



Universidad Nacional  
**SAN LUIS GONZAGA**



## **Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional**

Esta licencia es la más restrictiva de las seis licencias principales Creative Commons, permitiendo a otras solo descargar sus obras y compartirlas con otras siempre y cuando den crédito, pero no pueden cambiarlas de forma alguna ni usarlas de forma comercial.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>



UNIVERSIDAD NACIONAL SAN LUISGONZAGA

EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD



**CONSTANCIA**

El que suscribe, deja constancia que se ha realizado el análisis con el software de verificación de similitud al documento cuyo título de tesis es:

**ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA FRENTE MICROORGANISMOS GRAM POSITIVOS Y NEGATIVOS DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE Senecio nutans "CHACHACOMA"**

Presentado por:


**HUAMANI GUTIERREZ, NATALIA**

**Bachiller** del nivel **PREGRADO** de la Facultad de **FARMACIA Y BIOQUÍMICA**. El resultado obtenido es **18%** por el cual se otorga el calificativo de:

**APROBADO, según Reglamento de Evaluación de la Originalidad.**

Se adjunta al presente el reporte de evaluación con el software de verificación de originalidad.  
Observaciones:

Ica, 06 de Mayo de 2022

  
.....  
LUZ JOSEFINA CHACALTANA RAMOS  
DIRECTORA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACION  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

CHRLJ/osad

UNIVERSIDAD NACIONAL "SAN LUIS GONZAGA"

VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN

Facultad de Farmacia y Bioquímica



Título

Actividad antimicrobiana frente microorganismos gram positivos y negativos del extracto etanólico de *Senecio nutans* "chachacoma"

Línea de investigación

Salud pública y conservación del medio ambiente

TESIS

Autor:

HUAMANÍ GUTIÉRREZ NATALIA

Ica - Perú

2022

## **DEDICATORIA**

Dedico mi tesis de manera muy especial a mis padres y hermanos por brindarme su apoyo incondicional, a todos las personas y amigos que hicieron posible esta investigación, sobre todo a mi padre Anacleto Huamani Meza mi madre Natalia Gutiérrez Santaria, a mi tía en el cielo Antonia Huamani Meza por haberme apoyado en la recolección de la planta y haberme mostrado las riquezas de la naturaleza mediante esta planta.

## **AGRADECIMIENTOS**

- A Dios por su amor y su infinita misericordia que nos ha mostrado hasta el día de hoy, por su ayuda y fortaleza en toda esta situación actual tan difícil que estamos atravesando como humanidad.
- A mi padre por ser la fuerza y voluntad que me ha impulsado, a mi madre por ser el amor, la esperanza que necesita mi vida.
- A mi alma mater, la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica -Perú en especial a la facultad Farmacia y Bioquímica por darme la oportunidad de ser una profesional.
- A mi asesores Dr. Felipe Surco Laos y Dra. Maritza Roca Laos, quienes gracias a sus conocimientos, experiencia y motivación me guiaron en esta investigación.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

PORTADA	
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTO	iii
ÍNDICE	iv
- Índice de contenidos	iv
- Índice de tablas	v
- Índice de gráficos	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCION	9
II. ESTRATEGIA METODOLOGICA	29
III. RESULTADOS	38
IV. DISCUSIÓN	43
V. CONCLUSIÓN	45
VI. RECOMENDACIONES	46
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	47
VIII. ANEXOS	51

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1: Resultados marcha fitoquímica.	38
Tabla N° 2: Actividad Antimicrobiana frente a gram positivas: <i>Bacillus cereus</i> .	39
Tabla N° 3: Actividad Antimicrobiana frente a gram positivas: <i>Staphylococcus aureus</i> .	40
Tabla N° 4: Actividad Antimicrobiana frente a gram negativas: <i>Escherichia coli</i> .	41
Tabla N° 5: Actividad Antimicrobiana frente a gram negativas: <i>Salmonella tiphy</i> .	42

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico N° 1: Resultados marcha fitoquímica.	38
Gráfico N° 2: Actividad Antimicrobiana frente a gram positivas: <i>Bacillus cereus</i> .	39
Gráfico N° 3: Actividad Antimicrobiana frente a gram positivas: <i>Staphylococcus aureus</i> .	40
Gráfico N° 4: Actividad Antimicrobiana frente a gram negativas: <i>Escherichia coli</i> .	41
Gráfico N° 5: Actividad Antimicrobiana frente a gram negativas: <i>Salmonella tiphy</i> .	42

## RESUMEN

En la actualidad la medicina tradicional es un recurso primordial para la salud del ser humano. Las plantas y árboles son la base fundamental para el avance de la medicina moderna, y en algunos medios rurales e indígenas, es únicamente el recurso del que disponen debido al déficit de instituciones médicas y la carencia económica para poder adquirir medicamentos modernos. Las plantas medicinales han sido a través del tiempo una de las más importantes alternativas en el cuidado de la salud.

Los grandes desafíos respecto a las plantas medicinales son su adecuado registro, la conservación de la biodiversidad, el capital en una investigación, el respaldo de la calidad y la confianza de su uso.

Con la finalidad de ampliar los conocimientos se desarrolló el presente estudio fue comprobar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Senecio nutans* "chachacoma". Primeramente se determinó los metabolitos secundarios por reacciones de precipitación y/o coloración y la actividad antimicrobiana se realizó por método de difusión en agar, teniendo como resultados positivos de metabolitos secundarios: lactonas sesquiterpénicas /cumarinas , antraquinonas, esteroides/triterpenos, flavonoides y alcaloides , se obtuvo una actividad antimicrobiana frente a *Bacillus cereus* de 60% de inhibición a la concentración de 2.5 mg/ml, frente a *Staphylococcus aureus* un 27% de inhibición a una concentración de 45 mg/ml, *Escherichia coli* de 79% de inhibición a una concentración de 20 mg/ml, *Salmonella tiphy* de 27% de inhibición a una concentración de 45 mg/ml, concluyendo que la dosis efectiva frente al *E. coli* y *B. cereus* presenta alta sensibilidad mientras que para *S. aureus* y *S. tiphy* la sensibilidad es baja.

**Palabras claves:** *Senecio nutans*, metabolitos secundarios actividad antimicrobiana.

## ABSTRACT

At present, traditional medicine is an essential resource for human health. Plants and trees are the fundamental basis for the advancement of modern medicine, and in some rural and indigenous environments, it is only the resource available to them due to the lack of medical institutions and the economic lack to be able to acquire modern medicines. Medicinal plants have been one of the most important alternatives in health care over time.

The great challenges regarding medicinal plants are their proper registration, the conservation of biodiversity, the capital in an investigation, the support of quality and the confidence of their use.

In order to expand knowledge, the present study was developed to verify the antimicrobial activity of the ethanolic extract of the leaves of *Senecio nutans* "chachacoma". Firstly, the secondary metabolites were determined by precipitation and / or coloration reactions and the antimicrobial activity was carried out by means of diffusion in agar, having as positive results of secondary metabolites: sesquiterpenic lactones / coumarins, anthraquinones, steroids / triterpenes, flavonoids and alkaloids, Antimicrobial activity was obtained against *Bacillus cereus* of 60% inhibition at a concentration of 2.5 mg / ml, against *Staphylococcus aureus* 27% inhibition at a concentration of 45 mg / ml, *Escherichia coli* 79% inhibition at a concentration of 20 mg / ml, *Salmonella tiphy* of 27% inhibition at a concentration of 45 mg / ml, concluding that the effective dose against *E. coli* and *B. cereus* presents high sensitivity while for *S. aureus* and *S. tiphy* sensitivity is low.

**Keywords:** *Senecio nutans*, secondary metabolites, antimicrobial activity.

## I. INTRODUCCIÓN

El Perú es rico en recursos naturales, que han demostrado en el tiempo la gran efectividad que tienen en el uso popular, el empleo de estas plantas medicinales, es en muchos de los casos empíricos y llevado a cabo por curanderos que han adquirido estos conocimientos de generación en generación y de esta manera han llegado a nuestro tiempo, siendo muchas veces injustamente relegados por la medicina moderna<sup>1, 2</sup>. Por otro lado “Las infecciones causadas por organismos resistentes a los antibióticos (ORAs) podrían llegar a ser consideradas como una infección emergente, debido a que su tratamiento es cada vez más limitado con el potencial de afectar a todas las personas en el mundo”<sup>3</sup>, por lo que la comunidad científica está abocada a encontrar nuevas fuentes de principios activos que permitan combatir a los microorganismos que muestran resistencia a los antibióticos, son las plantas medicinales una fuente provisoria donde es de suma importancia demostrar la eficacia de su empleo y encontrar su uso adecuado. Son muchos los trabajos que se hacen sobre las plantas que tienen valor terapéutico demostrado en el uso popular y que inclusive en muchos casos tienen mayor eficacia que los compuestos sintetizados y sin reacciones adversas conocidas.

Existen muchas plantas medicinales que bien podrían ser utilizadas como productos de uso alternativo, razón por la cual en los últimos años se está revalorando el uso de las plantas medicinales con fines terapéuticos. En el afán para mejorar el problema de la salud se pretende contribuir con el presente trabajo “Actividad antimicrobiana frente microorganismos gram positivos y gram negativos del extracto etanólico de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma””, precisamente para respaldar los conocimientos de la etnobotánica y proponer una alternativa de tratamiento.

Con el propósito de resaltar y valorar el uso de las plantas medicinales y en la búsqueda de nuevas fuentes de sustancias con propiedades antimicrobiana de bajo costo, que no presenten resistencias ni efectos secundarios que afecta la salud se desarrollará el presente trabajo.

Finalmente, consideramos que es de suma importancia recuperar y validar el hábito de consumo de plantas medicinales, ampliar los conocimientos, preservar las especies y promover su siembra, de tal modo que el legado cultural de los pueblos amazónicos continúe en aumento y beneficie a quienes por siglos han acumulado y conservado estos benéficos saberes.

## 1.1. DESCRIPCIÓN DE LA REALIDAD PROBLEMÁTICA

El uso de las plantas medicinales se remonta muchos siglos atrás y han sido un recurso de gran importancia para poder aliviar las enfermedades; la zona de la sierra peruana es abundante en flora silvestre, muchas especies son frecuentemente usada en la medicina tradicional y sin que se haya convalidado su información ya que no se ha estudiado química, ni biológicamente. La especie *Senecio nutans* que crece en las alturas del anexo de San Martín de Pallca, distrito de Chipao, provincia de Lucanas, departamento de Ayacucho reportan ser usada para afecciones del aparato urinario, heridas, diarreas, mal de altura, etc. Sin embargo, en la literatura revisada solo se encontró estudios de actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de la especie de otros lugares de procedencia, frente a diversos microorganismos. En algunos de ellos reportan una efectiva actividad frente a microorganismos gram positivos; mientras que en el caso de microorganismo gram negativos los resultados son contradictorios<sup>4-6</sup>. Queda por determinar el efecto del extracto de las hojas que es la parte más frecuentemente usada por la población en la forma de infusión.

## 1.2. ANTECEDENTES DE LA INVESTIGACIÓN

### 1.2.1. Antecedentes nacionales

- De Feo V, et al. 2003.- obtuvieron aceites esenciales de las partes aéreas de *Senecio nutans* Sch. - Bip., la especie fue recolectada en dos localidades diferentes altitudes (3500 y 4800 msnm), en el departamento de Arequipa, Perú, los aceites se obtuvieron por hidrodestilación con rendimientos de 0,16% y 0,18%, respectivamente, en relación al peso fresco. La caracterización fue realizada por análisis de GC y GC-MS. Se identificaron 21 de 25 componentes en el aceite de las plantas a menor altitud, el aceite de la zona de mayor altitud mostró la presencia de 46 componentes, 41 de los cuales fueron identificados. En ambos aceites predominaron los hidrocarburos monoterpénicos, como sabineno y  $\alpha$ -terpineno como los principales constituyentes.<sup>7</sup>
- Juárez A et al 2013. Estudiaron los aceites esenciales de las partes aéreas de dos muestras de *Senecio nutans* Sch.-Bip. (Asteraceae), recolectadas en la región de Lima, Perú en diferentes estaciones del año, se obtuvieron por el método de hidrodestilación realizándose la caracterización por análisis de GC y GC-MS; siendo los constituyentes principales en ambos aceites, los hidrocarburos monoterpénicos como  $\alpha$ -

felandreno y p-cimeno. En los aceites se probaron su actividad antibacteriana en cepas bacterianas gram-positivas y gram-negativas, lo que resultó en una actividad débil contra *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli*.<sup>8</sup>

- Murillo B, Soncco C. 2017. Evaluaron el efecto antimicrobiano del aceite esencial de chacha koma (*Senecio nutans Schultz-Bip*) de procedencia de Patahuasi-Arequipa durante el almacenamiento de la hamburguesa de Carne de Vacuno. Por el método de cromatografía de gases acoplado a un detector de masas, se identificó en el aceite componentes como: methyl cinnamate (24,04%), 1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(13,14%), thymol (8,89%), etc. Se estableció “la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) por el método Kirby-Bauer en Aerobios Mesófilos, *Escherichia coli* y *Staphylococcus*; siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010)”. Se clasificó los halos de inhibición obtenidos de acuerdo a la escala de sensibilidad de Duraffourd y Lapraz (1983). Al analizar las características fisicoquímicas como el pH de las muestras de hamburguesa se observó que las muestras testigo, 0,25% nisina, 0,1%, 0,125%, 0,15% y 0,175% de aceite esencial que mantiene un pH según la NTP por un tiempo de hasta 10, 20, 14, 14, 16 y 18 días respectivamente. Y al realizar el análisis microbiológico en la muestra testigo, con 0,25% de nisina, con 0,1%, 0,125%, 0,15% y 0,175% de aceite esencial almacenados a 4°C evidencian claramente que el recuento microbiano de Aerobios Mesófilos, *E. Coli*, y *Staphylococcus aureus* no excede lo establecido por la NTP.<sup>9</sup>
- Alderete H. 2017. Evaluó la “Actividad antimicrobiana, antioxidante in vitro y determinación de la composición química de tres aceites esenciales del género *Senecio* del Perú”; siendo estas especies *Senecio nutans Sch. Bip* (Wiskataya), *Senecio calvus Cuatrec* (Huamanripa) y *Senecio chiquianensis* Cabrera (Remilla). Los aceites esenciales fueron obtenidos de las partes aéreas por el método de destilación por arrastre de vapor de agua, La actividad antimicrobiana se evaluó a través del método de microdilución colorimétrica, determinándose la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) presentando la actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Bacillus cereus* ambiental y escasa actividad frente *Escherichia coli* cepa clínica y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.<sup>10</sup>

- Mamani D. 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 investigación se realizó en la ciudad de Puno teniendo como objetivo: a) aislar bacterias *Escherichia coli*, *Klebsiella sp* y *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus sp* a partir de muestras de pacientes con infección urinaria del Centro de Salud Metropolitano de Puno, y b) evaluar el efecto de los extractos alcohólicos de hojas y tallos de *Senecio spp* (chachacoma) en el crecimiento in vitro de bacterias aisladas a partir de muestras de pacientes con infección urinaria. El aislamiento bacteriano se realizó mediante la técnica de cultivo in vitro en agar EMB y Manitol Salado la evaluación antimicrobiana se realizó mediante el método de Kirby Bauer o de difusión en agar con discos de sensibilidad. Los extractos alcohólicos de hojas y tallos de *Senecio spp* (chachacoma) presentaron efecto inhibitorio solo en bacterias *Staphylococcus aureus*, siendo mayor el efecto del extracto de hojas ( $P < 0.05$ ), mientras tanto *Escherichia coli* y *Klebsiella sp* resultaron resistentes. Los extractos alcohólicos de hojas y tallos de *Senecio sp*, inhibieron entre el 39.71 y 46.89% respectivamente.<sup>11</sup>

