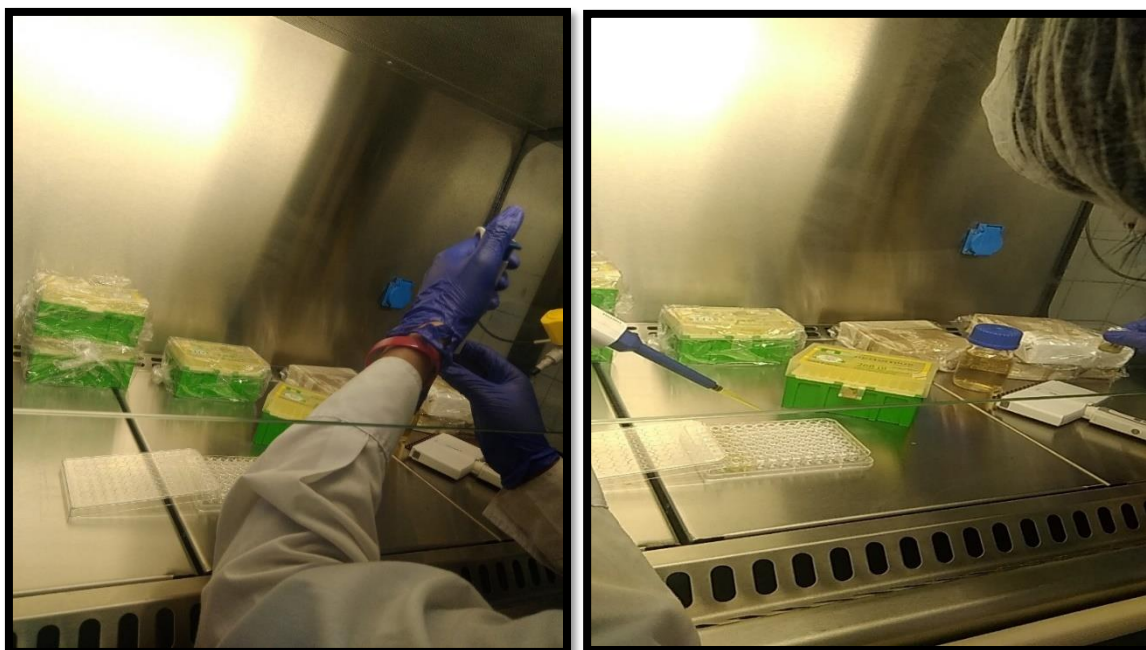


Figura N°66: Realizando las microdiluciones en la cabina de flujo laminar.

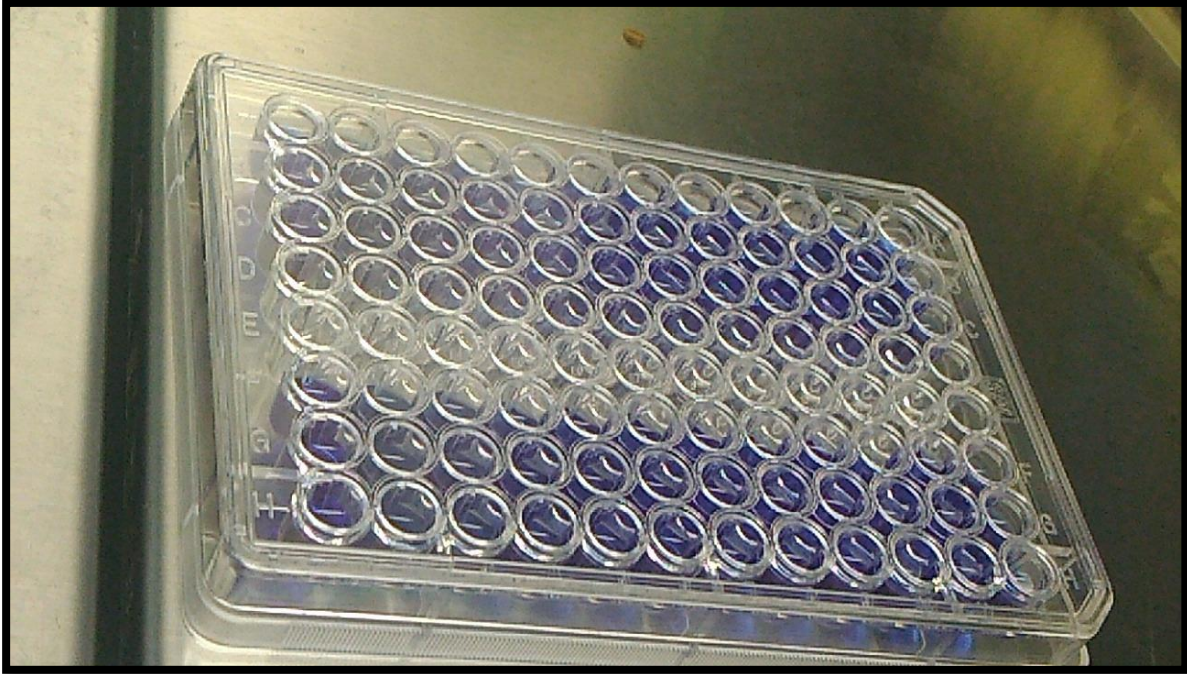


Figura N°67: Microplaca posterior a la incorporación de las muestras e inóculos.