### 1.2.2. Antecedentes Internacionales

- Nuram K, et al. 2010. En su estudio sobre “Los aceites esenciales de la flor, hoja y tallo frescos de *Senecio pandurifolius* (Asteraceae)” aislaron por hidrodestilación utilizando un aparato del tipo Clevenger, y fueron caracterizados por GC-FID y GC-MS. Se identificaron un total de cuarenta y cinco, sesenta y cuarenta y dos compuestos, que constituyen más del 90,1%, 88,0% y 89,0% de la composición total de aceite de la flor, hoja y tallo de *S. pandurifolius*, respectivamente. El perfil cromatográfico revela principalmente los hidrocarburos sesquiterpénicos (flor: 42.4%; hoja: 43.4%; tallo: 52.3%). Los componentes principales propios de *S. pandurifolius* fueron  $\gamma$ -curcumeno (14,9%) en tallo,  $\alpha$ -cupreneno (30,7%) en flor, y  $\alpha$ -zingibereno (16,1%) en hoja. Los compuestos que estaban en cantidades menores relacionados con el terpeno en todas las partes (flor: 1,4%, hoja: 1,5%, tallo: 1,9%) de *S. pandurifolius*. No se detectaron hidrocarburos monoterpenos ni monoterpenos oxigenados en el aceite esencial del tallo. Se investigaron las actividades antimicrobianas de los aceites esenciales mostrando actividad contra las bacterias gram

positivas, micobacterias y hongos, pero no contra las bacterias gram negativas. Se observó una alta actividad antimicobacteriana con el aceite esencial de hoja, que merece una investigación adicional para determinar sus componentes activos".<sup>12</sup>

- Benites J et al. 2011. "Un aceite esencial de *Senecio atacamensis Phil.* (Asteraceae) se obtuvo por hidrodestilación de sus hojas y tallos, determinando su composición mediante análisis GC y GC / MS. La identificación de los aceites de hojas como en tallos, respectivamente, mostró  $\alpha$ -terpineno (36,05% y 20,57%);  $\alpha$ -felandreno (27,79% y 25,37%) y p-cimeno (11,85% y 22,55%) como los monoterpenos más abundantes. La actividad antimicrobiana se determinó utilizando la difusión en discos de papel y el método de caldo de dilución, que muestra una moderada inhibición de las bacterias patógenas humana probadas".<sup>13</sup>

### 1.3. MARCO TEÓRICO

#### 1.3.1. Clasificación Taxonómica:

Según las revisiones bibliográficas a esta especie *Senecio nutans* se encuentra con dos denominaciones científicas.

- Familia: Asteraceae (Compositae)
- Nombre científico: *Senecio nutans* Sch. Bip.,
- Bonplandia 4(4):51. 1856.
- Sinónimo: *Senecio graveolens webb.*
- Nombre vulgar: Chachacoma, chachakuma, chachacoma de burro, chachakuma blanca, chachakoma de gente.<sup>14</sup>

#### 1.3.2. Características de planta

##### Descripción Botánica *Senecio nutans*

- **Arbusto** aromático, perennifolio de 60 x 50 cm, Ramas densamente hojosas.<sup>16</sup>
- **Hojas** alternas, pequeñas, algo alargadas, de 2 - 5 mm x 1 - 2 mm, sésiles, comprimidas sobre el tallo, de borde lobulado a manera de 5 dedos carnosos e involutos.<sup>15</sup>
- **Capítulos** axilares, de 10 x 5 mm, cortamente pedunculados, con dos bractéolas alternas. Calículo formado por 9 brácteas dispuestas en

dos verticilos: el externo con 4 y el interior con 5. Involucro formado por 7 - 9 brácteas lanceoladas de 6,5 mm. <sup>15</sup>

- **Flores** amarillas o amarillo-rojizas, tubulosas, pentadentadas, hermafroditas, actinomorfas, con cáliz plumoso, de color blanco; estambres con anteras unidas; ovario ínfero y estilo dividido en dos ramas. <sup>15</sup>
- **Fruto**, un aquenio glabro. Florece en cualquier época del año, preferentemente en invierno y primavera. Crece en suelos arenosos y arcillosos de laderas de cerros, bordes de la carretera, junto a las especies que forman tolares y pajonales (Linares & Benavides, 1995). <sup>15</sup>

### **Usos en la medicina tradicional de *Senecio nutans***

“Medicinalmente, se le utiliza como infusión para dolores estomacales, mal de altura (soroche o puna), pero refieren que un exceso de uso de esta planta puede causar la ceguera. Para el dolor de estómago, puna (mal de altura), se toma como mate de hojas y ramas, para la fiebre, tos y resfriado fuerte, el humo respirado en sahumero cura el romadizo y otros males. Se prepara pomadas para los dolores y en algunos casos la molienda de sus hojas se mezcla con otras pomadas (mentholatum, pomada alcanforada). Remedio para problemas urinarios (Villagrán y Castro, 2004)”. <sup>16</sup>

### **Otros usos**

Se considera como forraje para ganado equino (Vargas, 1988). <sup>6</sup>

## **1.3.3. Susceptibilidad**

### **1.3.3.1 Definición de susceptibilidad**

Una cepa es susceptible si puede ser tratada exitosamente con las dosis recomendadas del antimicrobiano para la especie bacteriana y sitio de infección. <sup>17</sup>

### **1.3.3.2. Pruebas de susceptibilidad**

Existen varios tipos de pruebas para dicha evaluación, las más resaltantes son:

#### **Pruebas de susceptibilidad por pozos modificados de agar:**

Primeramente un hisopo estéril se sumerge en el inóculo que debe tener una concentración de  $10^8$  organismos/ml. equivalente al

estándar N° 0,5 de MacFarland, se hace el frotis estirándose de forma paralela y compacta abarcando todo el área del agar repitiendo en más de dos oportunidades, se deja secando durante 5 minutos.<sup>17</sup>

Seguidamente se hacen los pozos sobre la superficie de los agares con ayuda de un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro, y en cada uno de ellos se vierten los extractos, estándares y blancos por triplicado. Las placas se incuban invertidas a  $35 \pm 2^\circ \text{C}$  por 18 horas (bacterias) y a  $29 \pm 2^\circ \text{C}$  por 48 horas (levadura)<sup>18</sup>.

Finalmente, se miden los halos de inhibición incluyendo el diámetro de los discos, la lectura de la prueba de sensibilidad se hizo por medio de una regleta de medición y se interpretaron los resultados como sensible (S), intermedio (I) o resistente (R) (NCCLS, 2012)<sup>18</sup>

#### **1.3.4. Antibióticos**

Los antibióticos son medicamentos que combaten infecciones causadas por bacterias en los seres humanos y los animales ya sea destruyendo a las bacterias (bactericidas) o inhibiendo su crecimiento y multiplicación (bacteriostáticos), facilitando así su eliminación por parte de las defensas naturales del organismo.<sup>19</sup> Para que un antibiótico actúe frente a un determinado microorganismo, tiene que atravesar la barrera superficial de la bacteria para situarse en el punto diana de acción del mismo.<sup>20</sup>

##### **1.3.4.1. Clasificación de antibióticos**

1. Aminoglucósidos: Se asocian a los ribosomas bacterianos (fracción 30S), lo que provoca la producción de proteínas bacterianas dañadas, de otro modo la inhibición total de la síntesis proteica de la bacteria. Estreptomina neomicina, amikacina, kanamicina, tobramicina, gentamicina, capreomicina, paromomicina.<sup>21</sup>
2. Betalactámicos: Inhiben la síntesis de la pared celular bacteriana. Inhiben la transpeptidación en las fases finales de la síntesis del peptidoglicano, polímero primordial para la pared bacteriana.<sup>21</sup>
  - A. Penicilinas:

- Bencilpenicilinas: bencilpenicilina (penicilina G); fenoximetilpenicilina (penicilina V).
- Isoxazolilpenicilinas: cloxacilina
- Aminopenicilinas: amoxicilina; ampicilina.
- Ureidopenicilinas: piperacilina.<sup>21</sup>

B. Cefalosporinas:

- 1ª generación: cefadroxilo, cefalexina, cefazolina sódica.
- 2ª generación: cefaclor, cefuroxima, cefonicida, cefoxitina, cefminox.
- 3ª generación: cefixima, cefpodoxima proxetilo, cefditoreno pivoxilo, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona.
- 4ª generación: cefepima.
- 5ª generación: ceftarolina fosami, ceftobiprole medocaril, ceftolozano.<sup>22</sup>

C. Monobactámicos: actúa de manera excelente frente a bacterias Gram negativas aerobias y facultativas. Aztreonam.<sup>23</sup>

D. Carbapenemes: Son un tipo único de betalactámicos que presentan un alto espectro de actividad conocido dentro de este grupo de antibióticos. Imipenem, meropenem, ertapenem.<sup>23</sup>

E. Inhibidores de las beta-lactamasas: Son altamente afines por las betalactamasas, se posan en ellas de manera irreversible. Se usan conjuntamente con los betalactámicos; aumenta su actividad bloqueando los mecanismos de resistencia de las bacterias. (amoxicilina)/ácido clavulánico; (ampicilina)/sulbactam; (piperacilina)/tazobactam; (ceftazidima)/avibactam; (ceftolozano)/tazobactam.<sup>23</sup>

3. Anfencólicos: Obstaculizan con la síntesis proteica bacteriana (unión a la subunidad 50S del ribosoma) y son bacteriostáticos. Cloranfenicol.<sup>21,23</sup>

4. Glucopéptidos: Se utilizan para tratar infecciones complicadas y/o graves a causa de bacterias grampositivas Vancomicina, teicoplanina, dalvabancina.<sup>21,23</sup>

5. Lincosamidas: Se fijan a la fracción 50S de los ribosomas bacterianos impidiendo la síntesis proteica pueden ser bactericidas dependiendo de su concentración. Clindamicina, lincomicina.<sup>22,23</sup>
6. Macrólidos: Inhiben la síntesis proteica bacteriana por fijación a la subunidad 50S de los ribosomas. Bloquea las respuesta de transpeptidación y traslocación del ribosoma bacteriano.<sup>21,23</sup>
  - A. Macrólidos de 14 átomos: eritromicina, claritromicina, roxitromicina.
  - B. Macrólidos de 15 átomos: azitromicina.
  - C. Macrólidos de 16 átomos: espiramicina acetil, josamicina, midecamicina diacetil.<sup>21,23</sup>
7. Nitroimidazol: Atraviesan en el citoplasma celular de anaerobios o microaerófilos induciendo una lesión oxidativo en las cadenas de ADN, tienen impacto bactericida rápido, metronidazol, tinidazol.<sup>21,23</sup>
8. Oxazolidinona: Inhibición de la síntesis proteica, se unen a la subunidad 50S ribosómica, y de la construcción del complejo de iniciación 70S. linezolid, tedizolid.<sup>21,23</sup>
9. Rifamicinas (ansamicinas): Se asocia a la subunidad b de la ARN-polimerasa responsable de la transcripción del ADN bacteriano a ARN. Actividad comúnmente bactericida. Rifabutina, rifampicina, rifaximina.<sup>21,23</sup>
10. Sulfonamidas (entre paréntesis el antibiótico al que se asocian): Por lo general bacteriostáticas, actúan inhibiendo la síntesis del ácido fólico de los organismos susceptibles. (trimetoprima)-sulfametoxazol, llamado como cotrimoxazol; (trimetoprima)-sulfadiazina, como cotrimacina; sulfacetamida; sulfadiazina argéntica.<sup>21-23</sup>
11. Tetraciclinas: por lo común son bacteriostáticas y trabajan inhibiendo la síntesis del ácido fólico de los organismos susceptibles.
  - A. 1ª Generación: tetraciclina clorhidrato.
  - B. 2ª Generación: doxiciclina, minociclina.
  - C. 3ª Generación: oxitetraciclina, tigeciclina.<sup>21-23</sup>

12. Quinolonas: Inhiben selectivamente la ADN-girasa bacteriana, enzima que interviene en el plegamiento de la doble hélice del ADN, y que es primordial para su esquema tridimensional correcta del material genético.<sup>23</sup>
- A. 1ª Generación: ácido nalidíxico
  - B. 2ª Generación: ciprofloxacino; norfloxacino; ofloxacino; ozenoxacino.
  - C. 3ª Generación: levofloxacino.
  - D. 4ª Generación: moxifloxacino; nadifloxacino.<sup>23</sup>
13. Ácido fusídico
- Tiene un espectro de acción muy estrecho pero es muy activo frente a *S. aureus*, incluyendo *S. aureus* resistente a meticilina y estafilococo coagulasa negativo, *Clostridium* spp., *Corynebacterium* spp. y la gran cantidad de los anaerobios. Tiene cierto nivel de acción frente estreptococos. Se utiliza de forma tópica.<sup>23, 24</sup>
14. Bacitracina, gramicidina y tirotricina
- Activos frente a gram positivos, tóxicos por vía sistémica, su empleo en preparados tópicos.<sup>23, 24</sup>
15. Bedaquilina, delamanid
- Fármacos de primera línea en el tratamiento de la tuberculosis multirresistente.<sup>23, 24</sup>
16. Daptomicina
- Es el representante de los lipopéptidos. Se inserta en la membrana citoplasmática de microorganismos gram positivos formando canales que despolarizan la membrana por la disminución de  $K^+$ , produciendo un efecto bactericida rápido concentración-dependiente. Tiene gran actividad frente a gram positivos, incluyendo enterococos resistentes a vancomicina, *S. aureus* resistente a meticilina y neumococos resistentes a penicilina. La actividad bactericida se reduce algo en presencia de albúmina y especialmente con surfactante pulmonar (probablemente por secuestro del lipopéptido), por lo que no está indicado en la neumonía. Está aprobado en niños mayores de un año y se administra únicamente en una dosis diaria, con administración

exclusivamente IV. Su efecto adverso más común es la toxicidad muscular, que es reversible al separar el tratamiento. Es posible se de resistencias, especialmente si el paciente ha recibido tratamiento antes con vancomicina.<sup>23,</sup>

<sup>24</sup>

#### 17. Fosfomicina

Derivado del ácido fosfónico, bloquea la síntesis de los precursores del peptidoglucano. Ejerce un efecto bactericida rápido sobre bacterias en fase de desarrollo. Es activo frente a gram positivos y negativos y puede ser administrado de forma oral y parenteral. Se usa principalmente para el tratamiento de infecciones del tracto urinario porque alcanza picos de concentración muy altos en la orina, que se mantienen durante 24-48 h.<sup>23, 24</sup>

#### 18. Isoniazida, pirazinamida, etambutol

Antibióticos de primera línea indicada para la tuberculosis. Isoniazida tiene una resistencia primaria en nuestro medio mayor al 5%. Se debe administrar juntamente con piridoxina para evitar la neuritis periférica. Observar los efectos hepatotóxicos de isoniazida, sobre todo en combinación con pirazinamida. Etambutol puede ser activo frente a cepas resistentes a isoniazida y otros tuberculostáticos. La resistencia primaria es poca.<sup>23, 24</sup>

#### 19. Mupirocina

Bloquea la síntesis proteica; contiene actividad bactericida. Es activa frente a la mayoría de cepas de estreptococo y estafilococo. Es inactiva contra *P. aeruginosa*, enterobacterias y anaerobios. Tampoco es activa *in vitro* frente a la flora cutánea residente habitual. Se utiliza por vía tópica. El uso continuo de mupirocina ha dado lugar a resistencias en *S. aureus* meticilín sensible, *S. aureus* meticilín resistente y estafilococos coagulasa negativos. En España, la resistencia a mupirocina en niños menores de 14 años portadores nasales es 7% para *S. aureus* meticilín sensible y 14% para *S. aureus* meticilín resistente.<sup>23, 24</sup>

## 20. Nitrofurantoína

Mecanismo de acción poco conocido. Inhibe la síntesis proteica. Tras su absorción oral pasa rápidamente de la sangre, donde genera niveles subterapéuticos, a la orina, donde es bactericida.

Su principal uso es como quimioprofilaxis en infecciones del tracto urinario; sin embargo, la AEMPS publicó una alerta en 2016 sobre su uso y conjuntamente de nitrofurantoína y reacciones adversas graves pulmonares (fibrosis neumonitis intersticial) y hepáticas (hepatitis crónica, hepatitis colestásica, hepatitis crónica, cirrosis) en tratamientos profilácticos prolongados o intermitentes a largo plazo. Durante su uso se deben evitar agentes que alcalinicen la orina (tales como citrato potásico), ya que aumenta la concentración mínima inhibitoria bacteriana. No está indicada en insuficiencia renal, en tratamientos prolongados (>7 días) o intermitentes y en el embarazo a término.<sup>23, 24</sup>

## 21. Polimixinas

La polimixina B y la colistina son nefrotóxicos y neurotóxicos en su uso sistémico, quedando relegados en el arsenal terapéutico. Hoy en día se han rescatado en forma de aerosol en pacientes con fibrosis quística y vía intravenosa para el tratamiento de infecciones nosocomiales graves por *Pseudomonas* y *Acinetobacter* spp. multirresistentes. No se absorben por vía oral por lo que se han utilizado en infecciones gastrointestinales por su acción contra bacterias gram negativas. Se usa también en preparados tópicos.<sup>23, 24</sup>

## 22. Trimetroprima

Es una diaminopirimidina que inhibe la producción del ácido fólico, pero en otra fase metabólica distinta de las sulfonamidas. Tiene un espectro de actividad similar a las sulfonamidas y actúa sinérgicamente con ellas. Por mucho tiempo sólo estuvo comercializada en conjunto con sulfametoxazol (cotrimoxazol). Actualmente también se usa sola, sin asociar a sulfonamidas, en el tratamiento de infecciones del tracto urinario y respiratorio.<sup>23, 24</sup>

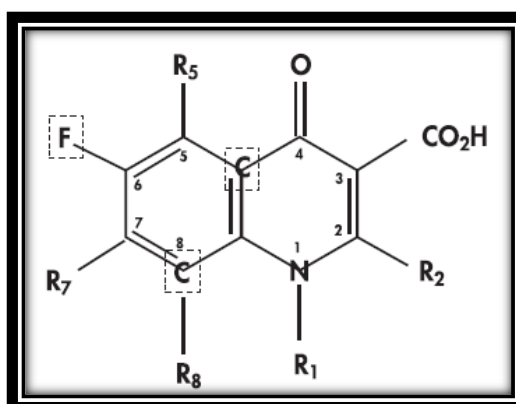
## Ciprofloxacino

Es un agente antibacteriano que pertenece al grupo de las fluoroquinolonas, la acción bactericida de ciprofloxacino se debe a la inhibición tanto de la topoisomerasa de tipo II (ADN-girasa) como de la topoisomerasa de tipo IV, esencial para la replicación, la transcripción, la reparación y la recombinación del ADN bacteriano.<sup>25,26</sup>

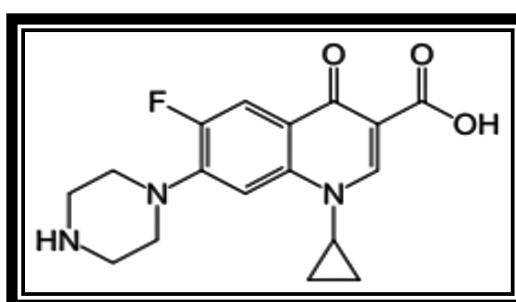
La función de la ADN girasa es destruir el superenrollamiento de la doble cadena de ADN, haciendo que otras enzimas puedan proceder a la replicación propiamente dicha. La bacteria queda incapacitada para dividirse y finalmente muere sin replicarse.<sup>25, 26</sup>

### ✓ Estructura química:

La estructura básica de las quinolonas, es la de un ácido carboxílico en posición 3. Las quinolonas, tienen una estructura química por dos anillos, además de estar un nitrógeno en la posición 1, un grupo carboxilo en la posición 3 y un grupo carbonilo en la posición 4. Así mismo su acción antibacteriana aumenta cuando contiene un átomo de flúor en la posición 6.<sup>25, 26</sup>



Estructura básica de las quinolonas. (1-4-dihidro-4-oxo-piridina-3-ácido carboxílico)



Estructura química del ciprofloxacino

✓ **Espectro bacteriano**

Tiene un espectro bacteriano extremadamente amplio, ya que actúa sobre bacterias gram positivas y gram negativas, aeróbicas y anaeróbicas y se añaden enterobacteriáceas, *Haemophilus* y *Pseudomonas*, activo contra cocos y bacilos grampositivos, *Chlamydia*, *Mycoplasma* y *Mycobacterium*.<sup>25, 26</sup>

✓ **Propiedades farmacocinéticas**

**Biodisponibilidad**

La biodisponibilidad oral es un 80% en relación con la vía endovenosa, como se describe a continuación: las áreas bajo la curva (AUC) tras la administración i.v. de 200 mg de ciprofloxacino durante 60 minutos y la administración oral de 250 mg, los dos administrados cada 12 horas, fueron equivalentes. Igualmente, la infusión i.v. de 400 mg y la administración de 500 mg por vía oral, ambos cada 12 horas, fueron equivalentes, y también, la infusión i.v. de 400 mg cada 8 horas y la administración oral de 750 mg cada 12 horas.<sup>25</sup>

**Distribución**

La unión del ciprofloxacino a las proteínas es baja (20-30%). El gran volumen de distribución en estado estacionario, de 2-3 l/kg de peso corporal muestra que el ciprofloxacino atraviesa fácilmente en los tejidos, en los que alcanza concentraciones que pasan claramente los niveles séricos correspondientes.<sup>25</sup>

**Metabolismo**

Se han notificado pequeñas concentraciones de 4 metabolitos. Han sido identificados como desetilenciprofloxacino (M1), sulfociprofloxacino (M2), oxociprofloxacino (M3) y formilciprofloxacino (M4). M1, M2 y M3 poseen una actividad antibacteriana comparable o inferior al ácido nalidíxico. M4, en la menor cantidad, es ampliamente equivalente a norfloxacino en cuanto a su actividad antimicrobiana. Tras la administración i.v., estos metabolitos se eliminan en un 9,5% por orina y en un 2,6% por heces.<sup>25</sup>

**Eliminación**

Se elimina ampliamente y sin modificar en la orina tanto por filtración glomerular como mediante secreción tubular y el 1% de

la dosis se excreta vía biliar, por tanto, ciprofloxacino se encuentra en la bilis a elevadas concentraciones. El aclaramiento renal se encuentra entre 3 - 5 ml/min/kg l/h/kg y el aclaramiento total corporal entre 8 - 10 ml/min/kg. El aclaramiento no renal de ciprofloxacino se da con el metabolismo hepático, a la secreción trasluminal a través de la mucosa intestinal y a la excreción biliar. La vida media de eliminación de ciprofloxacino es de 3-5 horas, tanto tras la administración oral como la intravenosa. En individuos con función renal alterada, la vida media de eliminación puede llegar hasta 12 horas.<sup>25</sup>

#### **1.3.4.2. Bacterias**

Las bacterias son microorganismos unicelulares que se reproducen por fisión binaria. La mayoría son de vida libre, a excepción de algunas que son de vida intracelular obligada, como Chlamydias y Rickettsias. Tienen los mecanismos productores de energía y el material genético necesarios para su desarrollo y crecimiento. Las bacterias integran el reino procariota (pro de primitivo y cariota de núcleo).<sup>27</sup>

Tienen estructuras como la membrana celular, los ribosomas encargados de la síntesis proteica y el ácido desoxirribonucleico (ADN) portador de la información genética.<sup>27</sup>

#### **1.3.4.3. Clasificación de bacterias**

Las bacterias se pueden clasificar según su aspecto macroscópico y microscópico, por el crecimiento, propiedades metabólicas, antigenicidad, por su genotipo y la capacidad de captar la tinción de Gram.<sup>28</sup>

Entre ellas tenemos:

- A) Gram positivas: La pared celular de las bacterias gram positivas posee una gruesa capa de peptidoglucano, además de dos clases de ácidos teicoicos: anclado en la cara interna de la pared celular y unido a la membrana plasmática, se encuentra el ácido lipoteicoico, y más en la superficie, el ácido teicoico que está anclado solamente en el peptidoglucano (también conocido como mureína)<sup>29</sup>.
- B) Gram negativas: La capa de peptidoglucano de las bacterias gram negativas es delgada, y se encuentra unida a una

segunda membrana plasmática exterior (de composición distinta a la interna) por medio de lipoproteínas. Tiene una capa delgada de peptidoglucano unida a una membrana exterior por lipoproteínas. La membrana exterior está hecha de proteína, fosfolípido y lipopolisacárido<sup>29</sup>.

Las bacterias gram positivas se tiñen primero con cristal violeta y luego se tratan con yoduro para favorecer la retención del colorante. En la decoloración con etanol, se cree que el alcohol contrae los poros de la capa gruesa a modo de malla entrelazada de peptidoglucano, que rodea a la célula y se retiene el complejo colorante yoduro; así las bacterias adquieren color violeta y las bacterias gram negativas tienen una capa de peptidoglucano delgada, con menos enlaces y con poros de mayor tamaño; además es posible que el alcohol extraiga suficientes lípidos de la membrana externa como para aumentar su porosidad y así no retener el violeta de cristal, de forma que las células se tiñen con la safranina empleada como contraste y se ven rojas.<sup>30</sup>

### **1.3.5. Medios de cultivo**

#### **- Agar Mueller Hinton**

El medio Agar Mueller Hinton II cumple los requerimientos de bajos niveles de timina – timidina, y niveles de calcio y magnesio establecidos por la OMS en el Reporte Técnico N° 6733<sup>31</sup>. Esto garantiza un mínimo de interferencias con los resultados del antibiograma, ya que provee una concentración de iones adecuada para determinar la susceptibilidad frente a aminoglucósidos y tetraciclinas en *Pseudomonas* spp., y un bajo contenido de timina – timidina para no inhibir la actividad de las sulfamidas. “Mueller Hinton Agar es un medio estándar utilizado para la prueba de sensibilidad de bacterias aerobias de rápido crecimiento o anaerobias facultativas, como estafilococos, enterococos, miembros de la especie *Enterobacteriaceae* y bacilos gram negativos aerobios (por ej., *Pseudomonas* spp)”<sup>32</sup>.

Esta formulación permite garantizar la exactitud de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (CMI) obtenidas con las cepas control recomendadas por las referencias internacionales.<sup>33, 34</sup>

### 1.3.6. Metabolitos secundarios

Los MS son compuestos de bajo peso molecular que no solamente tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, sino que también, una síntesis activa de MS se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: a) el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico.<sup>35</sup>

## 1.4. MARCO CONCEPTUAL

- **Metabolitos secundarios:** No cumplen ningún rol fisiológico en los vegetales: alcaloides, glicósidos, flavonoides, taninos, aceites esenciales, resinas, etc. Sirven para comparar perfiles químicos y diferenciar entre las diferentes especies vegetales. Carecen de interés diagnóstico detectar clorofila, carotenoides, ácidos fenólicos porque son comunes a todas las plantas.<sup>17</sup>
- **Extracción de metabolitos:** Para obtener los metabolitos secundarios de material vegetal se debe tomar en cuenta que existen diferentes métodos para extraer los principios activos contenidos en dicha planta, los cuales necesitan de un líquido extractivo que va a depender del procedimiento técnico y de la naturaleza química del principio activo. A continuación, se citarán los métodos de extracción más importantes: percolación, maceración, decocción, infusión, digestión, etc.<sup>18</sup>
- **SCREENING:** El tamizaje fitoquímico o screening fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos químicos presentes en una planta y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés.<sup>1</sup>
- **El tamizaje fitoquímico:** Consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacción de color y precipitación. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo.<sup>1</sup>

- **Antibióticos:** “Los antibióticos se definen como compuestos químicos producidos por microorganismos y/o sintetizados comercialmente, capaces de matar a otro microorganismo o de inhibir su crecimiento; y aunque este es su principal objetivo, irónicamente se han presentado casos de resistencia como resultado del manejo indebido de las dosis y automedicación por parte del consumidor”.<sup>19</sup>
- **Actividad antimicrobiana:** Es la actividad de una sustancia que elimina o inhibe el crecimiento de microorganismos, tales como bacterias, hongos o parásitos.<sup>27</sup>
- **Microorganismo gram negativos:** “En el campo de la microbiología, se denominan bacterias gram negativas a los microorganismos que tienen una reacción con la tinción gram en su pared celular diferente a las gram positivas, pues no se tiñen de color azul oscuro o violeta, sino de color rosa. Las bacterias gram negativas no retienen el colorante de cristal violeta durante el proceso de coloración porque presentan una capa muy delgada de peptidoglucano en su pared celular y su capa más externa está cubierta por una membrana de lipoproteínas. Hay muchas especies de bacterias gram negativas, agrupadas en varias familias y existen diferentes formas de clasificarlas según su: forma, óptimo de temperatura, pH en el que se desarrollan, requerimiento de oxígeno para poder permanecer con vida, ésta última clasifica a estos microorganismos en: bacterias aerobias estrictas, bacterias anaerobias estrictas y bacterias anaerobias facultativas”.<sup>20</sup>
- **Microorganismos gram positivos:** En microbiología, se denominan bacterias gram positivas, o bacterias gram-positivas, aquellas bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción de gram. Esta característica química está íntimamente ligada a la estructura de la envoltura celular, por lo que refleja un tipo natural de organización bacteriana. Son uno de los principales grupos de bacterias, y cuando se tratan como taxón se utiliza también el nombre de Posibacteria. La envoltura celular de las bacterias grampositivas comprende la membrana citoplasmática y una pared celular compuesta por una gruesa capa de peptidoglucano, que rodea a la anterior.<sup>29</sup> La pared celular se une a la membrana citoplasmática mediante moléculas de ácido lipoteicoico. La capa de peptidoglucano confiere una gran resistencia a estas bacterias y es la responsable de retener el tinte durante la tinción de Gram.<sup>21</sup>

## 1.5. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

- **Problema General:**

- ✓ ¿Presentará actividad antimicrobiana el extracto etanólico de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma” frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos?

- **Problemas Específicos:**

- ✓ ¿Qué tipo de metabolitos secundarios presenta el extracto etanólico de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma”?
- ✓ ¿Presenta el extracto de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma” actividad antimicrobiana frente microorganismos Gram positivos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*?
- ✓ ¿Presenta el extracto de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma” actividad antimicrobiana frente microorganismos gram negativos: *Escherichia coli*, *Salmonella tiphy*?

**Aspectos a considerar:**

Si bien el objetivo del presente estudio es determinar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de hojas de *Senecio nutans*, debemos tener en cuenta que existe un amplio espectro de microorganismos tanto gram positivos, como gram negativos, y dentro de estos solo se trabajara con 2 especies de cada clasificación considerando la factibilidad de adquisición; así como algunos antecedentes que de uso en la medicina tradicional.

## 1.6. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

### 1.6.1. General

- ✓ Comprobar la actividad antimicrobiana frente microorganismos Gram positivos y Gram negativos del extracto etanólico de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma”.

### 1.6.2. Específicos

- ✓ Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto obtenido de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma”.

- ✓ Determinar la concentración efectiva del extracto de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma” frente microorganismos Gram positivos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*.
- ✓ Determinar la concentración efectiva del extracto de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma” frente microorganismos Gram negativos: *Escherichia coli*, *Salmonella tiphy*.

## 1.7. HIPOTESIS Y VARIABLES

### 1.7.1. Hipótesis General:

- ✓ El extracto etanólico de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma” posee actividad antimicrobiana frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos.

### 1.7.2. Hipótesis Específicas:

- ✓ Los metabolitos secundarios predominantes en el extracto etanólico de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma” son flavonoides, alcaloides y terpenos.
- ✓ El extracto etanólico de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma” posee actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*.
- ✓ El extracto etanólico de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma” posee actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Salmonella tiphy*.

## II. ESTRATEGIA METODOLOGÍA

### 2.1. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

#### 2.1.1. Tipo: Básica

Se caracteriza por su interés en la aplicación, utilización y consecuencias prácticas de los conocimientos. La investigación aplicada busca el conocer para hacer, para actuar, para construir y para modificar.

#### 2.1.2 Nivel: Descriptivo y Explicativo

- Descriptivo: Consiste en llegar a conocer las situaciones, costumbres y actitudes predominantes a través de la descripción exacta de las actividades, vamos a examinar características del problema escogido.
- Explicativo: Se encarga de buscar el porqué de los hechos mediante el establecimiento de relaciones causa-efecto.

#### 2.1.3. Diseño de investigación: Experimental

Se trata de una investigación en la cual se utiliza una colección de diseños en la manipulación de las pruebas controladas para comprender los procesos causales. En general, en este caso la variable relacionada a la concentración (del extracto) es manipulada para determinar su efecto sobre una variable dependiente (el efecto antibacteriano). Es un experimento en donde el investigador manipula una de las variables y controla/aleatoriza el resto de las variables. Cuenta con un grupo de control.

Porque se evaluó un fenómeno dado introduciendo elementos que pueden modificar el comportamiento de las variables en estudio, los que fueron medidos en determinados momentos.

## 2.2. VARIABLES

- **Variable independiente**

Extracto etanólico de las hojas de *Senecio nutans*, chachacoma.

- **Variable dependiente**

Actividad antimicrobiana del extracto etanólico de las hojas de *Senecio nutans*, chachacoma.

## 2.3. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	INDICADOR	ÍNDICE
Extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio nutans</i> "chachacoma".	Metabolitos secundarios.	Reacción de coloración y precipitación. Concentración de extracto.
Actividad antimicrobiana del extracto de las hojas de <i>Senecio nutans</i> "chachacoma".	Inhibición microorganismos Gram positivos Inhibición microorganismos Gram negativos.	Diámetro de halo de inhibición. Diámetro de halo de inhibición.

## 2.4. POBLACIÓN Y MUESTRA

La población en estudio: las plantas de la especie *Senecio nutans* "chachacoma", que crece de forma silvestre en el departamento de Ayacucho.

La muestra en estudio: extracto etanólico obtenido de las partes aéreas de la especie *Senecio nutans* "chachacoma" recolectada durante el mes de noviembre del 2019, en el anexo de San Martín de Palcca, distrito de Chipao, provincia de Lucanas, departamento de Ayacucho.

## **2.5. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.**

### **2.5.1. MATERIALES Y EQUIPOS**

#### **2.5.1.1. Materiales de laboratorio**

- Papel Kraff
- Papel Filtro
- Vasos Precipitados. 250 ml, 500 ml
- Matraz de 500 ml
- Pipetas de 10 ml, 5 ml, 1ml
- Tubos de Ensayo.
- Gradilla
- Espátula
- Bagueta
- Luna de Reloj
- Pera de Bromo
- Pinzas
- Embudo
- Propipeta
- Placa de porcelana
- Fiola
- Probeta
- Algodón
- Frascos PET
- Asa de siembra
- Placas Petri

#### **Material de Limpieza**

- Mandiles
- Toallas
- Detergente

#### **2.5.1.2. Equipos**

- Estufa
- Molino
- Balanza analítica
- Rotavapor
- Potenciómetro
- Agitador magnético
- Plancha calefactora

- Incubadora
- Cuenta colonia
- Cabina de seguridad
- Autoclave
- Espectrofotómetro

#### **2.5.1.3. Reactivos**

- Gelatina
- Cloruro de sodio
- Tricloruro férrico
- Ácido clorhídrico
- Magnesio
- Etanol 96°
- Cloruro de mercurio
- Ninhidrina
- Agar Mueller Hinton
- Cloruro de bario
- Ácido sulfúrico
- Alcohol 70°
- Solución de hipoclorito sódico

#### **2.5.1.4. Material Biológico:**

Extracto etanólico de hojas de *Senecio nutans* “chachacoma”.

Cepas de microorganismos gram negativos: *Escherichia coli*, *Salmonella tiphy*.

Cepas de microorganismos gram positivos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*.

#### **2.5.2. MÉTODOS DE RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA MUESTRA VEGETALES**

La especie estudiada *Senecio nutans*, se recolectó en el anexo de San Martín de Pallca, distrito de Chipao, provincia de Lucanas, departamento de Ayacucho, manualmente; durante las primeras horas de la mañana para la preservación de los principios activos, luego la planta se colocó en bolsas de papel kraft para ser transportada a la ciudad de Ica.

El método de desecación se hizo a una temperatura de 40°C para no variar los metabolitos secundarios presentes en las hojas de la especie en estudio. Seguidamente se procedió con la trituración (manual) consiguiendo fracciones pequeñas y finalmente se realizó una molienda con un molino manual para ponerlas en frasco ámbar de boca ancha en donde se mantuvo correctamente rotulado hasta la fecha de los exámenes.

### **TAMIZAJE FISICOQUÍMICO**

Se tomó 500 g de las hojas secas y trituradas de la especie *Senecio nutans* “chachacoma”, llevándose a maceración con alcohol de 70° por 15 días, con agitación periódica para potenciar la extracción de los metabolitos secundarios, el macerado se filtró y luego se obtuvo un extracto seco mediante uso de un rotavapor.<sup>1</sup>

### **DETERMINACIÓN DE GRUPOS FUNCIONALES**

Divididas las fracciones del extracto con solventes de diferentes polaridades, se llevó a realizar reacciones de coloración o precipitación para identificar grupos funcionales y metabolitos secundarios presentes en el extracto seco de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma”.

#### **1. DETECCIÓN DE ALCALOIDES**

Se tomó 2,7184 g del extracto concentrado y se extrajo con 50 ml ácido clorhídrico al 5% y luego se alcalinizó con 20 ml de hidróxido de sodio al 20%. Luego añade 50ml de cloroformo (CHCL<sub>3</sub>) se separan en dos fases y para obtener una de las fases que es el extracto clorofórmico se pasa por una pera de bromo, quedando en la pera una fase acuosa clorofórmica y en un recipiente el extracto clorofórmico.<sup>1</sup>

A la fase acuosa nuevamente se le añade (CHCL<sub>3</sub>) y EtOH en relación de 3:2 respectivamente 30ml y 20ml. La nueva mezcla se separa en dos fracciones y nuevamente se pasa por una pera de bromo para separar, una es el extracto clorofórmico etanólico y recolectamos cloroformo etanólico.

De ambos extractos recolectados extrajimos nuevamente con ácido clorhídrico 5% siendo una solución ácida y se filtró.<sup>1</sup>

Se utilizó una placa de cavidades y añade en grupos el extracto clorofórmico del clorofórmico etanólico y se le hizo las siguientes pruebas:

- ✓ Dragendorff: añadir de 2-4 gotas y observar precipitado anaranjado.
- ✓ Mayer: Añadir 2 - 4 gotas y observar precipitado blanco.

## **2. DETECCIÓN DE TRITERPENOS Y/O ESTEROIDES**

Reacción de Liebermann Burchard.- a unos tres miligramos del extracto se disuelve en 3 mililitros de ácido acético se agita y luego se adiciona 3 ml de una solución de anhídrido acético: ácido sulfúrico en la proporción 50:1 lentamente por la paredes de un tubo de ensayo. Una coloración de verde azul es una reacción positiva.<sup>1</sup>

## **3. DETECCIÓN DE FLAVONOIDES**

Reacción de Shinoda.- En un tubo de ensayo agregué 20 gotas del extracto etanólico de estudio, posteriormente agregué limaduras de Mg y 3 gotas de HCl concentrado. Observé el cambio de color. La reacción resultó ser positiva porque viró a tonos de color rojo-anaranjado.<sup>1</sup>

## **4. DETECCIÓN DE ANTRAQUINONAS**

Reacción de Bornträger-Kraus.- Fue extraído con una solución etanólico (1:7), al cual se adicionó agua oxigenada y ácido sulfúrico y calentándola, en estas condiciones se hidrolizan los enlaces glicosidicos oxidándose las antranas y los antranoles hasta llegar antraquinonas las cuales fueron extraidas y agitadas en una solución de hidróxido de sodio al 5% e hidróxido de amonio al 2%.<sup>1</sup>  
La reacción fue positiva pasando de rosado a un rojo intenso.

## **5. DETECCION DE SAPONINAS**

Prueba de espuma. - En dos tubos de ensayo se agitó 2.5 ml del extracto por un minuto. Se dejó reposar 15 minutos y observar la formación de espuma. Se considera negativa si la altura de la espuma es menor de 5 mm.<sup>1</sup>  
La muestra en estudio resultó positiva.

## 6. DETECCIÓN DE TANINOS

Reacción de Cloruro Férrico. - Se colocó 0,5 ml de la fracción A en un tubo de ensayo y se le añadió una gota de disolución acuosa de FeCl<sub>3</sub> 1%.<sup>1</sup>

La reacción resultó ser positiva cambia a colores como azul-negro, verde o azul verdoso.

## 7. DETECCIÓN DE SESQUITERPENLACTONAS Y CUMARINAS

Reacción de Baljet.- a unos mg de extracto se le adiciona de 3 a 4 gotas de la solución compuesta por ácido pícrico al 1% en etanol e hidróxido de sodio al 10%, la reacción es positiva si da una coloración de anaranjado a roja oscura.<sup>1</sup>

## 8. DETECCIÓN DE CARDIOTÓNICOS

Reacción de Kedde, Se siembra en una placa de cromatografía de capa fina de silicagel F254 y se desarrolla con una fase móvil de tolueno: hexano: etanol en la proporción 4:4:2 y luego se revela a una lámpara UV.<sup>1</sup>

## 2.6. PROCESO DE EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

### ➤ OBTENCION DE ESPORAS DE BACTERIAS Y CULTIVO DE LEVADURAS

Las esporas de *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* se obtuvieron de los cultivos de cepas certificadas proporcionadas por el laboratorio Certilab AP SAC de la ciudad de Lima.

### ➤ PREPARACION DE INÓCULOS

Preparación del inóculo. - Las bacterias fueron activadas sembrándolas en 2,5 ml de Caldo Nutritivo estéril e incubándolos a 37 °C durante 24 horas. Los microorganismos serán diluidos a una concentración equivalente a 0,5 de la escala de Mac Farland la cual equivale a una concentración de 10<sup>8</sup> UFC/ml cultivadas en medio de cultivo Mueller Hinton.<sup>19</sup>

### ➤ EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

- **Método:** Método en pozos modificados de agar.

- **Fundamento:**

Se embebió completamente un hisopo estéril del inóculo estandarizado al 0,5 de la escala de Mac Farland y se sembró el inóculo en agar Mueller Hinton estriándose con un hisopo estéril en forma paralela y bien compacta abarcando toda la superficie del agar repitiendo el proceso rotando la placa 60° en dos oportunidades más y dejando secar 5 minutos antes de realizar los pozos con la cuchareta sacabocados de 6 mm, se vertió en cada uno de ellos 50 uL de extracto de *Senecio nutans* de diferentes concentraciones donde se dejó reposar por un tiempo de 30 minutos y se incubó a 37°C por 24 horas; Se realizó la lectura de sensibilidad igual que en el método Kirby Bauer.<sup>18</sup>

La lectura de la prueba de sensibilidad se hizo por medio de una regleta de medición y se interpretaron los resultados como sensible (S), intermedio (I) o resistente(R) (NCCLS, 2012).<sup>19</sup>

- **Preparación de extractos**

Se obtuvo 1 g de extracto seco se llevó a un volumen de 10 ml con etanol del 95 %, se llamó Extracto Concentrado. A partir de este extracto se preparó unas diluciones 80 mg/ml, 60 mg/ml y 45 mg/ml y 33,7 mg/ml Estas concentraciones (a, b, c y d) se utilizaron para evaluar la actividad contra los diferentes microorganismos. Para el caso de *E coli* y *B. Cereus* se tuvo que recurrir a concentraciones menores (20, 10, 5 y 2,5 mg/ml respectivamente).<sup>37</sup>

- **Evaluación de la actividad antibacteriana.**

Para evaluar la actividad antibacteriana se empleó el método de por pozos modificados de agar se determinará la actividad frente *Echerichia coli*, *Salmonella tiphy*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*.

Los resultados se evaluaron mediante la lectura en milímetros de diámetro del halo de inhibición del crecimiento de los microorganismos con un vernier calibrado.<sup>38</sup>

Primeramente se hizo el frotis del inóculo sobre cada una de las superficies.

Posteriormente, hice los pozos sobre la superficie de los agares con ayuda de un sacabocados estéril de 6 mm de diámetro, y en cada uno de ellos se vertieron 25 µL de cada uno de los extractos, estándares y blancos por triplicado. Se dejó reposar por 30 minutos. Posteriormente,

se incubaron y leyeron las placas de igual forma que el método KirbyBauer.<sup>39</sup>

El inóculo tuvo una concentración de  $10^8$  organismos/ml. equivalente al estándar N° 0,5 de MacFarland. Con un hisopo estéril se sumergió en el inóculo estandarizado al 0.5 de la escala de McFarland y se llevó a siembra en agar Mueller Hinton estriándose en forma paralela y compacta abarcando toda la superficie del agar, repitiendo el proceso rotando la placa  $60^\circ$  en dos oportunidades a más y dejando secar durante 5 min antes de proceder haciendo los pozos.<sup>39-40</sup>

$$\% \text{ de inhibición} = (\phi \text{ de la muestra} - \phi \text{ del blanco}) / (\phi \text{ del control} - \phi \text{ del blanco}) \times 100$$

**Dónde:** % = porcentaje y  $\phi$  = diámetro<sup>16, 24</sup>.

## **2.7. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN**

### **2.7.1. Recolección de datos analíticos**

Se procedió al registro de la información analítica en la hoja de ensayo o cuaderno de trabajo de acuerdo a los métodos aplicados donde se describen los resultados luego de procesamiento correspondiente.

### **2.7.2. Procesamiento de datos**

El análisis estadístico después de extraer los promedios pertinentes se llevara a cabo utilizándose las pruebas de Mann-Whitney y Kruskal-Wallis.<sup>41</sup>

## **2.8. ASPECTOS ÉTICOS**

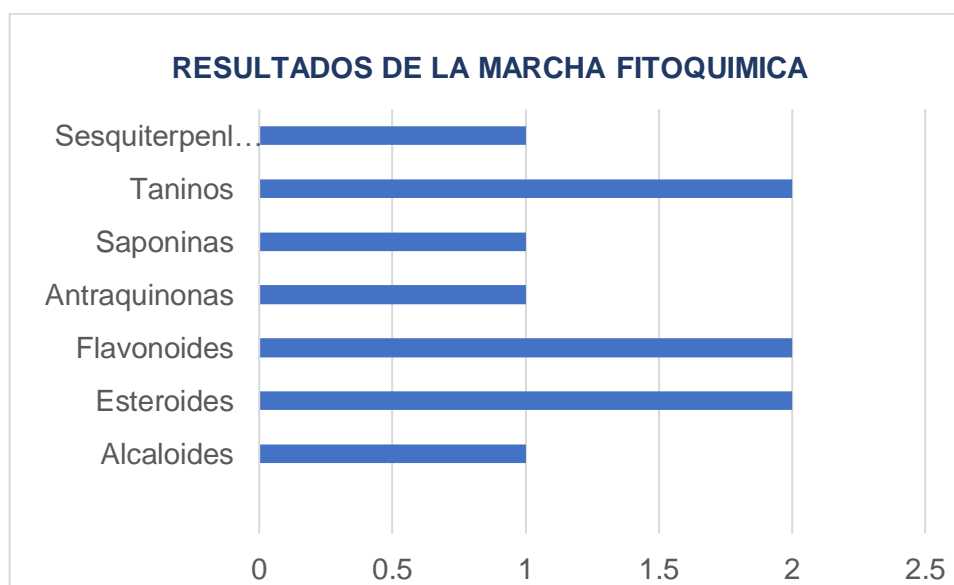
En esta dimensión cada una de las fases del presente proyecto se realizó teniendo en cuenta siempre la ética científica que involucra no plagiar, plena honestidad intelectual en referencia a las fuentes de información, investigación íntegra, reconociendo el trabajo de otros, enseñar que los resultados de las investigaciones no se deben modificar, rigor científico, llegar al fondo de los resultados, informar los datos experimentales de forma real y otorgar entregar resultados legítimos.

### III. RESULTADOS

Tabla N° 1. Resultados marcha fitoquímica

Grupos de metabolitos	Reacción	Resultados	Observación
Alcaloides	Dragendorff:	+	Reacción lenta
	Mayer	+	
	Hager	+	
Esteroides/triterpenos	R. Lieberman Burchard	++	Coloración verde azulada. En CCF se presenta 2 manchas
Flavonoides	R. Shinoda	++	Coloración rojovino
Antraquinonas		+	
Saponinas	Espuma	+	
Taninos	Gelatina	++	formación de precipitado
	NaCl	++	
Sesquiterpenlactonas y cumarinas:	CCF	+	Dos manchas con Rf = 0,60 y 0,44

Gráfico N° 1: Resultados marcha fitoquímica.



**Tabla N° 2. Actividad Antimicrobiana frente a gram positivas: *Bacillus cereus***

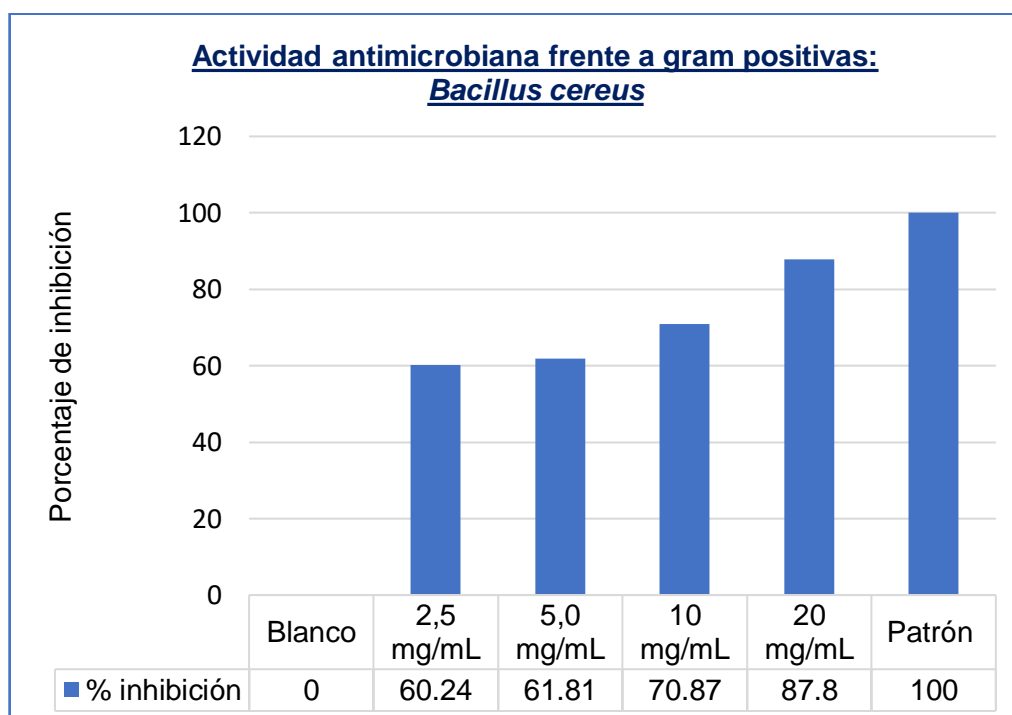
Concentración Experimental	R1	R2	R3	Promedio de halo (cm)	% inhibición
Blanco	0	0	0	0	0
2,5 mg/ml	1,49	1,51	1,58	1,53	60.24
5,0 mg/ml	1,61	1,48	1,63	1,57	61.81
10 mg/ml	1,73	1,77	1,89	1,80	70.87
20 mg/ml	2,0	2,23	2,46	2,23	87.80
Patrón	2,46	2,56	2,61	2,54	100

**Blanco:** medio de dilución

**Patrón:** ciprofloxacino

**% inhibición:** es en relación frente al control positivo.

**Gráfico N° 2: Actividad antimicrobiana frente a gram positivas: *Bacillus cereus*.**



**Tabla N° 3. Actividad antimicrobiana frente a gram positivas: *Staphylococcus aureus***

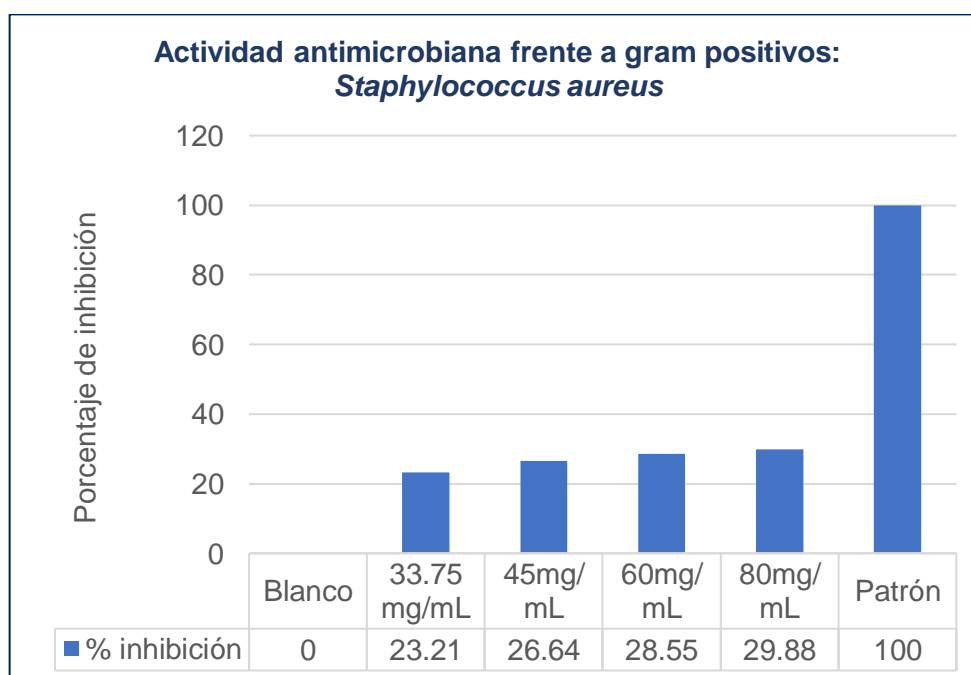
Concentración Experimental	R1	R2	R3	Promedio de halo (cm)	% inhibición
Blanco	0	0	0	0	0
33,75 mg/ml	1,44	1,38	1,35	1,39	23,21
45 mg/ml	1,60	1,63	1,54	1,59	26,64
60 mg/ml	1,75	1,70	1,70	1,71	28,55
80 mg/ml	1,78	1,76	1,84	1,79	29,88
Patrón	5,95	6,03	5,98	5,99	100

**Blanco:** medio de dilución

**Patrón:** ciprofloxacino

**%inhibición:** es en relación frente al control positivo.

**Gráfico N° 3: Actividad antimicrobiana frente a gram positivas: *Staphylococcus aureus*.**



**Tabla N° 4. Actividad antimicrobiana frente a gram negativas: *Escherichia coli*.**

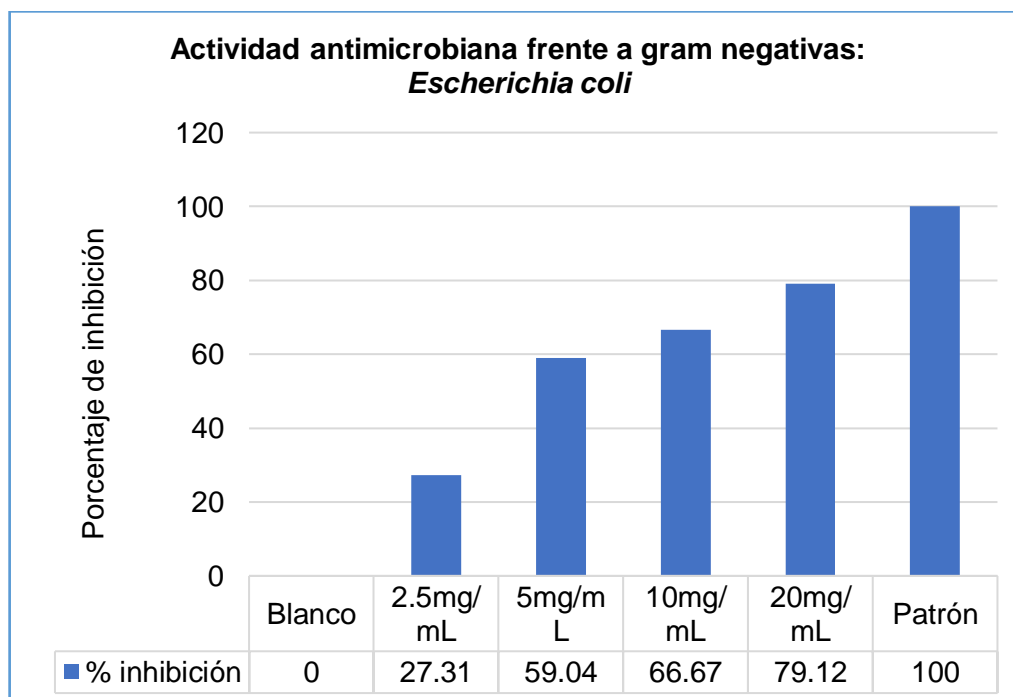
Concentración Experimental	R1	R2	R3	Promedio de halo (cm)	% inhibición
Blanco	0	0	0	0	0
2,5 mg/ml	0,71	0,68	0,64	0,68	27,31
5 mg/ml	1,49	1,45	1,43	1,47	59,04
10 mg/ml	1,60	1,68	1,70	1,66	66,67
20 mg/ml	2,08	1,96	1,86	1,97	79,12
Patrón	2,52	2,46	2,50	2,49	100

**Blanco:** medio de dilución

**Patrón:** ciprofloxacino

**% inhibición:** es en relación frente al control positivo.

**Gráfico N° 4: Actividad antimicrobiana frente a gram negativas: *Escherichia coli*.**



**Tabla N° 5. Actividad antimicrobiana frente a gram negativas: *Salmonella tiphy***

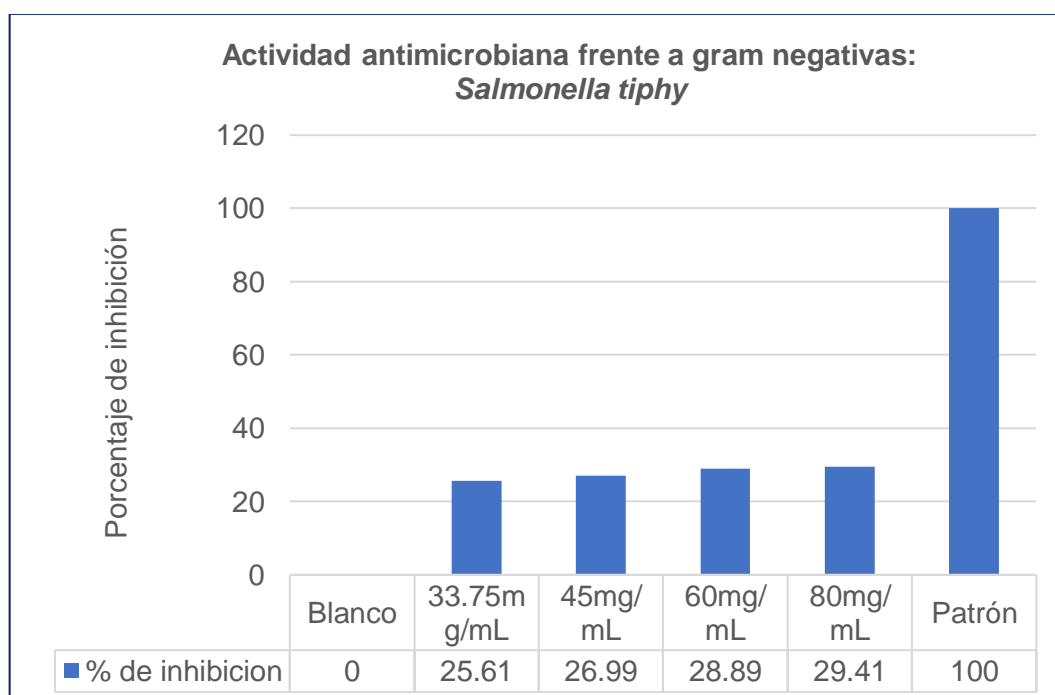
Concentración Experimental	R1	R2	R3	Promedio de halo (cm)	% inhibición
Blanco	0	0	0	0	0
33,75 mg/ml	1,50	1,44	1,52	1,48	25,61
45 mg/ml	1,53	1,60	1,57	1,56	26,99
60 mg/ml	1,63	1,70	1,67	1,67	28,89
80 mg/ml	1,75	1,65	1,69	1,70	29,41
Patrón	5,80	5,87	5,68	5,78	100

**Blanco:** medio de dilución

**Patrón:** ciprofloxacino

**%inhibición:** es en relación frente al control positivo.

**Gráfico N° 5: Actividad antimicrobiana frente a gram negativas: *Salmonella tiphy*.**



#### IV. DISCUSIÓN

En la tabla 1, podemos observar los resultados del extracto etanólico después de screening según la marcha número dos descrita por Lock 1997, dió positivo a una serie de metabolitos secundarios a las diferentes reacciones de precipitación y/o coloración entre los que podemos destacar los compuestos de tipos esteroides y/o triterpenos, flavonoides, alcaloides, antraquinonas, saponinas, taninos y sesquiterpenlactonas y cumarinas coincidiendo con lo reportado por De Feo et al., 2003 quien reportó sabineno y  $\alpha$ -terpineno en la misma especie de la región de Arequipa y Juárez et al., 2013 quien reporta  $\alpha$ -felandreno y p-cimeno para la misma especie proveniente de la zona de Lima; de igual manera Murillo y Soncco 2017 reportan methyl cinnamate, 1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-thymol de la región de Patahuasi - Arequipa, ya que estos compuestos son hidrocarburos monoterpénicos y sesquiterpenos con la salvedad que estos fueron determinados en los aceites de las partes aéreas. Asimismo, Nuram K, et al., 2010, en los aceites esenciales de la flor, hoja y tallo frescos de la especie *Senecio pandurifolius* aislaron principalmente hidrocarburos sesquiterpénicos, los cuales fueron  $\gamma$ -curcumeno en tallo,  $\alpha$ -cupreneno en flor, y  $\alpha$ -zingibereno en hoja, lo que confirma que en una misma especie los metabolitos secundarios pueden variar en tipo y cantidad dependiendo de la zona y época de cosecha, de igual manera muchos de estos tipos de metabolitos o compuestos bioactivos han sido reportado en otras especies del mismo género.<sup>12-15</sup>

Considerando el incremento de resistencia a los antibióticos que se reporta cada día, lo cual es un problema clínico de interés general se hace necesario la búsqueda de alternativas, en este contexto consideramos el empleo de extractos de vegetales que contengan metabolitos antimicrobianos que pueden ser una posible solución. En este estudio, el extracto etanólico de las partes aéreas de la especie *Senecio nutans* mostró buena actividad contra *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* bacterias gram positivas. Con respecto al efecto sobre el *Bacillus cereus* se puede observar según la tabla 2 que presenta un considerable porcentaje de inhibición sobre esta bacteria hasta en las concentraciones más bajas ensayadas superando al control, este resultado según las referencias consultadas solo se puede comparar con el reportado por Alderete H. 2017, para el ensayo de aceite esencial de parte aéreas de la especie en *Bacillus cereus* de origen ambiental, donde indica una muy buena capacidad de inhibición para esta bacteria. En cuanto a la actividad antimicrobiana frente al *Staphylococcus aureus* según a tabla 3, mostró una zona de inhibición de 17,9 mm a la concentración de 80 mg/ml de extracto que comparando frente al patrón (ciprofloxacino) le corresponde un porcentaje de inhibición de 29,88. Los reportes de la actividad de los aceites de las partes aéreas de esta especie frente al *Staphylococcus aureus* son diversos; así, Juárez et al., 2013

reporta una débil actividad , más se debe tener en cuenta que en este caso fue la especie *S. epidermidis* , Murillo y Soncco 2017 reportan una moderada actividad y Alderete et al., 2007, reporta escasa actividad, todos estos estudios fueron hechos con aceites esenciales, en el único caso referenciado con extracto etanólico de Mamani reportó una inhibición de 39,7% pero en cepas aisladas de pacientes con infecciones urinarias. Consideramos que en el caso de los extractos etanólicos de las partes aéreas como en el presente estudio al igual que de Mamani se debe producir un efecto sinérgico de algunos componentes en el extracto, que no se encuentran en los aceites, sin embargo, el mecanismo antibacteriano real no está documentado, pero puede ser atribuido a la presencia de los metabolitos secundarios encontrados.

Los resultados de la actividad antibacteriana del extracto frente a las bacterias gram negativas, fueron diversos. En la tabla 4 se puede observar el efecto frente a la *Escherichia coli*, que presentó un halo de inhibición de 19,7 mm que comparado frente al patrón utilizado representó un porcentaje de inhibición de 79,12. Diversos autores como Juárez et. al., 2013, Alderete et. al. 2017, reportan una débil y escasa actividad, y otros reportan que no presentan actividad frente al grupo de bacterias gram negativas ensayadas; sólo Murillo y Soncco reportan una actividad moderada. Con respecto a la actividad frente a *Salmonella tify* presentó un halo de inhibición de 17 mm; lo que equivale a un porcentaje de inhibición de 29,41 frente al patrón de referencia, este valor no pudo ser comparado puesto que en ninguna de las referencias consultadas se ensayó extractos de esta especie o género vegetal frente a este microorganismo.

De lo ensayado podemos inferir que el extracto etanólico de la especie *S. nutans* presenta actividad antimicrobiana para ambos grupos de bacterias (gram positivos-gram negativos).

## V. CONCLUSIONES

- En el extracto etanólico de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma” se pudo identificar metabolitos secundarios del tipo: alcaloides, esteroides y/o triterpenos, flavonoides y sesquiterpenlactonas principalmente.
- El porcentaje de inhibición efectivo del extracto de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma” frente microorganismos Gram positivos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* fue de 29,88 y 87,80 respectivamente.
- El porcentaje de inhibición efectivo del extracto de las hojas de *Senecio nutans* “chachacoma” frente microorganismos Gram negativos: *Escherichia coli*, *Salmonella tiphy* fue de 79,12 y 29,41 respectivamente.

## VI. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios que permitan identificar los posibles metabolitos secundarios responsables de las actividades determinadas, considerando que la misma especie han presentado diferentes metabolitos.
- Determinar la Concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de las partes aérea de la especie *Senecio nutans* para las bacterias estudiadas.
- Ampliar el espectro de bacterias en las cuales se realicen los ensayos antimicrobianos y antimicóticas, para comprobar el uso tradicional de estas especies en diferentes zonas del país.

## VII. FUENTES DE INFORMACION

1. Lock O. Investigación fitoquímica: métodos en el estudio de productos naturales. PUCP. Fondo Editorial., Lima. 1988.
2. Rocha C, Reynolds N, Simons M. Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. Revista Peruana de Medicina experimental y salud Publica.
3. Pino N, Stashenko E. Validación antibiótica de plantas medicinales del noroeste de Colombia contra *Staphylococcus aureus*. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas, 2009: 8 (2), 145 – 150.
4. Marcos A, Mendieta L. 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. Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica. 2015.
5. Nuñez K, Romero T. Elaboración de una forma farmacéutica semi-sólida con actividad antiinflamatorio a partir del extracto etanólico de hojas de *Senecio nutans* Schulz Bipontinus “Chocra” Tesis. Universidad Nacional san Luis Gonzaga. Facultad de Farmacia y Bioquímica. 2015.
6. Vargas A. Contenido de flavonoides y fenoles totales en hojas de tres especies del género *Senecio* y determinación de su actividad antioxidante in vitro. Ayacucho, Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica. 2018.
7. De Feo V, Urrunaga E, Urrunaga R, Senatore F. Chemical composition of essential oils of *Senecio nutans* Sch.-Bip. (Asteraceae) (consultado marzo 2019) published: 07 April 2003 <https://doi.org/10.1002/ffj.1204>
8. Juarez A, Joe Guerriero J, De Martino L , Senatore F & De Feo V. Chemical Composition and Antibacterial Activity of *Senecio nutans* Essential Oil Journal of Essential Oil Bearing Plants 2007. Volume 10, - Issue 4.
9. Murillo B, Soncco C. Evaluación del efecto antimicrobiano del aceite esencial de chacha koma (*Senecio nutans* Schultz-Bip) de Patahuasi-Arequipa durante el almacenamiento de la hamburguesa de Carne de Vacuno. Tesis. Universidad Nacional San Agustín de Arequipa. 2017.
10. Alderete H. Actividad antimicrobiana, antioxidante in vitro y determinación de la composición química de tres aceites esenciales del género *Senecio* del Perú. Tesis Universidad Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica. 2017.

11. Mamani D. Actividad antibacteriana de los extractos alcohólicos de *Senecio* spp (Chachacoma) en el crecimiento de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp*, *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus sp*. Tesis título. Universidad Nacional del Altiplano Facultad de Ciencias Biológicas. 2017.
12. Kahrman N, Tosun G, Terzioğlu S, Alpay S and Yaylı N. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils from the Flower, Leaf, and Stem of *Senecio pandurifolius*. *Rec. Nat. Prod.* 5:2 (2011) 82-9.
13. Benites J, Bravo F, Rojas M, Fuentes R, Moiteiro C, Venâncio F. Composition and antimicrobial screening of the essential oil from the leaves and stems of *Senecio atacamensis* phil. from Chile. *J. Chil. chem. soc.*, 2011: 56, n°2, págs.: 712-714.
14. Villagran C., Castro V, Ciencia indígena de los Andes del norte de Chile: Programa Interdisciplinario de Estudios en Biodiversidad (PIEB), Universidad de Chile, pag 211-212, ed universitaria 2004.
15. Linares E. & Benavides A., Flora silvestre del transecto Yura-Chivay, Departamento de Arequipa. *Boletín de Lima* N° 100:211-254, 1995.
16. Matta M. Screening fitoquímico, antimicrobiano y antioxidante de plantas pre-andinas y del altiplano chileno” Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas 2009.
17. Extracción: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v29n4/a52v29n4.pdf>
18. [NCCLS] National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2012. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. M02-A11. 11th ed. Wayne, USA: NCCLS. 76 p.
19. Mandell GL. Introducción a las enfermedades bacterianas. En: Wyngaarden JB, Smith LIH, Bennet JC ed. Cecil. Tratado de Medicina Interna, 19a ed. México DF: Interamericana-Mc Graw- -Hill, 1994. vol 2, part 20, cap 283:1824.
20. Los principales grupos bacterianos. En: Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Manual de Microbiología Médica. México DF: El Manual Moderno, 1988:30-5.
21. Extracción: <https://www.guia-abe.es/gestion/includes/html4pdf.php?id=descripcion-general-de-los-principales-grupos-de-farmacos-antimicrobianos-antibioticos>
22. Olarte-Luis T, Cáceres-Galíndez D y Jorge Alberto Cortés JA. Nuevas cefalosporinas. *Rev Chilena Infectol* 2018; 35 (5): 465-475.
23. Agencia española de Medicamentos y Productos Sanitarios. Fichas técnicas de medicamentos [en línea]. Disponible en <https://cima.aemps.es/cima/publico/home.html>

24. Extracción: Vademécum Internacional, España Disponible en <http://www.vademecum.es/>.
25. Extracción: [https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/62765/62765\\_ft.pdf](https://cima.aemps.es/cima/pdfs/es/ft/62765/62765_ft.pdf)
26. Versalovic J, Carroll KC, Funke G, et al: manual of clinical microbiology, Ed 10, Washington, DC, 2011, American Society for Microbiology Press.
27. Prescott, Harley, Klein. Microbiología. Mc Graw-Hill Interamericana de España. 4ª ed. 1999.
28. Extracción. Disponible en: <https://es.slideshare.net/chiquilover/bacteria-gram-positiva>
29. Extracción disponible: [http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/70467/secme-29089\\_1.pdf?sequence=1](http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/70467/secme-29089_1.pdf?sequence=1)
30. Murray P., Rosenthal k., Microbiología Medica de España. 8ª ed. 2013.12:106-118.
31. CLSI - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute. Search for latest version at [www.clsi.org](http://www.clsi.org)
32. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.
33. Search for latest version at <http://www.eucast.org>.
34. C.L.S.I.-M32-P. Evaluation of Lots of Dehydrated Mueller-Hinton Broth for Antimicrobial Susceptibility Testing; Proposed Guideline
35. Extracción disponible: <https://www.redalyc.org/pdf/612/61221317.pdf>
36. OMS. Resistencia a los antibióticos. 5 febrero de 2018. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/resistencia-a-los-antibi%C3%B3ticos>
37. Pérez-Alonso N, Jiménez E. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro* *Biotecnología Vegetal 2011. Vol. 11, No. 4: 195 – 211.*
38. Croteau, R., Kutchan, T.M., and Lewis, N.G. 2000. Natural products (Secondary metabolites). pp. 1250-1318. In: B. Buchanan., W. Grissem., and R. Jones R. (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Vol. 24. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. 1367 p.
39. Los microorganismos y los antibióticos. Disponible en: <https://es.slideshare.net/valeriapazmino12/antibioticos-52654109>

40. Mollinedo M. Bacterias Gram Negativas. Rev. Act. Clin. Med 2014. v.49 La Paz Nov.

41. Álvarez R. Estadística multivariante y no paramétrica con SPSS. Aplicación a las ciencias de la salud. Madrid. Díaz de Santos 1.995.

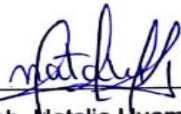
Ica, 13 de abril de 2022.



DR. FELIPE A. SURCO LAOS  
D.N.I. 21466230



DRA. MARITZA A. ROCA LAOS  
D.N.I. 22067405



Bach. Natalia Huamani Gutiérrez  
D.N.I. 70117677

**ANEXO N° 1: MATRIZ DE CONSISTENCIA:** Actividad antimicrobiana frente microorganismos gram positivos y negativos del extracto etanólico de *Senecio nutans* “chachacoma”

PROBLEMAS	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
<p><b>Problema General:</b> ¿Presentará actividad antimicrobiana el extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio nutans</i> “chachacoma” frente a microorganismos gram positivos y gram negativos?</p> <p><b>Problemas Específicos:</b> ¿Qué tipo de metabolitos secundarios presenta el extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio nutans</i> “chachacoma”? ¿Presenta el extracto de las hojas de <i>Senecio nutans</i> “chachacoma” actividad antimicrobiana para microorganismos gram positivos: <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Bacillus cereus</i>? ¿Presenta el extracto de las hojas de <i>Senecio nutans</i> “chachacoma” actividad antimicrobiana para microorganismos gram negativos: <i>Escherichia coli</i>, <i>Salmonella tiphy</i>?</p>	<p><b>General:</b> Comprobar la actividad antimicrobiana frente microorganismos gram positivos y negativos del extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio nutans</i> “chachacoma”.</p> <p><b>Específicos:</b> Identificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto obtenido de las hojas de <i>Senecio nutans</i> “chachacoma”. Determinar la concentración efectiva del extracto de las hojas de <i>Senecio nutans</i> “chachacoma” frente microorganismos gram positivos: <i>S. aureus</i>, <i>B. cereus</i>. Determinar la concentración efectiva del extracto de las hojas de <i>Senecio nutans</i> “chachacoma” frente microorganismos gram negativos: <i>Escherichia coli</i>, <i>Salmonella tiphy</i>.</p>	<p><i>Senecio nutans</i> es un arbusto aromático, perennifolio de ramas densamente hojosas. En infusión se utiliza para dolores estomacales, mal de altura (soroche o puna), para la fiebre, tos y resfriado fuerte, pero refieren que un exceso de esta planta puede causar la ceguera. Los antibióticos son como compuestos químicos producidos por microorganismos y/o sintetizado comercialmente, capaces de matar a otro microorganismo o de inhibir su crecimiento; y aunque este es su principal objetivo, irónicamente se han presentado casos de resistencia como resultado del manejo indebido de las dosis y automedicación por parte del consumidor.</p>	<p><b>General:</b> El extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio nutans</i> “chachacoma” posee actividad antimicrobiana frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos.</p> <p><b>Específicas:</b> Los metabolitos secundarios predominantes en el extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio nutans</i> “chachacoma” son flavonoides, alcaloides y terpenos. El extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio nutans</i> “chachacoma” posee actividad antimicrobiana frente a <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Bacillus cereus</i>. El extracto etanólico de las hojas de <i>Senecio nutans</i> “chachacoma” posee actividad antimicrobiana frente a <i>Echerichia coli</i>, <i>Salmonella tiphy</i>.</p>	<p><b>Independiente:</b> Extracto de las hojas de <i>Senecio nutans</i> “chachacoma”.</p> <p><b>INDICADOR:</b> Metabolitos secundarios. Reacción de coloración y precipitación.</p> <p><b>Dependiente</b> *Actividad antimicrobiana frente a microorganismos gram positivos y gram negativos”.</p> <p><b>INDICADOR:</b> Inhibición de crecimiento de microorganismo gram positivo. Inhibición de crecimiento de microorganismo gram negativos</p>	<p><b>TIPO DE INVESTIGACION</b> Aplicada.</p> <p><b>NIVEL DE INVESTIGACIÓN:</b> Descriptivo y Explicativo.</p> <p><b>DESEÑO DE INVESTIGACIÓN:</b> Experimental.</p> <p><b>POBLACIÓN:</b> La población del estudio: especie de <i>Senecio nutans</i> “chachacoma”. La muestra plantas de chachacoma que crecen en el anexo de San Martín de Pallca, distrito de Chipao, provincia de Lucanas, departamento de Ayacucho que se recolectará en el mes de noviembre del 2019.</p> <p><b>DETERMINACIÓN: GRUPOS FUNCIONALES</b> Taninos, Flavonoides, Aminoácidos, Alcaloides, Saponinas.</p> <p><b>Inhibición de crecimiento de microorganismos</b> Diámetro de inhibición</p>

ANEXO N° 2: CONSTANCIA DE IDENTIFICACION TAXONOMICA

		<p>UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA VICERRECTORADO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO <b>MUSEO DE HISTORIA NATURAL</b></p>	
<p><i>"Año de la lucha contra la corrupción y la impunidad"</i></p>			
<p><b>CONSTANCIA N° 148-USM-2019</b></p>			
<p>EL JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM) DEL MUSEO DE HISTORIA NATURAL, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS, DEJA CONSTANCIA QUE:</p>			
<p>La muestra vegetal (planta completa), recibida de <b>Natalia Huamani Gutiérrez y Yudith Celia Trillo Chávez</b>; estudiantes de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica; ha sido estudiada y clasificada como: <b><i>Senecio nutans Sch.B.p.</i></b> (H.B.K) Cuatrec; y tiene la siguiente posición taxonómica, según el Sistema de Clasificación de Cronquist (1988):</p>			
<p><b>DIVISION: MAGNOLIOPHYTA</b></p>			
<p><b>CLASE: MAGNOLIOPSIDA</b></p>			
<p><b>SUB CLASE: ASTERIDAE</b></p>			
<p><b>ORDEN: ASTERALES</b></p>			
<p><b>FAMILIA: ASTERACEAE</b></p>			
<p><b>GENERO: Senecio</b></p>			
<p><b>ESPECIE: <i>Senecio nutans Sch.B.p</i></b></p>			
<p>Nombre vulgar: "Chachacoma" Determinado por: Mag. Hamilton Beltrán Santiago</p>			
<p>Se extiende la presente constancia a solicitud de la parte interesada, para los fines que estime conveniente.</p>			
<p>Lima, 13 de mayo de 2019</p>			
			 <b>Mag. ASUNCIÓN A. CANO ECHEVARRÍA</b> JEFE DEL HERBARIO SAN MARCOS (USM)
<p>ACE/ddb</p>			

**ANEXO N° 3: CERTIFICACIONES DE CEPAS BACTERIOLOGICAS**

	
Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release	
<b>Specifications</b> <b>Microorganism Name:</b> Salmonella enterica subsp. diarizonae <b>Catalog Number:</b> 01045 <b>Lot Number:</b> 1045-14** <b>Reference Number:</b> ATCC® 29934™* <b>Purity:</b> Pure <b>Passage from Reference:</b> 3	<b>Expiration Date:</b> 2020/8/31 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Christine Condon <b>Release Date:</b> 2018/10/12
<b>Performance</b>	
<b>Macroscopic Features:</b> Small, grey, circular, convex, entire edge <b>Microscopic Features:</b> Gram negative rods	<b>Medium:</b> SBAP <b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> MALDI-TOF (1) See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Oxidase (KOVACS): negative Hektoen Enteric agar: good growth, blue-green yellow colonies (1) Purple Broth w/Lactose: positive XLD Agar: yellow growth
 Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE	
<p><small>**Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the product label and packing slip are merely a packaging event number. The lot number displayed on the certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>⚠ Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p>	
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;">   <small>REFERENCE MATERIAL PRODUCER CERT #2655.02</small> </div> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="text-align: center;"> <small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog or trademarks of ATCC, Microbiologica, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from cultures.</small> </div> </div>	
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;">   <small>TESTING CERT #2655.01</small> </div> <div style="text-align: center;"> <small>(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small> </div> </div>	



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> Microorganism Name: Escherichia coli Catalog Number: 0335 Lot Number: 935-348** Reference Number: ATCC® 25922™** Purity: Pure Passage from Reference: 3	<b>Expiration Date:</b> 2020/2/29 <b>Release Information:</b> Quality Control Technologist: Christine Condon Release Date: 2018/3/2
---	--

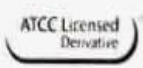
Performance	
<b>Macroscopic Features:</b> 2 colony types, both are gray & beta hemolytic; one is circular to irregular, convex, slightly eros edge & smooth; other is larger, irregular, low convex, eros edge & rough	<b>Medium:</b> SBAP
<b>Microscopic Features:</b> Gram negative straight rod	<b>Method:</b> Gram Stain (1)
<b>ID System:</b> MALDI-TOF See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 16 - 22 mm (1) Gentamicin (10 mcg - Disk Susceptibility): 19 - mm (1) SXT (1.25/23.75 mcg - Disk Susceptibility): 23 - 29 mm
	 Amanda Kuperus Quality Control Manager AUTHORIZED SIGNATURE

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

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

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

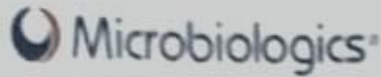
Individual products are traceable to a recognized culture collection.



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

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.






Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> Microorganism Name: <i>Bacillus cereus</i> Catalog Number: 0200 Lot Number: 200-32™ Reference Number: ATCC® 14579™ Purity: Pure Passage from Reference: 2	<b>Expiration Date:</b> 2020/7/31 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Christine Condon <b>Release Date:</b> 2018/8/16
---	---

<b>Performance</b>	
<b>Macroscopic Features:</b> Large, circular to irregular, flat, erose edge, grey, dull, beta hemolytic.	<b>Medium:</b> SBAP
<b>Microscopic Features:</b> Straight, gram positive rod, with an ellipsoidal or spherical, terminal endospore	<b>Method:</b> Gram Stain (1)

**ID System:** MALDI-TOF (1)  
See attached ID System results document.

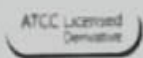
**Other Features/ Challenges: Results**  
(1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive  
Parasporal crystals (Phase Contrast Microscopy): not present  
Rhizoid colonies: not present

  
Amanda Kuperus  
Quality Control Manager  
AUTHORIZED SIGNATURE

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

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

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.  
Individual products are traceable to a recognized culture collection.



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

(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.




Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

<b>Specifications</b> Microorganism Name: Staphylococcus aureus subsp. aureus Catalog Number: 0360 Lot Number: 360-360** Reference Number: ATCC® 25923™* Purity: Pure Passage from Reference: 2	<b>Expiration Date:</b> 2019/11/30 <b>Release Information:</b> <b>Quality Control Technologist:</b> Christine Condon <b>Release Date:</b> 2018/1/15
---	--

<b>Performance</b>	
<b>Macroscopic Features:</b> Medium to large, convex, entire edge, both white and pale white colonies, smooth, opaque, beta hemolytic	<b>Medium:</b> SBAP
<b>Microscopic Features:</b> Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters	<b>Method:</b> Gram Stain (1)

<b>ID System:</b> MALDI-TOF See attached ID System results document.	<b>Other Features/ Challenges: Results</b> (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma - tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative (1) Ampicillin (10 mcg - Disk Susceptibility): 27 - 35 (1) Penicillin (10 units - Disk Susceptibility): 26 - 37 mm (1) Oxacillin (1 mcg - Disk Susceptibility): 18 - 24 mm
---	---

  
Amanda Kuperus  
Quality Control Manager  
AUTHORIZED SIGNATURE

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

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

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

Individual products are traceable to a recognized culture collection.



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

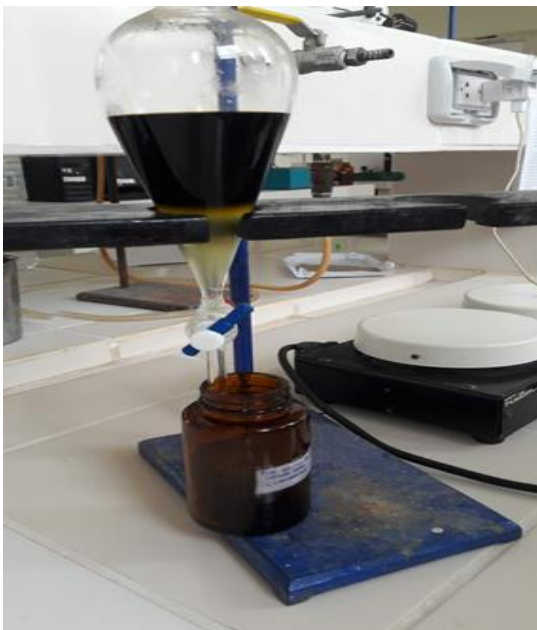
(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.



## ANEXO N° 4: EVIDENCIAS EXPERIMENTALES



\* Recolección, selección, secado y acondicionamiento del material vegetal.



\* Detección de alcaloides.



\*Detección de esteroides.



\*En base del residuo se realizó las siguientes pruebas como: flavonoides, saponinas, antraquinonas y taninos.



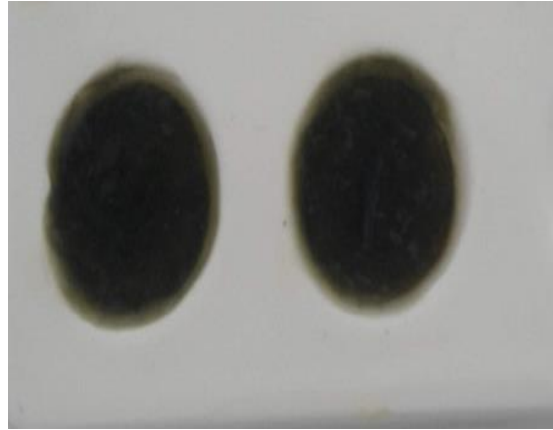
\*Detección de flavonoides.



\*Detección de saponinas.



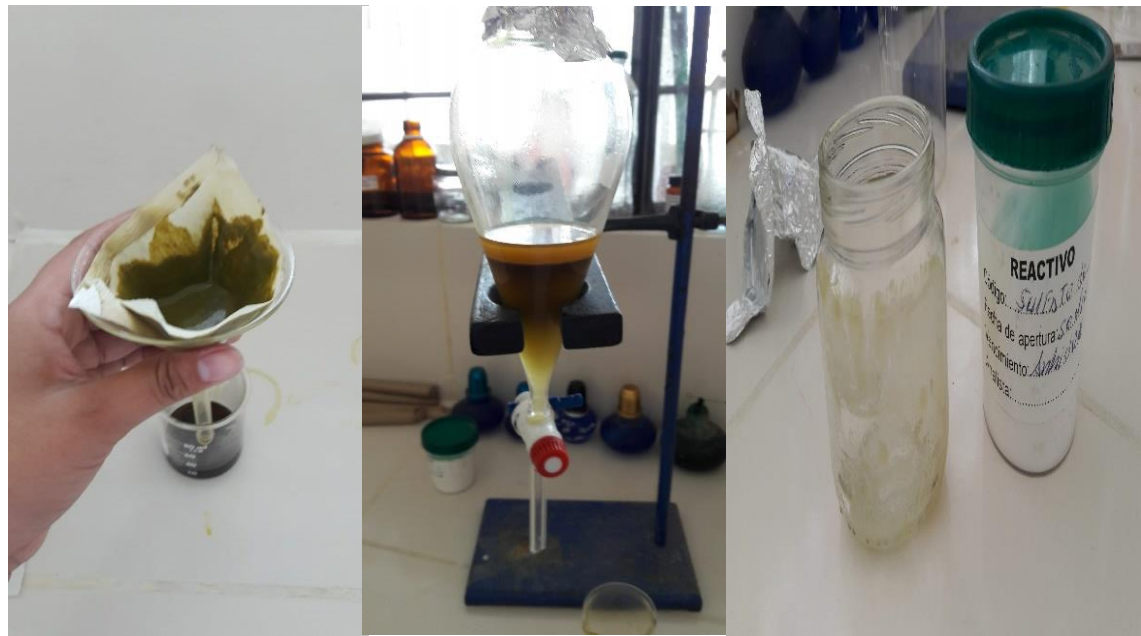
\* Detección de antraquinonas.



\* Detección de taninos.



\*Preparación del extracto para precipitar con  $\text{Pb}(\text{AcO})_2$  5%.



\*Filtrado, secado y concentrado.



\*Cromatografía en columna.



\*Detección de cardiotónicos.

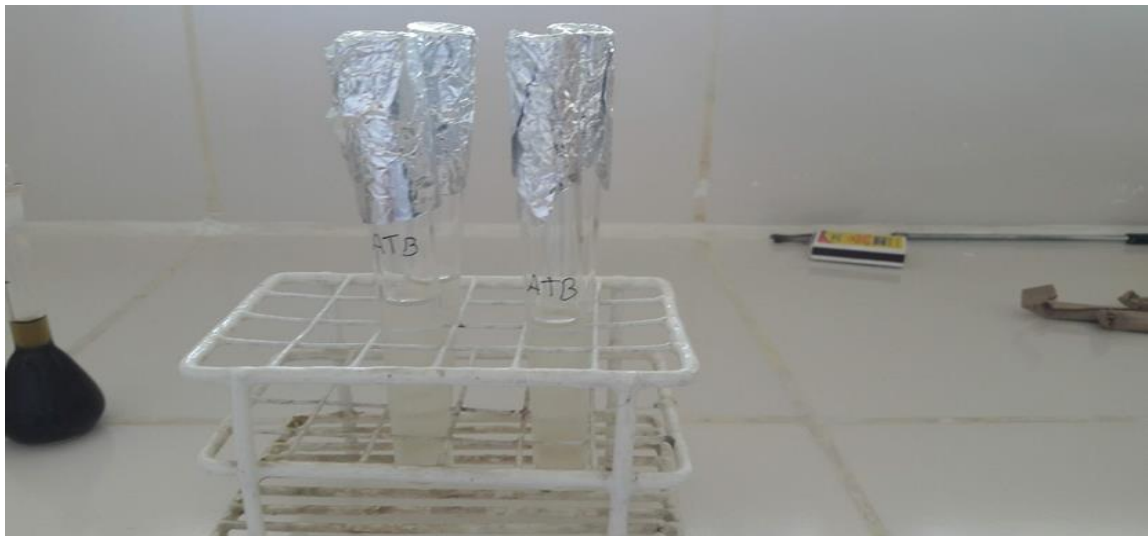


\*Detección de sesquiterpenolactonas y cumarinas.

## Análisis bacteriológico.



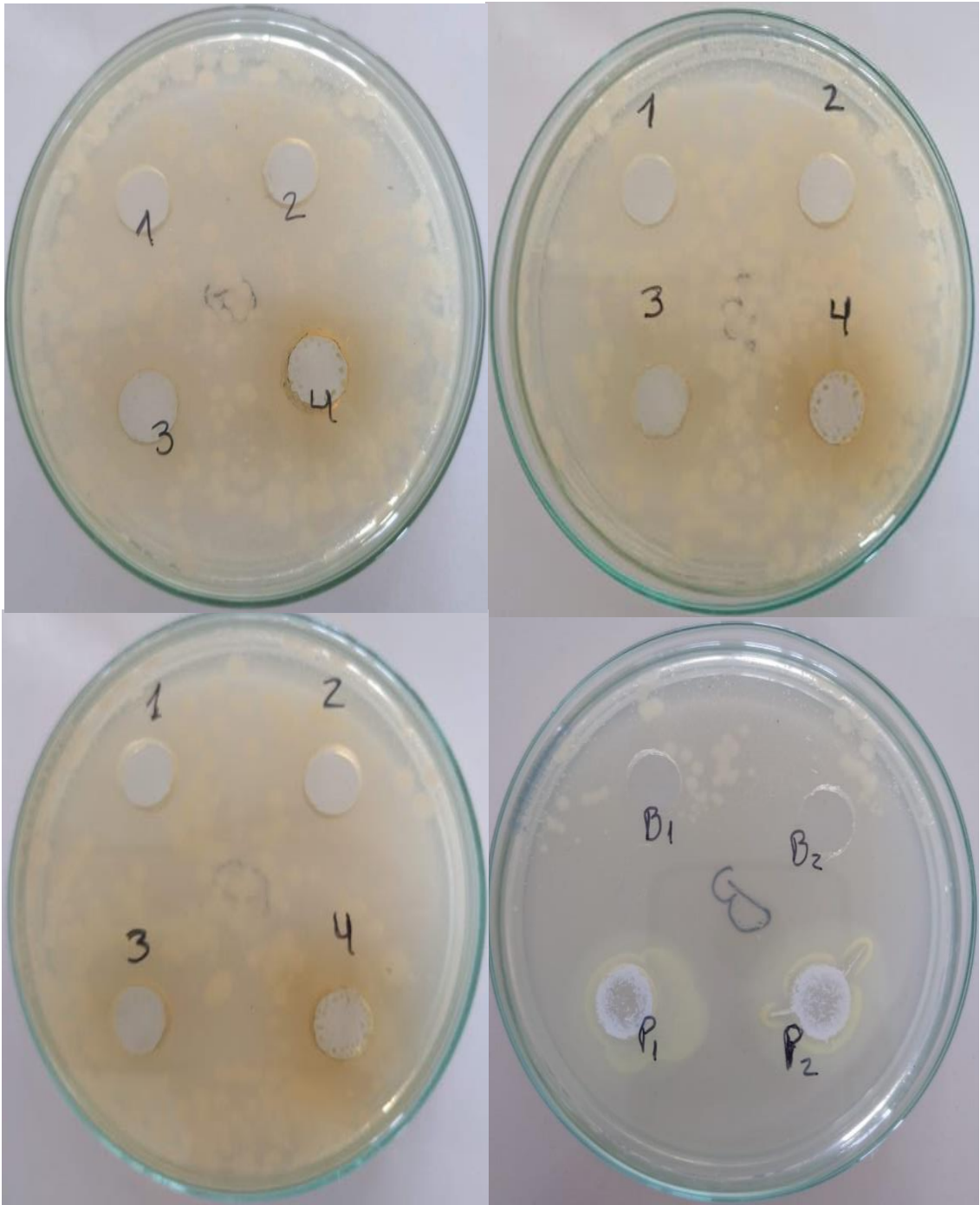
\*Disolución del extracto.



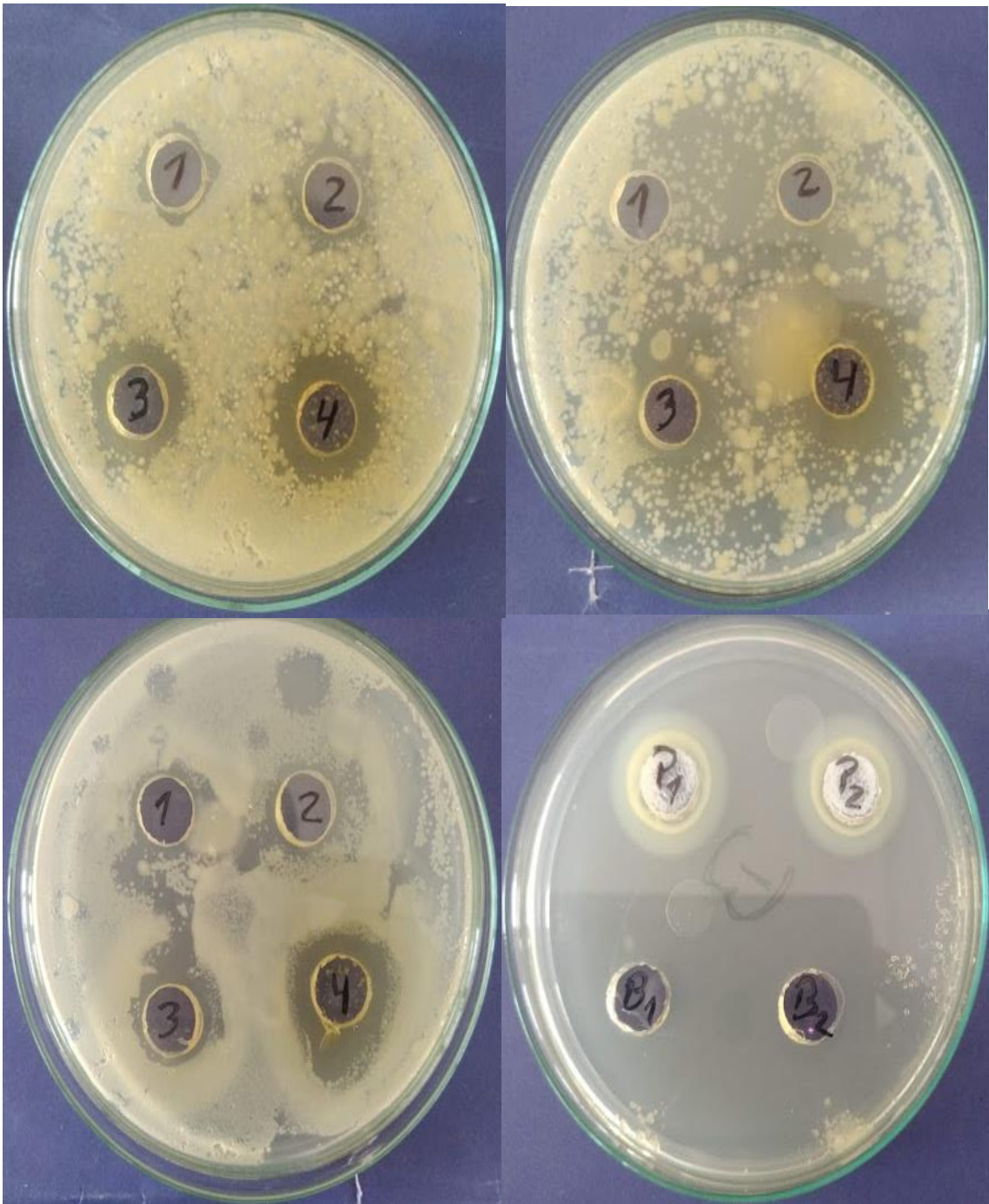
\*Preparación de caldo de cultivo.



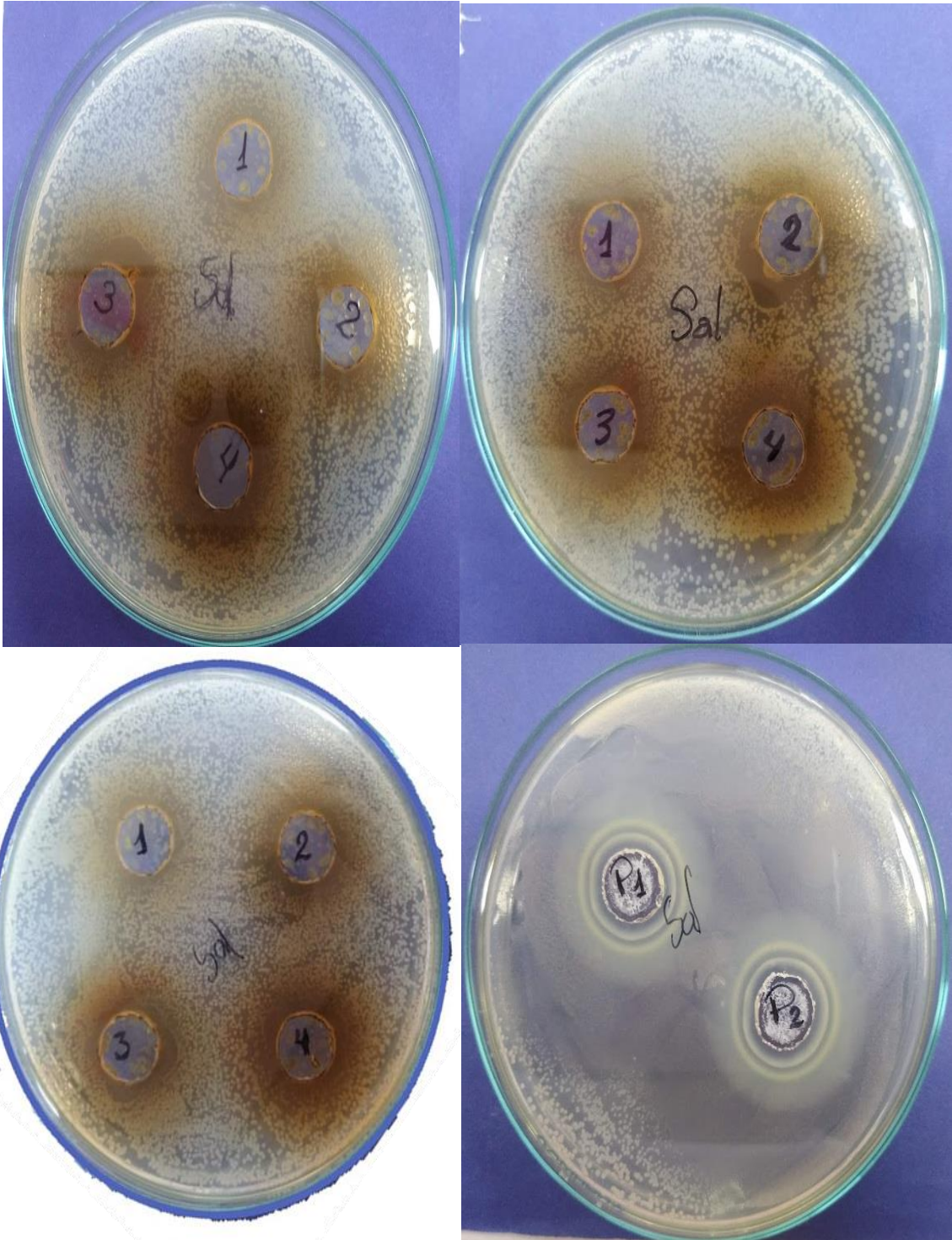
\*Dilución del agar.



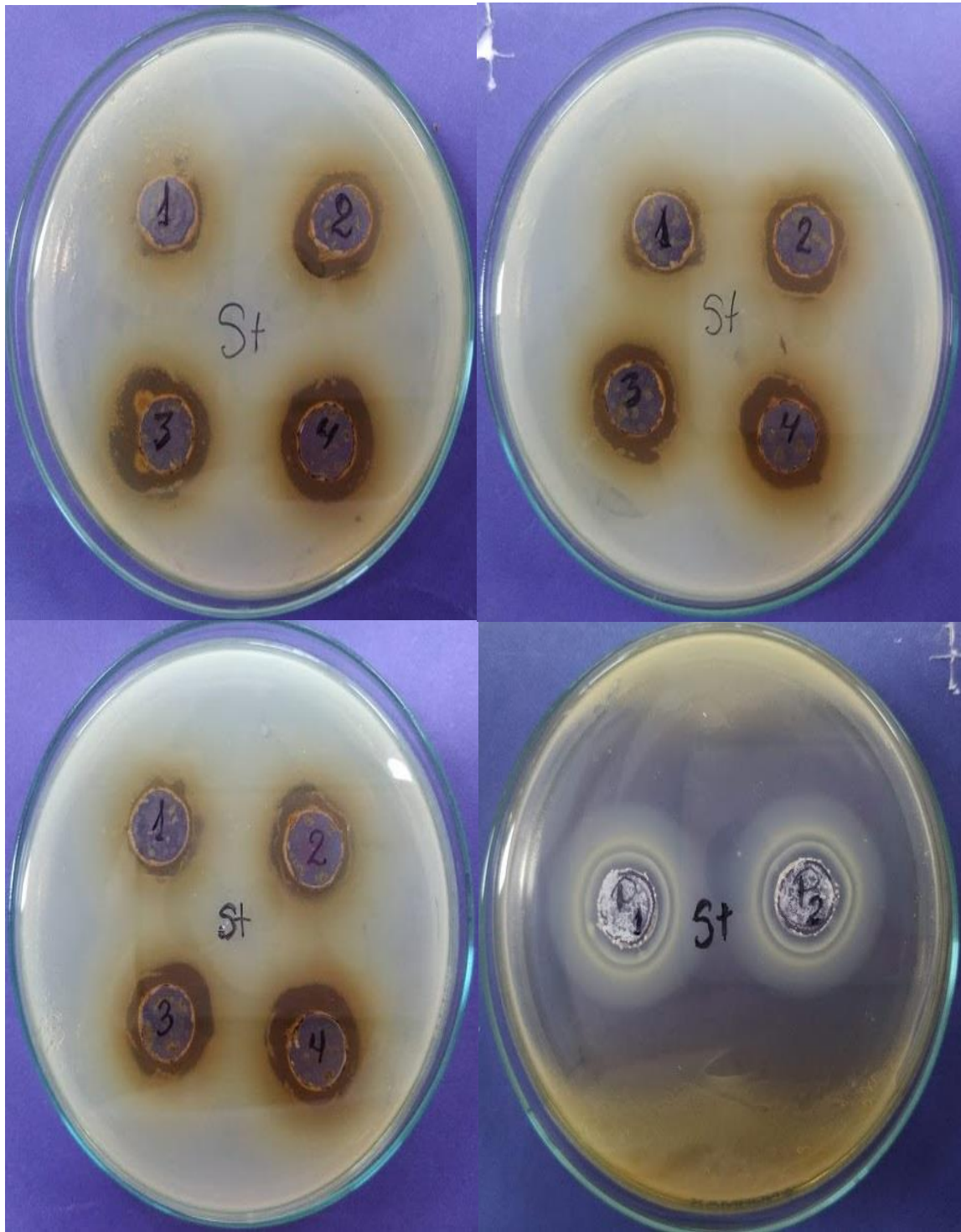
\*Análisis *Bacillus cereus*.



\*Análisis de *Escherichia coli*.



\*Análisis de *Salmonella typhi*.



\*Análisis de *Staphylococcus aureus*.